

41
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

EFFECTO DE LA MUTACION recB21 DE Escherichia coli
SOBRE LA RECOMBINOGENESIS INDIRECTA DEL
BACTERIOFAGO LAMBDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
ADRIANA CASTILLO VILLANUEVA

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CONTENIDO

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCION	2
2.1 BACTERIOFAGO LAMBDA	2
2.1.1 Estructura	2
2.1.2 Ciclo de Vida	2
2.2 REPARACION DEL ADN	8
2.2.1 Estructura de la Molécula	8
2.2.2 Daño al ADN	10
2.2.3 Reparación del ADN	13
2.3 MECANISMOS DE RECOMBINACION Y SU RELACION CON LA REPARACION DEL ADN	22
2.3.1 Recombinación	22
2.3.2 Vía RecB	24
2.3.3 Vía RecF	29
2.3.4 Vía RecE	30
2.3.5 Sistema Red	31
2.3.6 Recombinación como Sistema de Reparación	32
2.4 RECOMBINOGENESIS INDIRECTA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA ..	33
3 OBJETIVO	36
4 MATERIAL Y METODOS	36
4.1 MATERIALES	36
4.1.1 Bacterias y virus	36
4.1.2 Medios de cultivo:	38
4.2 METODOLOGIA	40
4.2.1 Preparación de Stocks de Fagos λ	40
4.2.2 Titulación de los Fagos	41
4.2.3 Titulación de las Bacterias	42
4.2.4 Transducción	42
4.2.5 Irradiación con Luz Ultravioleta	44
4.2.6 Cruzas Virales	46
4.2.7 Estadística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Transducción	48
5.2 Sensibilidad a UV	48
5.3 Cruzas virales	51
6 DISCUSION	56
7 CONCLUSIONES	62
8 BIBLIOGRAFIA	63

1 RESUMEN

La progenie recombinante entre diferentes mutantes ámbar del bacteriófago lambda (λ), aumenta más de 5 veces cuando se multiplica activamente en células de *Escherichia coli* previamente irradiadas con luz ultravioleta (UV). Este efecto, al que se ha denominado recombinogénesis indirecta del bacteriófago lambda, se caracteriza por un incremento tanto en el número de recombinantes por célula como en el número de células en las que ocurren eventos de recombinación.

Debido a que este fenómeno depende principalmente de lo que ocurre en la célula huésped después de la irradiación con UV, se ha tratado de relacionarlo con las respuestas celulares a los daños en el ADN y con los genes bacterianos que intervienen en ellas. En este trabajo en particular se analizaron las progenies virales resultantes de cruces entre mutantes ámbar de λ , efectuadas en huéspedes *recB21* de *E. coli*, los cuales carecen de todas las actividades de la enzima RecBCD. Los datos obtenidos indican que esta enzima juega un papel importante en la recombinogénesis indirecta de λ ya que en esos mutantes *recB21* la respuesta no se presenta o está reducida drásticamente.

La proteína RecBCD de *E. coli* es una de las enzimas más importantes, tanto en la recombinación genética como en la reparación del ADN dañado. Entre sus múltiples actividades se encuentra la de exonucleasa dependiente de ATP, por medio de la cual digiere moléculas lineales de ADN de doble cadena, tales como las que se generan en la fase tardía del ciclo lítico de lambda. Para contrarrestar ese efecto el fago codifica la proteína Gam, que inhibe no solo esa actividad sino todas las conocidas de RecBCD, de modo que el ADN viral pueda ser encapsulado sin mayor problema. Sin embargo, el hecho de que RecBCD puede intervenir en la recombinogénesis indirecta de lambda, indica que la enzima en realidad no es completamente inhibida o que posee una actividad aún no conocida, que es resistente a Gam y necesaria para el fenómeno. Por otro lado, puesto que la síntesis de RecBCD es constitutiva, la inducibilidad de la respuesta viral debe ser ocasionada por algún otro mecanismo tal como un aumento de los substratos moleculares de ADN, sobre los que ella actúa.

2 INTRODUCCION

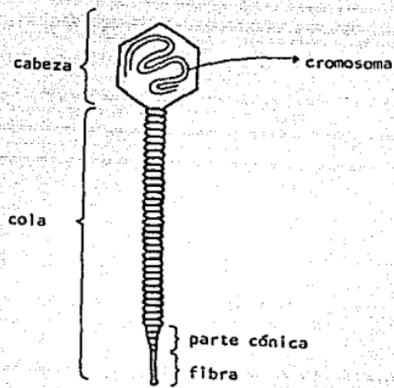
2.1 BACTERIOFAGO LAMBDA

2.1.1 Estructura

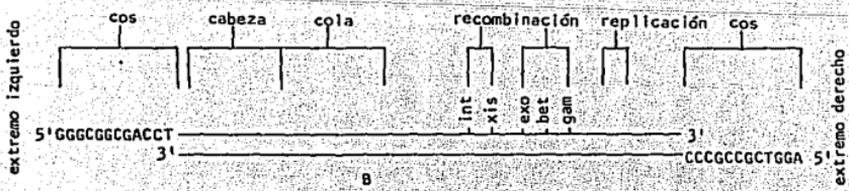
Las partículas del bacteriófago lambda están compuestas aproximadamente por un 50% de proteína y un 50% de ADN. La parte proteica conforma dos estructuras: la "cabeza", en cuyo interior se encuentra el cromosoma, y la "cola" por medio de la cual el bacteriófago se adsorbe a la pared de la célula huésped e inyecta su ADN. La cabeza es una estructura icosaédrica, hexagonal en sección transversal, con un diámetro de 0.05 μ m, constituida por un ensamble de subunidades proteicas idénticas. La cola es una proyección tubular delgada y flexible de 0.15 μ m de longitud que termina en una pequeña parte cónica y una fibra simple (Fig 1a) (Kellenberger y Edgar, 1971; Hershey y Dove, 1983). El cromosoma es una molécula lineal de ADN de doble banda, que codifica alrededor de 50 proteínas (Szybalski y Szybalski, 1979) en cuyos extremos se encuentra una región de 12 nucleótidos complementarios antiparalelos conocida como *cos* cuya secuencia es 5'GGGCGGCGACCT3' (Fig 1b) (Nichols y Donelson, 1978; Daniels y col., 1983). Una vez que el cromosoma lineal de λ se encuentra dentro de una célula huésped, estos extremos se asocian por apareamiento complementario de bases para formar una molécula circular cerrada (Wu y Taylor, 1971; Sambrook y col., 1989).

2.1.2 Ciclo de Vida

El ciclo vital de λ comienza cuando una partícula se adsorbe por la punta de su cola a la membrana de la célula huésped e inyecta su molécula lineal de ADN (Hershey y Dove, 1983), proceso en el cual las proteínas del huésped juegan un papel importante. El fago se adsorbe externamente a moléculas proteicas receptoras de la membrana, codificadas por el gen *lamB* de la bacteria (Randall-Hazelbauer y Schwartz, 1973) e internamente a proteínas codificada por el gen *ptsM* (Elliot y Arber, 1978), todas ellas relacionadas en el transporte de la maltosa al interior de la célula (Katsura, 1983) y cuya actividad es inducida por la presencia de este azúcar en el medio de cultivo (Sambrook y col., 1989).



A



B

Fig 1. A. ESTRUCTURA ESQUEMATICA DEL FAGO LAMBDA (KATSURA, 1983)
 B. MAPA GENETICO DE LAMBDA (DANIELS Y COL., 1983)

Una vez dentro de la bacteria las moléculas del ADN de λ pueden seguir dos caminos diferentes. Uno de ellos es el llamado ciclo lítico el cual se inicia cuando los cromosomas lineales se convierten en moléculas circulares covalentemente cerradas, sobre las cuales se produce un superenrollamiento negativo a fin de servir como sustratos para la iniciación de su replicación (Tomizawa y Ogawa, 1969). Este proceso es llevado a cabo principalmente por la bacteria huésped, ya que solo dos proteínas virales, codificadas por los genes α y ρ , intervienen en él, la primera en la iniciación y la segunda en el avance de la síntesis de ADN viral (Furth y Wickner, 1983).

La replicación del genoma del fago puede dividirse en dos fases: temprana y tardía (Furth y Wickner, 1983) (Fig 2). En la primera, la síntesis del ADN dentro de las moléculas circulares cerradas, se inicia en un solo punto llamado *ori* y avanza en ambas direcciones, dando lugar a estructuras que recuerdan la letra griega theta (θ) con dos ramas de igual longitud, correspondientes a las porciones duplicadas de la molécula y un tercer segmento que aún no ha sido replicado (Schnos e Inman, 1970).

En la fase tardía, tras varias vueltas de replicación theta, algunos de los cromosomas adoptan un modo más eficaz de replicación denominado sigma o replicación en círculo rodante, durante el cual se generan estructuras parecidas a la letra griega sigma, es decir, círculos con una ramificación y una cola (σ). Este modo de duplicación comienza después de la introducción de una incisión en la forma replicativa theta, dando lugar al crecimiento de una cola, en cuya base actúan un grupo de enzimas duplicando las dos cadenas del ADN progenitor y formando una larga hilera de cromosomas víricos o concatémicos, que sirven como sustrato para la encapsulación (Fig 2) (Furth y Wickner, 1983; Stahl, 1987).

Cuando comienza la replicación sigma, se han sintetizado ya las proteínas que forman las cápsulas víricas así como las enzimas encargadas del empaquetamiento del ADN en ellas. La enzima que cataliza el recorte y empaquetamiento de los cromosomas es la Terminasa, la cual reconoce las secuencias *cos* y se une al ADN a la derecha de ellas, como se representa convencionalmente el cromosoma de λ (Fig 1b).

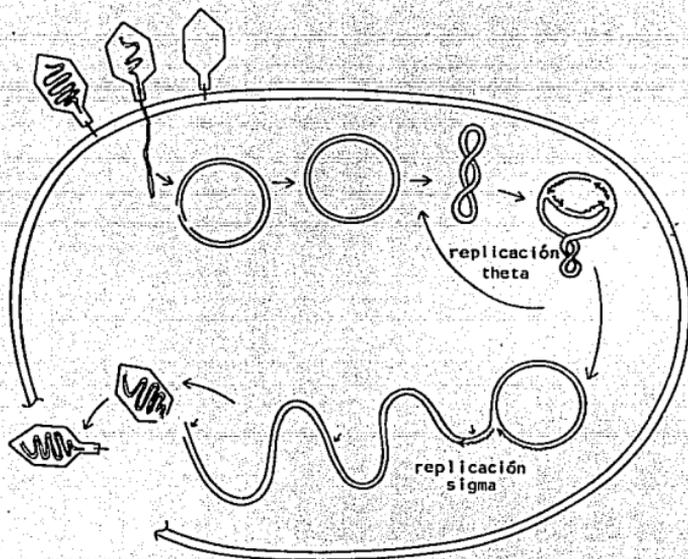


Fig 2. CICLO DE REPLICACION DEL ADN DEL BACTERIOFAGO LAMBDA (FURTH Y WICKNER, 1983)

Seguidamente, corta el ADN en la secuencia *cos* que queda a su izquierda y sin separarse del extremo cortado se une a una cápsula vacía, avanza por el ADN hacia su derecha introduciéndolo en la cápsula hasta que encuentra otra secuencia *cos* en la que realiza otro corte, con el cual finaliza el empaquetamiento (Stahl, 1987). La adición de las colas es la fase final de la maduración de las partículas del fago, las cuales son capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección.

El bacteriófago λ puede seguir otro camino en el cual se integra al cromosoma bacteriano y se multiplica como parte de él en un proceso conocido como lisogenización. En este caso, el ADN inyectado en la célula huésped dirige primeramente la síntesis de enzimas que promueven su inserción dentro del ADN del huésped y en seguida la de otras que actúan rápidamente para reprimir la replicación autónoma del ADN y demás funciones virales. El ADN del fago se inserta dentro del cromosoma bacteriano en un sitio característico conocido como sitio *att*, entre los genes *gal* y *bio* en la posición correspondiente a los 17 minutos del mapa genético de *E. coli* (Bachmann, 1987) y su replicación contribuye de una manera indirecta al crecimiento viral, ya que cada célula que lleva un fago es un centro potencial para la producción de nuevas partículas virales. La célula bacteriana que lleva un cromosoma viral integrado en su genoma se llama lisogénica y el fago, en ese estado latente, se conoce como prófago (Hershey y Dove, 1983).

Cuando una población de bacterias es infectada por λ , algunas células siguen la vía lisogénica y otras la vía lítica (Fig 3), lo que implica que en cada célula se debe tomar una "decisión" para seguir una u otra opción (Wulff y Rosenberg, 1983; Alberts y col., 1989). La elección entre estas dos formas de existencia vírica, esta gobernada directamente por los niveles relativos de dos proteínas codificadas por el genoma de λ : el *repressor* (producto del gene *cI*) y la proteína Cro (producto del gene *cro*), cada una de la cuales bloquea la síntesis de la otra. Mientras que el *repressor* es esencial para la lisogenización, al bloquear la expresión de los genes líticos del fago y al regular positivamente su propia síntesis, la proteína Cro promueve la multiplicación lítica, al inhibir la síntesis de *repressor* (Gussin y col., 1983; Alberts y col., 1989).

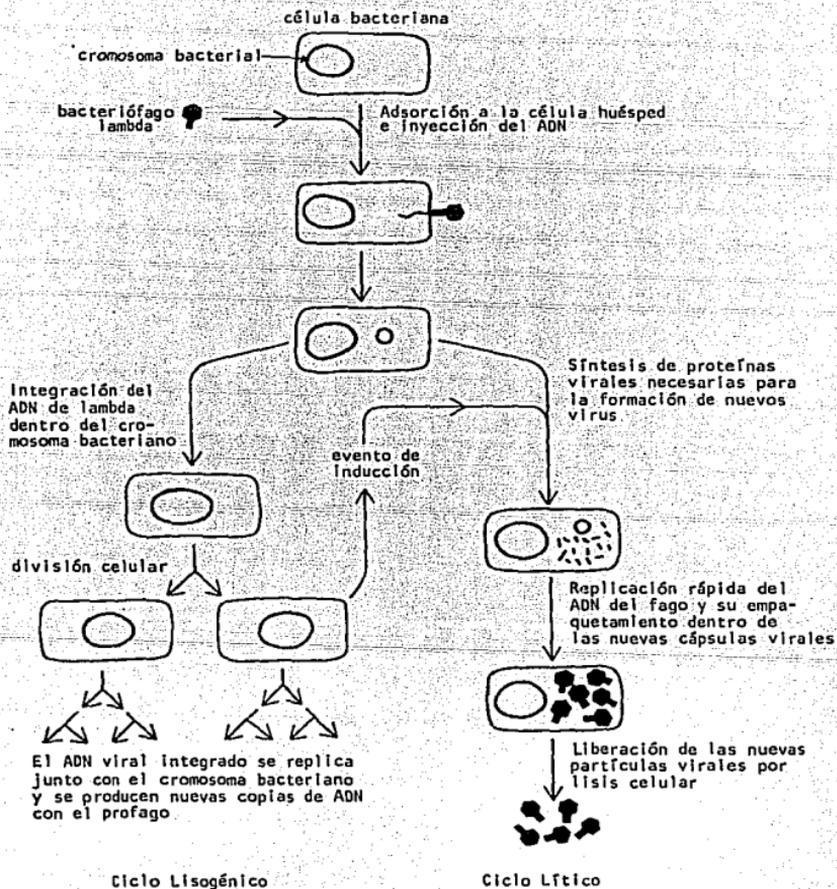


Fig 3. CICLO DE VIDA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA (ALBERTS Y COL., 1989)

El producto del gene *cro* es además necesario para la síntesis óptima del ADN del fago, especialmente en la fase tardía después de la infección (Folkmanis y col., 1977). La multiplicidad de infección, es decir, el número de fagos que infectan simultáneamente a cada bacteria, es un factor que tiene una gran influencia sobre la frecuencia de las dos respuestas: una alta multiplicidad de infección favorece la respuesta lisogénica y una baja multiplicidad favorece la respuesta lítica (Yen y Gussin, 1980).

La integración del genoma de λ en el cromosoma de *E. coli* puede revertirse bajo ciertas condiciones especiales, dando lugar a la iniciación del ciclo de crecimiento lítico. La separación del prófago del cromosoma bacteriano requiere, además de ciertos factores bacterianos, los productos de dos genes virales: *int* (que interviene también en la integración) y *xis*. Puesto que ambos genes están reprimidos en el estado lisogénico, la separación tiene lugar solo después de que el *repressor* ha sido inactivado, fenómeno conocido como inducción lisogénica, la cual generalmente ocurre cuando existe alguna interferencia con la replicación del ADN bacteriano. Dos formas comúnmente usadas para inducir el crecimiento lítico de λ en un cultivo lisogénico son la irradiación con luz UV y el tratamiento con mitomicina C (Arber, 1983), dos conocidos agentes que interfieren con la replicación normal del ADN.

El modelo generalmente aceptado para la inducción del prófago en *E. coli* propone que ésta ocurre por un mecanismo similar a la inducción de los genes SOS que se encuentran normalmente reprimidos por el producto del gene *lexA* (Roberts y Devoret, 1983), como veremos más adelante.

2.2 REPARACIÓN DEL ADN

2.2.1 Estructura de la Molécula

La información que determina las características estructurales y metabólicas de los seres vivos esta contenida en las moléculas del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Fig 4). Estas moléculas constan de dos largas cadenas complementarias y antiparalelas, cada una de las cuales es un polímero constituido por cuatro subunidades diferentes: los nucleótidos, unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster y formados a su vez por un azúcar (pentosa del tipo β -D-2-desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (compuesto

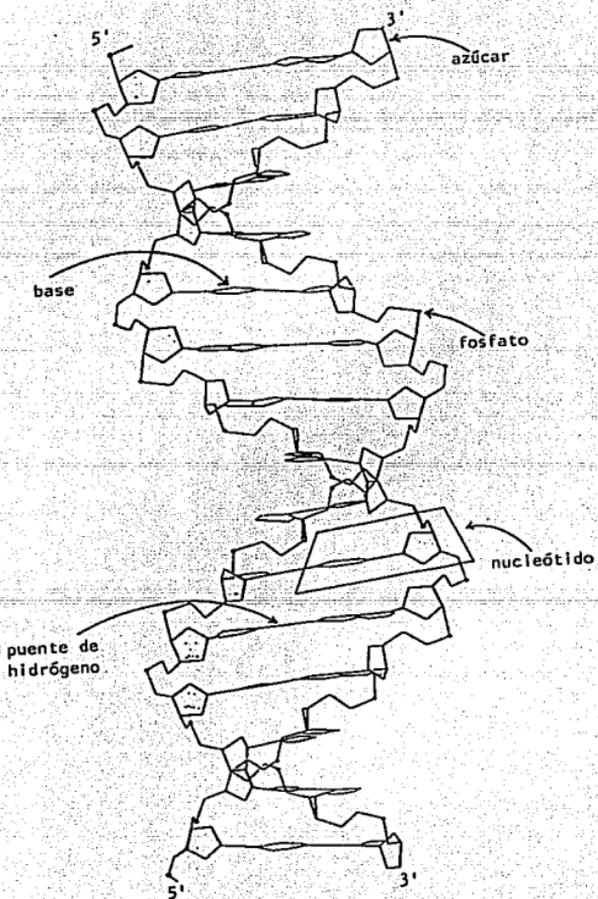


Fig 4. ESTRUCTURA HELICOIDAL DE LA MOLECULA DEL ADN (HOWARD-FLANDERS, 1981)

cíclico). Existen cuatro tipos diferentes de bases: las purinas Adenina (A) y Guanina (G) y las pirimidinas Timina (T) y Citosina (C) (Fig 5). Las bases de una cadena se unen por puentes de hidrógeno a las bases de la otra cadena en una forma específica (complementariedad): A se aparea solo con T, y G solo con C, lo cual es fundamental para la replicación, transcripción y recombinación del ADN (Fig 6) (Howard-Flanders, 1981; Alberts y col., 1989; Watson y col, 1987). La información contenida en el ADN está codificada por la secuencia de las bases a lo largo de las cadenas formando palabras de tres letras (codón) que corresponden a cada uno de los veinte diferentes aminoácidos que constituyen las proteínas, producto de la traducción del mensaje genético (Hélène, 1984).

2.2.2 Daño al ADN

Desde que se reconoció al ADN como la base química de el material genético, se asumió que esta macromolécula debía ser muy estable y mantener un alto grado de fidelidad durante su duplicación. Sin embargo, su estructura está propensa a sufrir cambios que modifican la información genética (mutaciones), los cuales se originan a causa de factores intrínsecos o por alteraciones de la estructura molecular del ADN inducidas por una gran variedad de agentes químicos, físicos y/o biológicos, muchos de los cuales están presentes en nuestro ambiente. Cada una de estas alteraciones es considerada como un daño (Friedberg, 1985) y cualquier daño en el ADN es una fuente potencial de perturbación en la fidelidad de la replicación y transcripción que afecta las funciones celulares y en determinado momento puede poner en peligro la supervivencia celular (Hannan y Nasim, 1984).

La exposición de las células de *E. coli* a radiación UV es el modelo mejor estudiado y utilizado para la investigación de las consecuencias biológicas de la inducción de daños en el ADN. La radiación ultravioleta de longitud de onda cercana a los 260 nm, provoca principalmente la unión de dos bases pirimidínicas (timinas) adyacentes en la misma cadena, a través de la saturación de los dobles enlaces entre los carbonos 5 y 6 dando como resultado la formación de una estructura en anillo de cuatro carbonos, conocida como dímero de pirimidina (Fig 7) (Friedberg, 1985; Kushner, 1987).

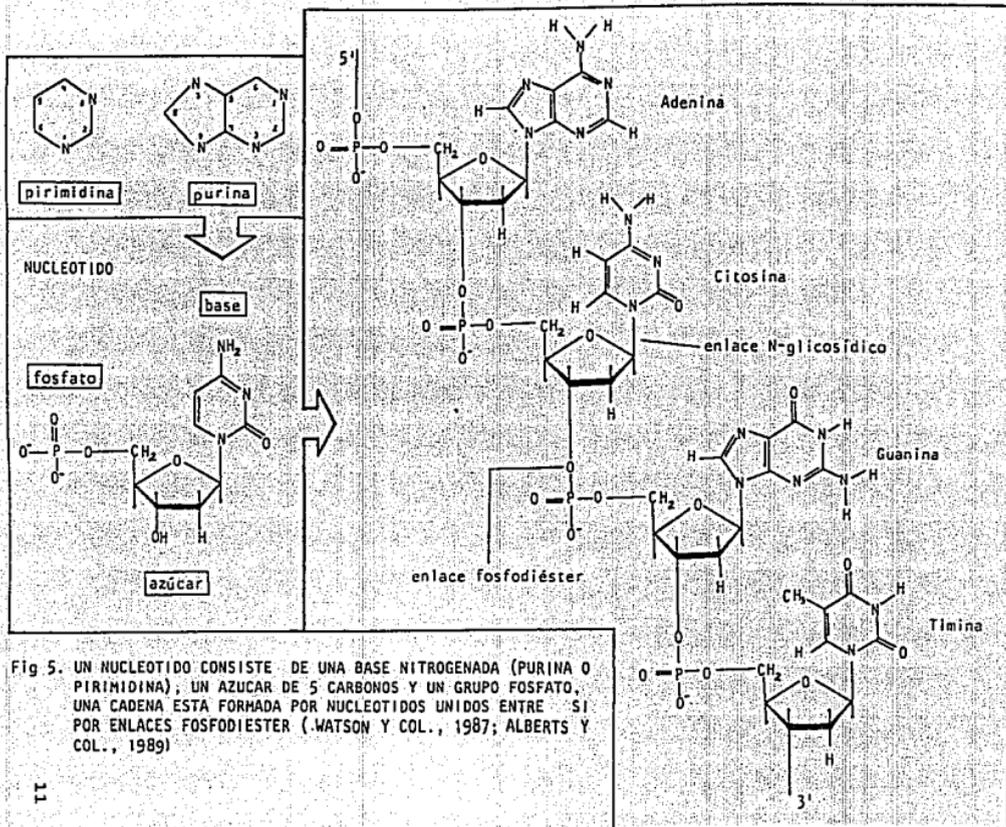


Fig 5. UN NUCLEOTIDO CONSISTE DE UNA BASE NITROGENADA (PURINA O PIRIMIDINA), UN AZUCAR DE 5 CARBONOS Y UN GRUPO FOSFATO. UNA CADENA ESTA FORMADA POR NUCLEOTIDOS UNIDOS ENTRE SI POR ENLACES FOSFODIESTER (WATSON Y COL., 1987; ALBERTS Y COL., 1989)

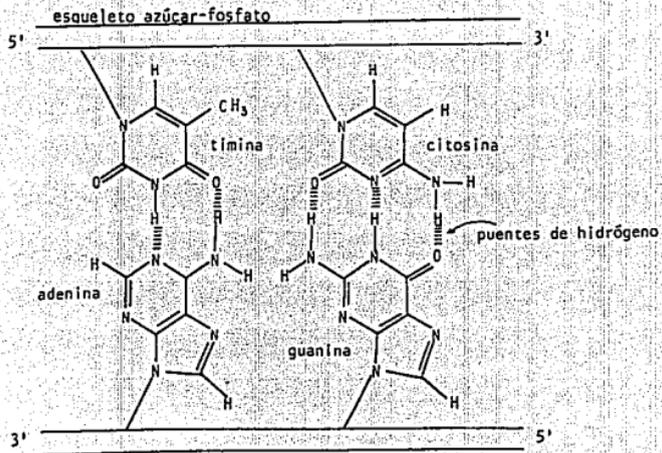


Fig 6. PUNTES DE HIDROGENO ESPECIFICOS ENTRE G Y C Y ENTRE A Y T GENERAN LA COMPLEMENTARIEDAD EN EL APAREAMIENTO DE BASES (ALBERTS Y COL., 1989)

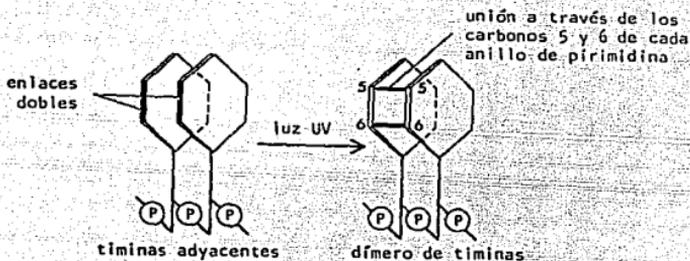


Fig 7. DIMERO DE PIRIMIDINA (WATSON Y COL., 1987)

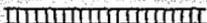
2.2.3 Reparación del ADN

Los fotoproductos inducidos por la luz UV, tales como los dímeros de timina, pueden ser reconocidos y reparados por varios mecanismos que se encuentran en la mayoría de los diferentes grupos bacterianos (Kushner, 1987). Entre ellos podemos mencionar los siguientes:

Reparación Fotoenzimática o Fotorreactivación (Prerreplicativa)

Este proceso, que es el más sencillo, es llevado a cabo por una enzima llamada fotoliasa la cual elimina los dímeros de pirimidina en dos etapas: primero se une al sitio donde se encuentra un dímero y después rompe el anillo de cuatro carbonos regenerando las dos pirimidinas originales (Fig 8). La ruptura del anillo del dímero requiere la absorción, por parte de la enzima, de un fotón de luz con una longitud de onda entre 300 y 600 nm correspondiente a la región azul del espectro visible (Paterson y Gentner, 1984).

1. molécula de ADN



2. formación del dímero



3. complejo del ADN con la enzima fotorreactiva



4. absorción de luz (>300 nm)



5. ADN restaurado y liberación de la enzima



Fig 8. REPARACION FOTOENZIMATICA (FRIEDBERG, 1985)

Reparación por Excisión (Prerrepliativa)

Se conocen dos tipos de reparación por excisión, que actúan dependiendo del tipo de daño producido en el ADN. Una es la excisión de bases y la otra es la excisión de nucleótidos.

La reparación por excisión de bases se lleva a cabo cuando las bases de la molécula de ADN son dañadas o modificadas por algún factor externo como la radiación o algún compuesto químico que interactúa con ellas. El primer paso de este tipo de reparación consiste en la remoción de la base dañada a través de la acción de la ADN glicosidasa, enzima que corta la unión N-glicosídica entre el azúcar y la base lo que origina un sitio apurínico o apirimidínico (sitio AP) dependiendo de la base de la que se trate. Los sitios AP, que pueden también formarse por la hidrólisis espontánea de la ligadura N-glicosídica, son reconocidos por las endonucleasas AP específicas que cortan las uniones fosfodiéster a ambos lados del sitio AP dejando un hueco que pueda ser extendido por acción de alguna exonucleasa celular. La reparación subsiguiente de estos huecos se lleva a cabo de la misma manera que en la reparación por excisión de nucleótidos, como veremos enseguida (Friedberg, 1985; Sancar y Sancar, 1988).

Al igual que en el proceso anterior, la excisión de nucleótidos consta de varios pasos, cada uno de los cuales es catalizado por una enzima diferente. En la primera reacción un dímero de la proteína UvrA se une inespecíficamente al ADN dañado formando un complejo inestable. En seguida la proteína UvrB se une incrementando por un lado la estabilidad del complejo ADN-UvrA y por otro la especificidad por el sitio dañado. Una vez localizado el daño se requiere la interacción con otra proteína llamada UvrC y no es sino hasta que esta última se ha unido, que se rompe la octava ligadura fosfodiéster en el lado 5' del sitio dañado y la cuarta o quinta del lado 3'. El complejo de las tres proteínas UvrA, UvrB y UvrC permanece unido al ADN hasta que, como consecuencia de la acción de la ADN-helicasa II, producto del gen *uvrD*, es liberado junto con el oligonucleótido que incluye el daño, creando un hueco o región de una sola banda susceptible de ser rellenado por la ADN-polimerasa I, que reemplaza los nucleótidos eliminados tomando como modelo la cadena complementaria.

Finalmente, la ADN-ligasa cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster tanto del lado 3' como del 5' de la región substituida quedando la molécula tal como estaba antes de ser dañada (Fig 9) (Kushner, 1987).

Reparación por Recombinación (Postreplicativa)

Este tipo de reparación actúa después de que la replicación del ADN dañado ha tenido lugar. En una célula que ha sido expuesta a radiación UV, los segmentos del ADN que no han sufrido ninguna alteración se replican con normalidad, pero no así los sitios en los que se han producido dímeros de pirimidina. Cuando la síntesis del ADN alcanza alguno de ellos, se interrumpe temporalmente y se reanuda un poco más adelante dando lugar a lo que se conoce como hueco postreplicativo o región de una banda, el cual no puede ser reparado por el mecanismo de excisión en virtud de que este último requiere de una cadena complementaria intacta. Sin embargo, estos huecos son susceptibles de ser reparados por un proceso de recombinación genética homóloga en el que se intercambian fragmentos de ADN con el fin de reconstruir una molécula funcional, la cual puede ser entonces sujeta a reparación por excisión o fotorreactivación para eliminar completamente los daños (Fig 10) (Howard-Flander, 1981; Kushner, 1987).

Respuesta SOS (Postreplicativa)

Basándose en una gran cantidad de resultados obtenidos por diversos investigadores, Radman en 1975, propuso la existencia en *E. coli* de un conjunto de funciones celulares que son inducidas de alguna manera por la presencia de lesiones en el ADN o por la inhibición de la síntesis del mismo. Este conjunto de funciones fueron denominadas funciones SOS para enfatizar que se trata de una respuesta a una condición de emergencia cuya finalidad es la de incrementar la probabilidad de supervivencia de la célula.

Las funciones SOS comprenden un complejo sistema de respuestas controladas por los productos de los genes *recA* y *lexA* de los cuales depende la transcripción de aproximadamente 20 genes involucrados en diferentes procesos celulares. Bajo condiciones normales de crecimiento, la proteína LexA reprime todos esos genes, incluyendo a los mismos *recA* y *lexA*, al unirse a una

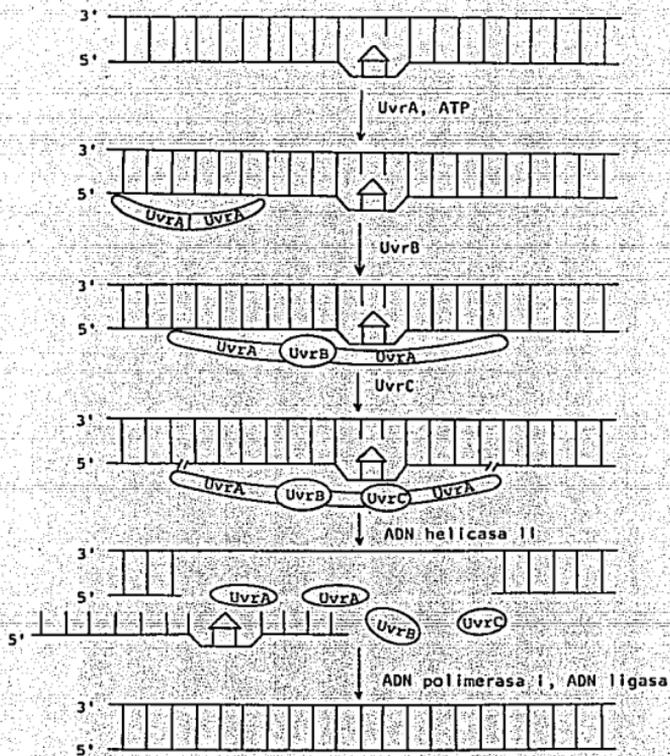


Fig 9. REPARACION POR EXCISION DE NUCLEOTIDOS (KUSHNER, 1987)

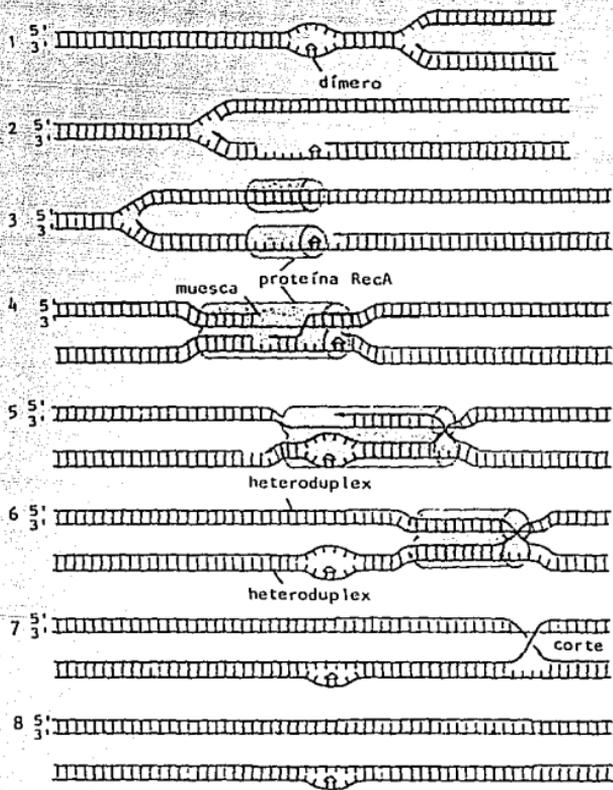


Fig 10. REPARACION POSTREPLICATIVA (HOWARD-FLANDERS, 1981)

región específica, confía a cada uno de ellos, conocida como operador. Sin embargo, a pesar de esta represión, algunos de ellos se expresan de una manera importante para la célula (Walker, 1987).

Como ya se mencionó anteriormente, cuando el ADN dañado se duplica, se producen los llamados huecos postreplicativos o regiones de una sola banda (señal inductora), enfrente de las regiones dañadas. Los huecos postreplicativos provocan de alguna manera la activación de la proteína RecA como coproteasa, la cual es entonces capaz de actuar como un cofactor en la digestión del represor LexA (Roberts y Devoret, 1983), permitiendo que los genes reprimidos se expresen en niveles más altos y las funciones SOS se comiencen a manifestar. Cuando el ADN es reparado y su síntesis normal restaurada, el nivel de los huecos postreplicativos desciende, la actividad de coproteasa de RecA desaparece y la proteína LexA reprime nuevamente los genes SOS (Fig 11) (Little y Mount, 1982).

La degradación de LexA permite la inducción de genes tales como los propios *lexA* y *recA* (reguladores del sistema); los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* que son responsables de la reparación por excisión; los genes *umuDC* responsables de ciertos mecanismos capaces de sintetizar ADN, aún en presencia de lesiones; los genes *sua* y *suB* que están involucrados en la inhibición de la división celular; y una variedad de genes *din* (damage inducible) cuyas funciones son desconocidas (Tabla I). La respuesta SOS aumenta por lo tanto la supervivencia celular al incrementar la capacidad de excisión (*uvrA*, *uvrB*, *uvrD*), recombinación (*recA*, *recN*, *recQ*, *uvrD*, *ruv*) y síntesis translesión (*umuD*, *recA*); así como al extender el tiempo disponible para la reparación del ADN por inhibición de la división celular (*sua* y *suB*) (Sancar y Sancar, 1988).

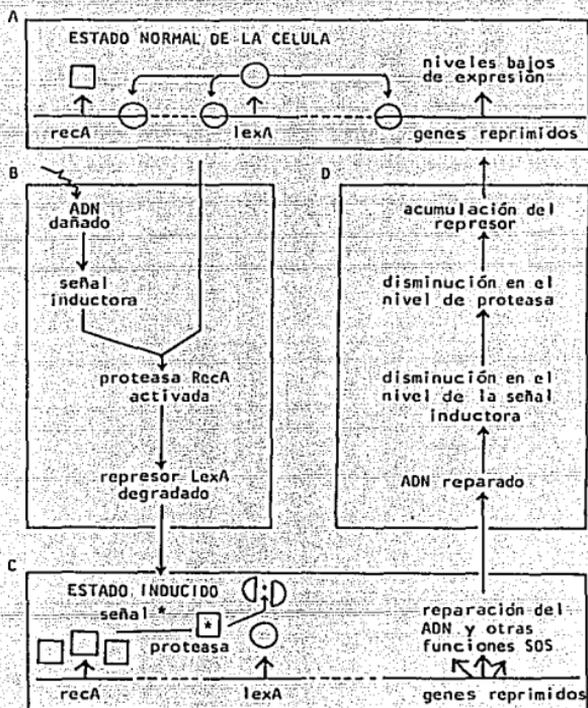


Fig 11. MODELO PARA EL SISTEMA REGULADOR SOS (LITTLE Y MOUNT, 1982)

A) estado del sistema en crecimiento exponencial de las células; B) transición al estado inducido; C) estado inducido; y D) transición al estado normal de crecimiento

Tabla I. Respuestas SOS y genes en *E. coli**

Gene(s) inducido(s)	Función del gene o respuesta fisiológica inducida
<i>dinA</i>	Inducción del locus <i>dinA</i> (polimerasa II, roles en reparación y/o mutagénesis)
<i>dinB</i>	Inducción del locus <i>dinB</i> (función desconocida)
<i>dinD</i>	Inducción del locus <i>dinD</i> (función desconocida)
<i>dinF</i>	Inducción del locus <i>dinF</i> (dentro del mismo operon como LexA)
<i>dnaA</i>	Interviene en la replicación del ADN
<i>himA</i>	Inducción de la proteína HimA (factor de integración del huésped; función en la recombinación de sitio específico)
<i>lexA</i>	Inducción de la proteína LexA (represor; SOS)
<i>recA</i>	Inducción de la proteína RecA (funciones en recombinación homóloga; estimula la degradación del represor LexA durante la inducción SOS; inhibición de la degradación del ADN por la exonucleasa V; radiorresistencia inducida)
<i>recA, recN</i>	Reparación de las rupturas dobles
<i>recN</i>	Recombinación dependiente de RecF
<i>ruvA, -B</i>	Inducción del locus <i>ruv</i> (resolución de los intermediarios de Holliday)
<i>sulA (sfiA)</i>	Filamentación (inhibición de la división celular)
<i>ssb</i>	Inducción de la proteína SSB
<i>umuDC, uvrA, -B y -C</i>	Reactivación Weigle del bacteriófago
<i>umuDC, recA</i>	Mutagénesis Weigle del bacteriófago
<i>umuDC, recA</i>	Mutagénesis UV del cromosoma bacteriano
<i>uvrA, -B y -C</i>	Reparación dependiente de UvrA · B · C
<i>uvrD</i>	Inducción de la proteína UvrD (helicasa II; funciones en la reparación por excisión)
?	Alivio de la restricción
?	Inducción de la replicación estable del ADN
?	Cese de la respiración

*[Modificación de Walker, 1987]

2.3 MECANISMOS DE RECOMBINACION Y SU RELACION CON LA REPARACION DEL ADN

2.3.1 Recombinación

La recombinación genética homóloga es un proceso por medio del cual se intercambian fragmentos de ADN homólogos, es decir, moléculas de ADN con grandes regiones cuyas secuencias de nucleótidos son similares. Aunque el mecanismo por el cual este fenómeno se lleva a cabo no está bien definido, el hecho de que al final se produce ADN con fragmentos provenientes de diferentes moléculas progenitoras indica que el proceso ocurre a través de ruptura y reunión de los cromosomas en dichas regiones de homología (Weinstock, 1987).

En general se asume que en *E. coli* la recombinación se inicia cuando un extremo libre 3'OH de una banda de ADN es transferida a una segunda molécula doble para formar una estructura entrecruzada, la cual es posteriormente convertida en un recombinante verdadero (Smith, 1988). Las discontinuidades o rupturas en alguna de las dos cadenas del ADN, facilitan la generación del extremo libre 3'OH que invade entonces la otra molécula de ADN para dar lugar a una región heteroduplex, en la que las dos cadenas del ADN provienen de diferentes moléculas (Fig 13) (Smith y col., 1981; Weinstock, 1987).

En *E. coli* es bien conocido el hecho de que la recombinación puede ocurrir entre diferentes tipos de moléculas de ADN (de banda simple o doble, lineal o circular, intacto o con cortes) lo cual sugiere la existencia en ella de diferentes alternativas o vías para llevar a cabo este proceso (Weinstock, 1987). Las diferentes vías de recombinación descritas hasta ahora en *E. coli* son la RecB que es la vía principal en una célula tipo silvestre y las RecF y RecE, que funcionan solo bajo ciertas condiciones (Clark, 1973; Thaler y col., 1989). Aunque estos diferentes sistemas pueden diferir en su modo de iniciación y resolución, todos dependen de la formación de un heteroduplex inicial, catalizado por la proteína RecA (Weinstock, 1987).

El producto del gene *recA*, la proteína RecA, es una enzima multifuncional (Radding, 1982) que promueve una variedad de interacciones, dependientes de ATP, entre las moléculas homólogas de ADN. Entre ellas se encuentran el alineamiento de dos cadenas complementarias; la formación de asas en D entre un ADN simple lineal y un ADN doble circular; la conversión de un ADN doble

lineal y de un ADN simple circular en un ADN simple lineal y un ADN doble circular; y la formación de una estructura cruciforme, conocida como intermediario de Holliday, en la que dos moléculas dobles de ADN se hallan entrecruzadas formando un complejo estable (Fig 12) (Smith, 1988). Todas estas reacciones indican que la proteína RecA es esencial en la recombinación genética y su importancia radica en su habilidad para promover la transferencia de bandas entre moléculas de ADN (Weinstock, 1987).

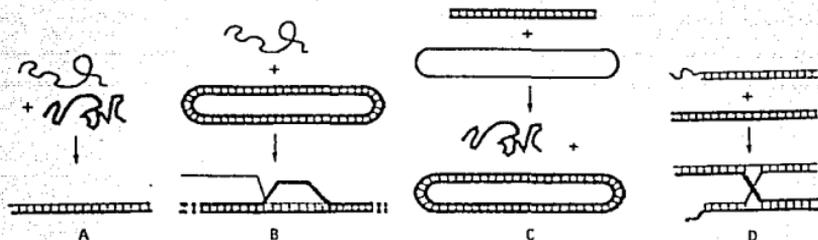


Fig 12. REACCIONES DEL ADN PROMOVIDAS POR RecA (SMITH, 1988)
 A) alineamiento, B) formación de las asas en D,
 C) conversión, y D) formación de la estructura
 cruciforme

In vitro, la proteína RecA se une al ADN de una banda para formar un filamento nucleoprotéico, el cual interactúa con la otra molécula de ADN doble intacta provocando la separación de sus cadenas complementarias. El filamento recorre la molécula hasta encontrar una secuencia homóloga de nucleótidos y forma entonces un segmento heteroduplex constituido por bandas provenientes de diferentes moléculas progenitoras (Stahl, 1987).

La cantidad de ADN simple disponible en una célula puede ser un factor clave en el control de la proteína RecA (Dri y Moreau, 1991) aunque hay evidencias de que también puede ser controlada por otras proteínas tales como

la SSB (Moreau, 1987). La proteína SSB (single-strand DNA-binding) tiene una gran afinidad por ADN de una banda y se une fuertemente a él en una forma cooperativa, con el fin de facilitar la función de la proteína RecA en la transferencia de bandas. Aunque el papel de esta proteína en el mecanismo molecular de la recombinación no está aún claro, el hecho de que las mutaciones en el gene *ssb* provocan una reducción en la capacidad de recombinación de una bacteria silvestre, indica que dicha proteína es necesaria para que el proceso se lleve a cabo eficientemente. Una posibilidad es que la SSB facilite la interacción de RecA con el ADN de una sola banda estabilizándolo e impidiendo que adquiera estructura secundaria (Flory y col., 1984; Muniyappa y col., 1984).

Además de las proteínas RecA y SSB, la recombinación genética y la reparación por recombinación del ADN dañado requieren de un gran número de otras proteínas entre las que se incluyen a los productos de los genes *recB*, *recC*, *recD*, *recE*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *recR*, *ruvA*, *ruvB* y *ruvC* así como otras enzimas asociadas indirectamente con el proceso en general, tales como: la ADN-polimerasa I que se requiere para llenar los huecos restantes después que el intercambio de bandas ha tenido lugar; la ADN-ligasa que sella los cortes en el ADN en los que los extremos 5'-PO₄ y 3'-OH están adyacentes; la ADN-girasa, que introduce superenrollamiento negativo en el ADN doble indispensable para que ocurra la transferencia de bandas; la ADN-topoisomerasa I que convierte el ADN superenrollado negativamente a un estado relajado; y la ADN-helicasa II que desenrolla el ADN doble empezando por un extremo o hueco (Smith, 1988; West, 1992).

2.3.2 Vía RecB

Los genes *recB*, *recC* y *recD* codifican las tres subunidades de la enzima RecBCD o Exonucleasa V (Telander-Muskavitch y Linn, 1981; Amundsen y col., 1986), la cual tiene una gran importancia no solo en la recombinación homóloga, sino también en la reparación del ADN dañado, el mantenimiento de la viabilidad celular y la destrucción de ADN extraño (Taylor, 1988). La enzima RecBCD posee varias actividades, que en una época o en otra se han tratado de correlacionar infructuosamente con algún paso particular de la recombinación genética; entre ellas destacan: a) exonucleasa de ADN simple y doble

dependiente de ATP; b) endonucleasa de ADN simple estimulada por ATP; y c) ADN-helicasa unidireccional. La enzima tiene también una actividad de endonucleasa específica, que corta el ADN en la secuencia 5'GCTGGTGG3' conocida como *chi*. El corte ocurre aproximadamente a 4-6 nucleótidos sobre el lado 3' de *chi* y tiene lugar cuando RecBCD recorre el ADN en la dirección 3'-5' desenrollando la doble hélice (West, 1992).

Por medio de su actividad exonucleolítica, RecBCD degrada moléculas lineales de ADN doble a partir de cualquiera de sus extremos y genera largas colas de hebra simple, las cuales pueden invadir una segunda molécula de ADN a través de la acción de RecA. El ADN doble circular es completamente resistente a la acción de la enzima RecBCD, a menos que tenga regiones de una banda de más de 7 nucleótidos (Karu y col., 1973; Mackay y Linn, 1974)

En su actividad desenrolladora, la enzima entra por un extremo libre del ADN y se desplaza entre las cadenas complementarias separándolas a medida que avanza y uniéndolas nuevamente detrás de ella. Sin embargo, la velocidad con la que las cadenas se reúnen es menor que la velocidad con la que se separan, de manera que a ambos lados de la enzima se forman asas de cadena simple. Cuando en su recorrido encuentra las llamadas secuencias *chi* corta el ADN formando largas colas con extremos libres 3', que podrían ser utilizadas para la iniciación del intercambio de bandas por la proteína RecA (Fig 13) (Stahl, 1987). De acuerdo con esto, la enzima RecBCD puede funcionar en una etapa temprana de la recombinación (Weinstock, 1987) al producir las estructuras iniciadoras del proceso. Otros modelos, sin embargo, proponen que RecBCD actúa en una etapa tardía en la recombinación, resolviendo los intermediarios o estructuras de Holliday para dar lugar a los productos recombinantes. Estos modelos se basan en el hecho de que la enzima puede resolver estructuras cruciformes sintéticas que recuerdan a los intermediarios de Holliday (Taylor y Smith, 1990) y a que una mutación en el gen *ruvC*, que codifica una proteína con actividad de "resolvasa", solo afecta la recombinación en una bacteria que ya posee una enzima RecBCD deficiente (Iwasaki y col., 1991; Sharples y Lloyd, 1991).

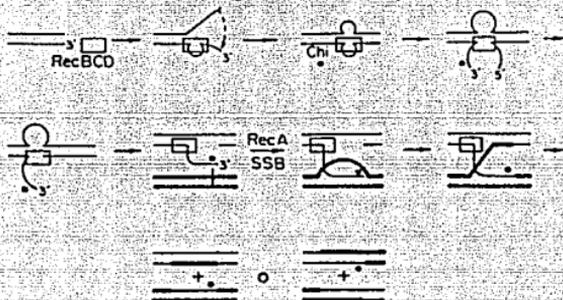


Fig 13. SISTEMA DE RECOMBINACION POR RecBCD (SHITH Y COL., 1981)

La recombinación del bacteriófago lambda a través de la vía RecBCD de *E. coli* se inicia de una manera similar a como ocurre en el cromosoma bacteriano, cuando la enzima RecBCD entra por el extremo derecho del cromosoma lineal de λ (Stahl y col., 1986), originado a partir de un cromosoma circular por actividad de la Terminasa, enzima que permanece unida al extremo izquierdo del cromosoma (Kobayashi y col., 1984). Al igual que en la recombinación en *E. coli*, la enzima RecBCD viaja entonces hacia la izquierda a través de la molécula de ADN doble de lambda y cataliza la recombinación con una probabilidad baja hasta que encuentra una secuencia *chi* apropiadamente orientada (5'GCTGGTGG3') (Stahl y col., 1990), ya que la enzima solo reconoce *chi* si lo encuentra del lado 3' (Fig 14). Ahora bien, si por medio de manipulación genética se invierte la secuencia *cos* en el cromosoma de λ , RecBCD viaja entonces hacia la derecha y reconoce solamente un *chi* invertido (3'GGTGGTCG5') (Stahl, 1987).

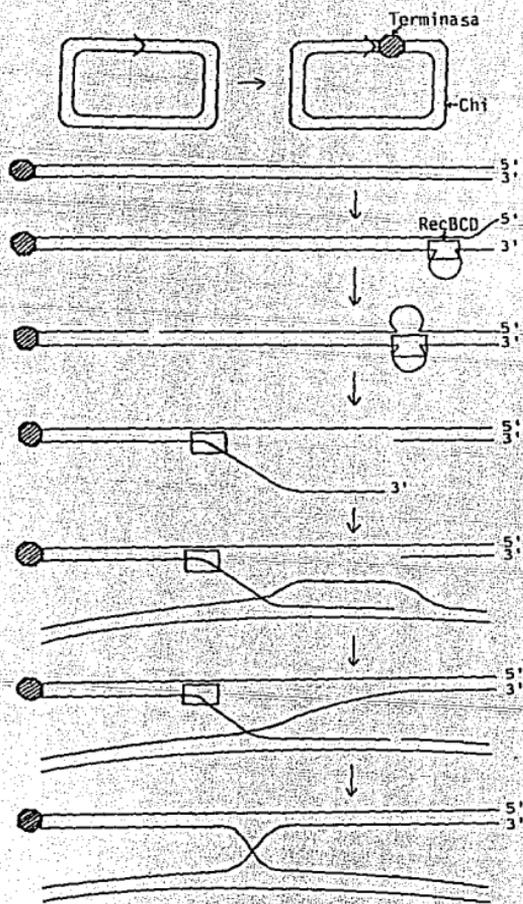


Fig 14. RECOMBINACION DEL CROMOSOMA DE LAMBDA POR RecBCD. (STAHL, 1987)

Una vez que RecBCD reconoce el sitio *chi*, introduce un corte en el lado 3' de la secuencia (Ponticelli y col., 1985) y si la enzima continúa desarrollando la molécula doble de ADN, se produce entonces una cola de ADN simple que se extiende hacia la izquierda de *chi* y es capaz de invadir un ADN doble homólogo en una reacción de apareamiento promovida por las proteínas RecA y SSB, dando lugar a la formación de una asa en D por desplazamiento de una de las cadenas de la molécula receptora (Cox y Lehman, 1987). La introducción de una incisión en el asa, seguida por la sinapsis de la banda desplazada con el hueco en el primer ADN, produce una estructura simétrica, la unión de Holliday, cuya resolución es efectuada por medio de rupturas endonucleolíticas llevadas a cabo tal vez por la misma enzima RecBCD. La resolución del intermediario de Holliday puede ocurrir en dos sentidos. En el sentido "vertical", el proceso resulta en la formación de verdaderos recombinantes, es decir en moléculas con intercambios de doble banda; y en el sentido "horizontal", da lugar a moléculas de tipo progenitor con solo pequeños parches heteroduplex (Fig 15) (West, 1992).

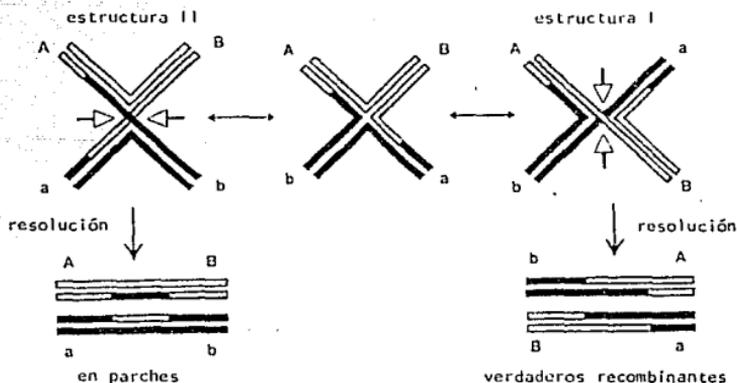


Fig 15. RESOLUCION DE LOS INTERMEDIARIOS DE HOLLIDAY DE ACUERDO CON EL MODELO PROPUESTO POR HOLLIDAY (WEST, 1992)

La estimulación de la recombinación provocada por las secuencias *chi* es más alta en la vecindad inmediata del sitio *chi* y disminuye con la distancia hacia ambos lados, pero mientras que del lado izquierdo la recombinación se reduce a la mitad cada 3.2 kilobases, del lado derecho no se detecta más allá de 431 pares de bases (pb) (Cheng y Smith, 1989). En el cromosoma de *E. coli* los sitios *chi* están presentes con una frecuencia de aproximadamente uno por cada 5000 pb, debido a lo cual la tasa de recombinación es casi uniforme a lo largo del cromosoma entero (Weinstock, 1987); en cambio el fago λ no contiene normalmente sitios *chi* verdaderos aunque sí posee sitios pseudochi que difieren ligeramente de la secuencia normal pero que muestran una actividad recombinante significativa. Por ejemplo la secuencia 5'GCTAGTGG3' que tiene una adenina en lugar de guanina en el cuarto lugar, posee alrededor del 38% de la actividad *chi* total (Cheng y Smith, 1984).

El modelo anterior sobre la recombinación homóloga en lambda mediada por la vía RecB presenta ciertas dificultades que han llevado a proponer otros modelos en los que la enzima RecBCD tiene un papel diferente al de la iniciación descrito aquí. Uno de tales modelos, propuesto por Rosenberg (1988), sugiere que la enzima RecBCD participa en la etapa final del proceso de recombinación, es decir en la resolución de los intermediarios de Holliday y que las estructuras necesarias para la iniciación se originan en otros procesos tales como la replicación y/o la transcripción del ADN.

2.3.3 Vía RecF

Los mutantes *recB* o *recC* de *E. coli* son deficientes en recombinación general, pero esta deficiencia puede ser parcialmente restaurada por mutaciones en los genes *sbcA* y *sbcB* (Clark, 1973). Una mutación en *sbcB* inactiva la exonucleasa I, provocando la activación de un sistema diferente de recombinación, la vía RecF (Clark y col., 1984), que requiere los productos de los genes *recF*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ* y *ruv*. Dos de estos genes (*recN* y *recQ*) son regulados por LexA, lo cual implica que la vía RecF como un todo es inducida junto con la respuesta SOS a los daños en el ADN (Madiraju y col., 1988).

El papel del producto del gen *recF* en la recombinación, del cual se deriva el nombre de la vía completa, no se conoce aún (Smith, 1988). Sin embargo, se ha observado que la proteína RecF se une a ADN de una sola banda con extremos libres, de modo que podría facilitar la transferencia de bandas o protegerlas contra degradación exonucleolítica. Diferentes estudios sugieren que la proteína RecF podría modular la interacción de las proteínas SSB y/o RecA con el ADN (Griffin y Kolodner, 1990). Resultados obtenidos en una proteína RecA mutante llamada *srf803*, la cual suprime los defectos en recombinación provocados por mutaciones *recF*, permiten sugerir que la proteína RecF podría coadyuvar a la reacción de transferencia de bandas efectuada por RecA, desplazando la proteína SSB del ADN de una banda o impidiendo que este último adquiriera estructura secundaria que pudiera obstaculizar su interacción con RecA (Madiraju y col., 1988).

La recombinación a través de la vía RecF podría iniciarse con el desenvolvimiento del ADN, llevado a cabo por la proteína RecQ y con la creación de un extremo libre 3'OH por medio de la actividad exonucleolítica 5'-3' de la enzima RecJ (Umezú y col., 1990). Sin embargo, el papel de los genes *recG*, *recN*, *recO* y *recR* es todavía obscuro, aunque podría conocerse pronto una vez que los productos de esos genes sean purificados y analizados bioquímicamente.

Los genes restantes de la vía RecF son *ruvA*, *B* y *C* (Sharples y col., 1990) de los cuales, los dos primeros son también regulados por LexA (Shinagawa y col., 1988). El primero codifica la proteína RuvA que se une al ADN doble y simple, especialmente en moléculas que contienen uniones Holliday (Shinagawa y col., 1991) y el segundo codifica la proteína RuvB que es una ATPasa que interactúa con RuvA (Iwasaki y col., 1989). El gen *ruvC* codifica una nucleasa que actúa específicamente en la resolución de los intermediarios de Holliday (Connolly y col., 1991) pero como ya dijimos antes, solo tiene importancia cuando la enzima RecBCD es deficiente.

2.3.4 Vía RecE

Mientras que, como ya vimos, las mutaciones en el gene *sbcB* activan la vía RecF de recombinación, las mutaciones en *sbcA* activan la vía RecE (Clark y col., 1984) al permitir que la exonucleasa VIII, producto del gene *recE* se

expresión (Weinstock, 1987). Esta enzima digiere una de las cadenas de una molécula de ADN doble, a partir del extremo 5', liberando mononucleótidos 5' y generando largas cadenas simples con extremos 3'OH libres o unidas a ADN doble (Joseph y Kolodner, 1983). De esta manera, análogamente a la enzima RecBCD, la Exo VIII produce extremos libres 3'OH, pero mientras que esta lo hace solo por degradación exonucleolítica, aquella lo puede hacer también por desenrollamiento del ADN (Smith, 1988).

Las cepas de *E. coli* en las que es posible activar la vía RecE son aquellas que contienen un prófago críptico llamado *rac* el cual tiene cierta homología con *lambda* y comparte con él algunas similitudes en su organización genética. Las mutaciones *sbcA* inactivan el represor del prófago *rac* y permiten la expresión de algunos de sus genes tales como *recE*, pero a diferencia de *lambda* la inactivación del represor no da lugar al desarrollo lítico del fago.

2.3.5 Sistema Red

El bacteriófago *lambda* puede llevar a cabo la recombinación no solo a través de las tres vías descritas arriba, sino que también puede llevarla a cabo a través de su propio sistema de recombinación (Smith, 1987; Clark y Low, 1988). Este sistema, llamado Red, está constituido por tres genes: *alfa*, *beta* y *gamma* (Weinstock, 1987), cuyos productos son la exonucleasa λ , la proteína β y la proteína Gam respectivamente (Smith, 1983). La exonucleasa de λ es funcionalmente análoga a la exonucleasa VIII ya que digiere ADN doble a partir del extremo 5' y genera largas colas de ADN de una banda con extremos 3'OH (Weinstock, 1987). La proteína β , promueve por un lado la reacción de transferencia de bandas de ADN, análogamente a como lo hace RecA, y por otro incrementa la afinidad de la exonucleasa α por el ADN (Fig 16) (Radding y col., 1971; Kmiec y Holloman, 1981). El tercer gene, asociado de alguna manera con la recombinación de λ , es el gene γ (Zissler y col., 1971) cuyo producto, la proteína Gam, se une a la enzima RecBCD e inhibe su actividad exonucleolítica por medio de la cual digiere los cromosomas lineales de *lambda*, producto de la replicación sigma (Enquist y Skalka, 1973). Estudios en cepas de *E. coli*

sobreproductoras de proteína Gam han demostrado que esta proteína es capaz de inhibir no solo la actividad exonucleolítica de RecBCD, sino que también todas las demás actividades de la enzima (Murphy, 1991).

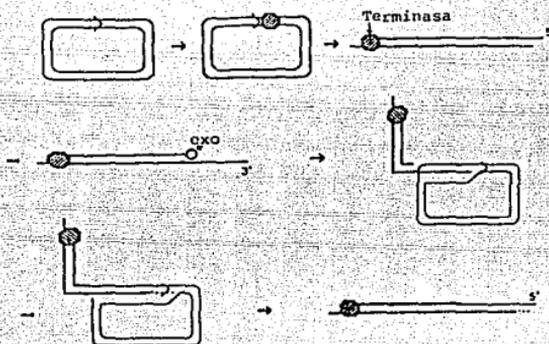


Fig 16. MODELO DE RECOMBINACION DE LAMBDA (STAHL Y COL., 1985)
La Terminasa genera un cromosoma lineal después de cortar en *cos*, la exonucleasa digiere la cadena 5' del cromosoma circular homólogo. Apropiadas muescas, ligaduras y síntesis de ADN conducen a la formación de un cromosoma recombinante listo para ser empaquetado

2.3.6 Recombinación como Sistema de Reparación

En general se acepta que la función más importante de la recombinación genética homóloga es su contribución a la diversificación genética de los organismos. Sin embargo, algunos investigadores opinan que existe otra función tanto o más importante que esa, a la cual puede deberse que este proceso se haya conservado durante miles de millones de años a lo largo de la historia evolutiva. Esa función es la que tiene que ver con la reparación de lesiones en el ADN que afectan la supervivencia celular y que tienen su origen en la exposición natural o artificial a agentes físicos y químicos del ambiente, que dañan el ADN (Cox, 1991).

Una de las primeras evidencias genéticas acerca de la importancia de la recombinación como sistema de reparación, fue derivada de estudios de supervivencia a radiación UV de cepas deficientes en recombinación (*recA*, *recB*, *recC*, etc.) (Howard-Flanders y Boyce, 1966). La sensibilidad de tales cepas a este tipo de radiación es mayor que la de cepas tipo silvestre, lo cual implica que el proceso de la recombinación tiene una gran importancia, comparable a la de los sistemas de reparación, en la supervivencia de células de *E. coli* dañadas por UV (Paterson y Gentner, 1984). En realidad, la recombinación puede ser incluso más importante que la reparación por excisión, por ejemplo ya que los mutantes *recA* deficientes en recombinación son más sensibles que los mutantes *uvrA* deficientes en excisión.

En *E. coli*, varias evidencias sugieren que uno de los pasos que limita la tasa de recombinación genética, es la producción de substratos adecuados para las enzimas que participan en ella, tales como ADN con extremos dobles que sirven de entrada para RecBCD o bandas de ADN simple sobre las cuales actúa RecA. La presencia de lesiones en el ADN ocasionadas de una manera natural o experimental (luz UV solar, daño oxidativo, desaminación de la citosina, pérdida de bases, etc.) pueden aumentar la formación de estos substratos y dar por resultado una estimulación de la recombinación. En este sentido, la función principal de la migración de brazos, es decir, el desplazamiento del punto de entrecruzamiento (mecanismo principal de formación de grandes regiones heteroduplex) y la hidrólisis de ATP, que representa un gran costo energético para la célula, sería la de atravesar regiones dañadas o no homólogas en el ADN, con el fin de reconstituir moléculas funcionales.

De esta manera el papel principal de la recombinación sería el de aumentar la supervivencia celular al recuperar la información genética en regiones del ADN que contienen lesiones en ambas bandas, dando lugar a moléculas que pueden ser entonces sujetas a reparación por otros mecanismos tales como excisión o fotorreactivación (Sancar y Sancar, 1988).

2.4 RECOMBINOGENESIS INDIRECTA DEL BACTERIOFAGO LAMBDA

En estudios previos (Alcántara, 1986ab), se ha observado que la tasa de recombinación del bacteriófago λ en células de *E. coli* tipo silvestre (AB1157), es

estimulada cuando las bacterias son expuestas a la luz UV antes de la infección viral. Esta estimulación, a la que se ha denominado recombinogénesis indirecta del bacteriófago lambda, se caracteriza por un incremento tanto en el número de recombinantes por célula como en el número de células en las que ocurren eventos de recombinación.

Al coincidir este efecto con la inducción de las funciones SOS bacterianas, inicialmente se sugirió que podría deberse a la activación de alguna de ellas relacionada con la recombinación genética inducible, dependiente de la vía RecF. Para verificarlo se hicieron experimentos en bacterias huéspedes mutantes *lexA3*, deficientes en la inducción de SOS y el fenómeno no se presentó. Sin embargo, cuando se agrega la mutación *recA306*, que provoca la también la desaparición de la respuesta SOS, a cepas tipo silvestre o a los mismos mutantes *lexA3*, el efecto ocurre normalmente (Alcántara, 1986b).

Otras evidencias que de alguna manera también contradicen una relación entre el sistema SOS y la recombinogénesis indirecta de λ , provienen de experimentos en los que se midió la influencia del plásmido pMMB175. Este plásmido posee un gene llamado *psiB* (Plásmid SOS /inhibitor) cuyo producto, la proteína PsiB, suprime la respuesta SOS al inhibir la activación como coproteasa de la proteína RecA. Los resultados mostraron que la presencia de este plásmido en células tipo silvestre (AB1157) no tiene ningún efecto sobre la recombinogénesis indirecta de λ (Alcántara, datos no publicados).

Con el fin de obtener algunos indicios sobre el mecanismo molecular y enzimático del proceso de la recombinogénesis indirecta de lambda, se ha probado la participación de varios genes bacterianos, por medio de la utilización de huéspedes mutantes. Entre los genes probados se encuentran *recF*, *recN* y *ruvA* y se ha observado que ninguno de ellos se requiere para que el fenómeno tenga lugar (Alcántara, 1987). La regulación de *recN* y *ruvA* por *lexA* confiere a la vía RecF de recombinación, a la cual pertenecen, cierto carácter inducible, que permite a la célula llevar a cabo la reparación por recombinación más eficientemente. El hecho de que la recombinogénesis indirecta de lambda no requiere los productos de esos genes, hace aún menos probable una relación directa entre ella y el sistema SOS.

Con el fin de determinar si el sistema de recombinación de lambda (Red) interviene en la estimulación de la recombinación viral, se efectuaron también experimentos con bacteriófagos mutantes red deficientes en su propio sistema de recombinación. Los datos de esos experimentos indican que el sistema Red tiene una participación importante en el evento, ya que en lambda red⁻ esta ausente. Es probable por lo tanto, que el fenómeno de la recombinogénesis indirecta de lambda sea el resultado de algún tipo de interacción entre el sistema Red viral y alguna o algunas enzimas bacterianas (Alcántara, 1986a).

Puesto que la recombinogénesis indirecta del bacteriófago lambda ocurre en bacterias huéspedes previamente expuestas a UV, el fenómeno debe depender en gran parte de lo que ocurre en ellas después de la irradiación. Las evidencias reunidas hasta ahora muestran que no corresponde a una función SOS típica, porque, si bien es dependiente de un represor LexA normal no lo es de RecA funcional; es más, la presencia de la proteína RecA en mutantes *lexA* (ind⁻) es claramente adversa para la inducción del fenómeno. Datos obtenidos en mutantes *lexA3* (ind⁻) portadores del gene *psiB* (Alcántara, datos no publicados), permiten sugerir que es la actividad de recombinasa de RecA la que impide la respuesta recombinogénica de λ , ya que en ellos la actividad proteolítica de RecA es la única que esta afectada.

Como vemos, la relación entre el sistema SOS de *E. coli* y la recombinogénesis indirecta de λ ha sido difícil de establecer, debido a que esta última no se comporta como las funciones SOS típicas cuya inducción es suprimida tanto por mutaciones *lexA* (ind⁻) como por mutaciones *recA*; es posible incluso, que tal relación no exista en realidad y que la ausencia de efecto en huéspedes *lexA3* sea solo un artificio creado por una menor capacidad de los fagos para multiplicarse o recombinarse en ellos. No obstante lo anterior, la forma en que la inducción de lesiones en el ADN de *E. coli* incrementa la tasa de recombinación en otro ADN no dañado y no homólogo como el genoma de λ , es un asunto de gran interés por investigar.

Resultados previos, obtenidos en *E. coli* SP216 *recB21 recN*, habían sugerido ya la participación en este fenómeno de la enzima RecBCD, pero debido a que dicha enzima es supuestamente inhibida por la proteína Gam de λ , esos resultados fueron equivocadamente atribuidos a la mutación *recN*. Cuando se construyó por transducción con el fago P1 la cepa AB1157 *recN*, fue que se empezó a pensar

que la enzima RecBCD tenía una participación importante en la recombinogénesis indirecta del bacteriófago lambda, ya que en esa cepa, portadora únicamente de la mutación *recN*, el fenómeno si se presenta (Alcántara, comunicación personal)

3 OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es establecer si la enzima RecBCD participa en la recombinogénesis indirecta de lambda, utilizando para ello diversos huéspedes de *E. coli* deficientes en dicha enzima.

4 MATERIAL Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Bacterias y virus

Las cepas bacterianas y virales utilizadas en este trabajo aparecen en la tabla II.

Tabla II: Cepas Bacterianas y Bacteriófagos

Cepas Bacterianas	Genotipo	Fenotipo
AB1157	<i>F, thr-1, leuB6, thi-1, galK2, proA2, argE3, rpsL31, tsx-33, supE44, his-4, lacY1, mtl-1, xyl-5, ara-14</i>	Tipo silvestre. Presencia de todos los sistemas de reparación.
AB2463	como AB1157 pero <i>recA13</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la proteína RecA.
AB2470	como AB1157 pero <i>recB21</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la enzima RecBCD.
AQ5931	<i>F, recB21, zga::Tn10, argH, iiv, metB, his29, trpA9605, deoB ó C, proB, rpoB</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la enzima RecBCD.
AQ5937	<i>F, recA441, lexA71::Tn5, recB21, zga::Tn10, thr1, leuB6, fgpI, proA162, his4, argE3, thi1, rpsL31, ara14, sulA221, galK2, xyl5, mtl1, tsx33, supE44, iiv(Ts)</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la enzima RecBCD.

Tabla II: Cepas Bacterianas y Bacteriófagos.
(Continuación).

Cepas Bacterianas	Genotipo	Fenotipo
AB11571	como AB1157 pero <i>recB21</i> , <i>zga::Tn10</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la enzima RecBCD.
AB11572	como AB1157 pero <i>recB21</i> , <i>zga::Tn10</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la enzima RecBCD.
AB24631	como AB2463 pero <i>recB21</i> , <i>zga::Tn10</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la proteína RecA y de la enzima RecBCD.
AB24632	como AB2463 pero <i>recB21</i> , <i>zga::Tn10</i>	Deficiente en recombinación, carece de todas las actividades de la proteína RecA y de la enzima RecBCD.
C600	<i>F. thi-1, leuB6, thi-1, lacY1,</i> <i>tonA21, supE44</i>	Supresora de las mutaciones ámbar del bacteriófago lambda, indicadora de la progenie total de lambda.
594	<i>F. lac-3350, galK2, galT22,</i> <i>rpsL179, sup*</i>	No supresora de las mutaciones ámbar del bacteriófago lambda, indicadora de la progenie recombinante de lambda.
Bacteriófagos	Característica	
λNam53Nam7	portador de mutaciones ámbar en el gene <i>N</i> , no se multiplica en bacterias no supresoras.	
λPam80	portador de una mutación ámbar en el gene <i>P</i> , no se multiplica en bacterias no supresoras.	

4.1.2 Medios de cultivo:

Medios Sólidos	Componentes	Cantidad
TA12*	Peptona biotriptasa BIOXON	10.0 g
	NaCl BAKER	2.5 g
	Agar bacteriológico BIOXON	12.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml
TA5*	Peptona biotriptasa BIOXON	0.0 g
	NaCl BAKER	2.5 g
	Agar bacteriológico BIOXON	6.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml

Después de esterilizar es suplementado con $MgSO_4$ $10^{-2}M$, maltosa 0.03% y TLB $10^{-2}M$

Luria agar (LA)*	Peptona biotriptasa BIOXON	10.0 g
	Extracto de levadura DIFCO	5.0 g
	NaCl BAKER	10.0 g
	Agar bacteriológico BIOXON	12.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml

R-top-agar*	Peptona biotriptasa BIOXON	10.0 g
	NaCl BAKER	8.0 g
	Extracto de levadura DIFCO	1.0 g
	Agar bacteriológico BIOXON	8.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml

Después de esterilizar es suplementado con 2ml de $CaCl_2$ $1M$ y 5ml de glucosa al 20%

Medios Líquidos	Componentes	Cantidad
Luria (LB)*	Peptona biotriptasa BIOXON	10.0 g
	Extracto de levadura DIFCO	5.0 g
	NaCl BAKER	10.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml

MC	MgSO ₄ 1M	1.0 ml
	CaCl ₂ 1M	0.05 ml
	Agua bidestilada*	9.0 ml
SM*	NaCl BAKER	5.85 g
	Gelatina DIFCO	0.5 g
	Agua bidestilada	480 ml
Después de esterilizar es suplementado con 5ml de TRIS 1M pH 7.4 y 2ml de MgSO ₄ 1M.		
TB1*	Peptona biotriptasa BIOXON	10.0 g
	NaCl BAKER	5.0 g
	Tiamina	1.0 mg
	Agua bidestilada	1000 ml
TBD	TB1	100 ml
	MgSO ₄ 1M	1 ml
	Maltosa 30%	1 ml
	TLB	1 ml
TLB	L-treotina	1.0 g
	L-leucina	1.0 g
	Tiamina	0.1 g
	Agua bidestilada	100 ml
CaCl ₂ 1M*	CaCl ₂ BAKER	111.0 g
	Agua bidestilada	1000 ml
Maltosa 30%*	Maltosa BIOXON	30.0 g
	Agua bidestilada	100 ml
MgSO ₄ 1M*	MgSO ₄ .7H ₂ O BAKER	246.48 g
	Agua bidestilada	1000 ml
TRIS 1M	Trishidroximetilamino metano	
	pH 7.4 SIGMA	121 g
	Agua bidestilada	1000 ml

*Se esterilizan en autoclave 20 min. a 120°C con 20 libras de presión.

4.2 METODOLOGIA

Los métodos experimentales se desarrollaron en diferentes etapas según su aplicación y de acuerdo a las técnicas usuales descritas por Arber y col. (1983)

4.2.1 Preparación de Stocks de Fagos λ

Inducción del prófago λ Nam7Nam53 y λ Pam80 en bacterias de *E. coli* C600 por tratamiento con luz UV.

Mediante esta metodología fue posible inducir el crecimiento lítico de los prófagos en las bacterias lisogénicas para obtener suspensiones de partículas virales que posteriormente se utilizaron para hacer las cruzas.

Las bacterias lisógenas de λ se tomaron de un cultivo estacionario en TB1, se diluyeron 50 veces en 10 ml del mismo medio y se dejaron en incubación a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 590 nm, la cual equivale a una concentración de aproximadamente 1×10^8 bacterias/ml. Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en la misma cantidad de $MgSO_4$ $10^{-2}M$. La suspensión se colocó en una caja de petri y se irradió con luz UV durante 70 segundos (equivalente a una dosis de 70 J/m^2), se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos, el botón se resuspendió en 10 ml de TB1 y se incubó hasta observar lisis celular (3 horas aproximadamente). Se agregaron 6 gotas de cloroformo para destruir totalmente las células y el lisado se incubó 10 minutos más. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se guardó a 4°C para su titulación posterior.

Inducción del prófago λ en bacterias lisógenas C600 por tratamiento con Mitomicina C

El procedimiento es similar al anterior excepto que en lugar de irradiar con luz UV se agregó mitomicina C (Sigma) a una concentración de 4 mg/ml y se incubó aproximadamente durante 3 horas. De la misma manera, una vez que se observó la lisis, se agregó el cloroformo, se centrifugó y el sobrenadante se guardó a 4°C.

Infección de *E. coli* con los fagos λ Nam7Nam53 y λ Pam80

Este procedimiento nos permitió obtener suspensiones de fagos con concentraciones mayores de 1×10^{10} fagos/ml adecuadas para los experimentos posteriores.

Se tomaron 0.6 ml de un cultivo estacionario de C600 incubado en LB y se mezclaron con 10^9 partículas del fago que se quería propagar. Se adsorbieron durante 15 minutos a 37°C y los centros infecciosos o células infectadas se vaciaron en matraces con 10 ml de LB más 0.01M de CaCl_2 . En seguida se incubaron a 37°C con agitación hasta observar lisis celular, la cual se completó al agregar algunas gotas de cloroformo y se dejó en agitación a 37°C durante 10 minutos. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se guardó a 4°C para su titulación posterior.

4.2.2 Titulación de los Fagos

Para conocer la concentración de las suspensiones virales se procedió a su titulación utilizando como bacteria indicadora la cepa C600, la cual suprime las mutaciones ámbar del fago λ .

Se prepararon diluciones de las suspensiones de fagos en solución SM, las cuales pueden hacerse de 10 en 10, de 100 en 100 o combinaciones de ambas hasta llegar a 10^{-9} ó 10^{-7} , es decir diluidas 1 millón de veces ó 10 millones de veces. De la dilución seleccionada se mezcló 0.1 ml con 0.2 ml de la bacteria indicadora (cultivo estacionario en TBD sembrado el día anterior e incubado a 37°C con agitación) y se dejó en adsorción a 37°C durante 15 minutos. Se agregaron de 2 a 2.5 ml de TA5 fundido, se agitó ligeramente, se vació en cajas con TA12 y se esparció rápidamente el contenido en toda la caja. Se incubaron a 37°C 24 horas y entonces se procedió a la cuantificación de placas de lisis que el fago forma en el tapiz de la bacteria indicadora. Al Tomar en cuenta que cada placa es formada a partir de una bacteria infectada con un sólo fago y al hacer los cálculos necesarios se pudo conocer el número de fagos por unidad de volumen.

El mismo procedimiento se siguió para la titulación de suspensiones del fago P1 utilizado en las transducciones pero substituyendo el TA5 por R-top agar y el TA12 por LA.

4.2.3 Titulación de las Bacterias

Para las cruces de lambda en las diferentes cepas bacterianas fue importante conocer la cantidad precisa de células que teníamos en los cultivos, con el fin de que la infección con el fago fuera con la multiplicidad adecuada. Sabemos que en nuestras condiciones una Densidad Óptica (D O) de 0.4 a 590 nm equivale aproximadamente a 1×10^8 bacterias/ml, pero con el fin de verificarlo se hicieron conteos de las bacterias a través del microscopio de contraste de fases, utilizando la cámara Petroff-Hausser. Para ello se contaron las bacterias que hay en 5 cuadros grandes (los cuales están formados por 16 cuadros pequeños) de la retícula de la cámara y el número de bacterias por mililitro se obtuvo haciendo los cálculos necesarios de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. células}}{\text{ml}} = \left(\frac{A}{B}\right) \cdot 20 \cdot 20 \cdot 50 \cdot 1000$$

Donde:

A = células contadas

B = número de cuadros grandes contados

16 = número de cuadros pequeños dentro de un cuadro grande

20 = lado del cuadro (1/20 mm)

50 = profundidad de la cámara (1/50 mm)

1000 = volumen en cada cuadro (1/1000 ml)

4.2.4 Transducción

Es un proceso por medio del cual se puede transferir información genética de una bacteria a otra a través de un bacteriófago. En el caso de *E. coli* la transducción es llevada a cabo por el fago P1, el cual puede acarrear fragmentos cromosómicos de hasta 2 minutos de longitud de una célula donadora a una célula receptora en virtud de que al final del ciclo lítico del mismo, algunas de las nuevas partículas virales producidas contienen ADN de la bacteria huésped en lugar del suyo propio (Miller, 1972).

El fago P1 defectivo que lleva ADN de *E. coli* puede ser detectado por medio de marcadores genéticos seleccionables, los cuales son mutaciones que afectan un gen determinado o secuencias de inserción que confieren resistencia a

antibióticos. En nuestro caso, los transductantes se seleccionaron por la presencia del transposón Tn10 que es una secuencia de inserción y que confiere resistencia a la tetraciclina. Las partículas transductoras infectan a otras bacterias y su ADN puede llegar a incorporarse en el cromosoma bacteriano a través de un proceso de recombinación homóloga dependiente enteramente de la célula receptora.

Por medio de este procedimiento se llevó a cabo la construcción de algunas cepas con genotipos específicos siguiendo la metodología descrita por Miller (1972), la cual puede dividirse en dos etapas:

1.- Preparación del lisado de P1

Una colonia de la cepa donadora se sembró en 3 ml de LB conteniendo tetraciclina (Sigma) a una concentración de 30 mg/ml y se dejó en incubación a 37°C con agitación durante 20 hrs. Un mililitro de este cultivo de noche se mezcló con 10⁹ fagos P1 y se incubó 15 min a 37°C para permitir la adsorción de los mismos. En seguida se vació en un matríz que contenía 10 ml de LB más 5 x 10⁻³ M de CaCl₂ y se incubó a 37°C con agitación hasta observar la lisis celular (aproximadamente 3 horas). Se le agregaron 6 gotas de cloroformo y se dejó en agitación otros 10 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos con el fin de eliminar los restos celulares y el sobrenadante se recuperó y se guardó en tubos estériles a 4°C.

2.- Construcción de los transductantes

Una vez obtenidos los lisados de P1 en las cepas donadoras, se procedió a la construcción de las diversas cepas receptoras usadas en este estudio. Para ello se hizo un cultivo de noche de la cepa receptora en 5 ml de LB, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en la misma cantidad de solución buffer MC, que se dejó en agitación a 37°C durante 15 minutos. Por otro lado se hicieron diluciones 10⁻¹ y 10⁻² del lisado del fago P1 crecido en la cepa donadora y se prepararon los siguientes tubos:

No. de tubo	lisado de P1 crecido en la cepa donadora	cepa receptora en buffer MC
1-3	0.1 ml de 10^0	0.1 ml
4-6	0.1 ml de 10^{-1}	0.1 ml
7-9	0.1 ml de 10^{-2}	0.1 ml
10	0.1 ml de 10^0	-----
11	-----	0.1 ml

Se dejaron en adsorción durante 15 minutos a 37°C para posteriormente sembrar 0.1 ml de cada dilución en placas de LA con tetraciclina. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas, al cabo de las cuales aparecieron colonias resistentes a tetraciclina que correspondían a los transductantes. Esas colonias fueron aisladas y conservadas para su uso posterior.

4.2.5 Irradiación con Luz Ultravioleta

Para hacer las irradiaciones con luz UV se utilizó una lámpara germicida General Electric de 15W, cuya razón de dosis fue ajustada a 10 erg/seg (1 J/m^2) con un dosímetro UV Latarjet.

La sensibilidad a la luz UV de las diferentes cepas bacterianas usadas en este estudio varía de acuerdo a las mutaciones que presentan cada una de ellas, debido a que esas mutaciones afectan diferentes sistemas de reparación del ADN.

Para determinar su sensibilidad se siguieron dos métodos: uno cualitativo y otro cuantitativo.

a) Método Cualitativo

Para este método se hicieron cultivos de noche de las cepas a probar y con el asa de siembra estéril se tomó una muestra de cada cultivo, con la cual se estrió una línea recta sobre la superficie de una caja de petri con TA12. La caja se dividió en 4 secciones perpendiculares a las estrias de las bacterias, las cuales correspondieron a diferentes dosis de irradiación UV. Bajo la lámpara de UV cada sección de la caja se fue descubriendo sucesivamente hasta completar las dosis especificadas, excepto la última sección que no se irradió y representó

por lo tanto nuestro control de crecimiento. La caja se incubó en oscuridad durante 24 horas a 37°C y se compararon los grados de crecimiento de cada cepa (Fig 17).

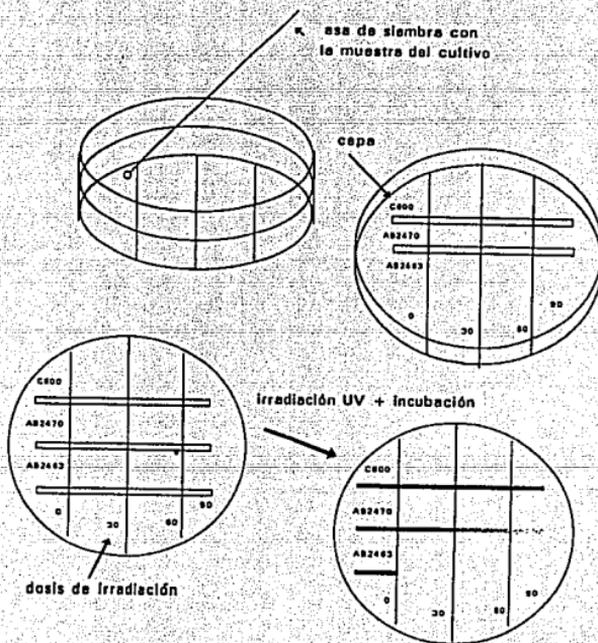


Fig 17. PRUEBA CUALITATIVA DE LA SENSIBILIDAD A LUZ UV

b) Método Cuantitativo

La determinación cuantitativa de la sensibilidad a UV se hizo en cultivos logarítmicos de las cepas bacterianas, hechos en LB, los cuales se centrifugaron y se resuspendieron en $MgSO_4$ $10^{-2}M$. Muestras de 1.5 ml de estas suspensiones se colocaron en cajas de petri de 5 cms. de diámetro y se irradiaron con UV a las dosis especificadas. Durante la irradiación, las suspensiones se agitaron suavemente a fin de lograr una exposición uniforme de todas las células y todas las manipulaciones subsiguientes se hicieron bajo luz roja tenue para evitar la fotorreactivación.

Una vez irradiadas las suspensiones se diluyeron en $MgSO_4$ 0.01M de acuerdo a la dosis administrada, por ejemplo:

CEPA	DOSIS (J/m ²)	DILUCION A SEMBRAR
AB1157	0	10^{-5}
AB1157	10	10^{-6}
AB1157	25	10^{-4}
AB1157	50	10^{-3}
AB1157	100	10^{-2}

De la dilución a sembrar se tornó una alícuota de 0.1 ml y con una varilla de vidrio se esparció sobre la superficie de una caja de petri conteniendo LA. Las cajas así inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se contó el número de colonias aparecidas en cada una de ellas y se hicieron los cálculos necesarios tomando en cuenta el volumen y la dilución sembrados para determinar el porcentaje de supervivencia en cada dosis de UV (Howard-Flanders y Boyce, 1966).

4.2.6 Cruzas Virales

Las cruzas de los bacteriófagos se hicieron esencialmente de acuerdo al procedimiento descrito por Lieb (1976).

En estos experimentos que forman la parte esencial del presente trabajo, se cruzaron los fagos λ Nam7Nam53 y λ Pam80, los cuales poseen mutaciones ámbar en los genes *N* y *P* respectivamente, de manera que durante la recombinación se pueden producir fagos silvestres para los dos loci: NN^+P^+ , o

mutantes para ambos: NN^P. El procedimiento seguido en estos experimentos permitió detectar solo los recombinantes λ NN⁺P⁺ y hemos asumido que los recombinantes λ NN⁻P⁻ se produjeron también con la misma probabilidad.

Las bacterias huéspedes para las cruza de lambda fueron cultivadas en TBD durante toda la noche. Al día siguiente se hizo una dilución de cultivo en TBD fresco (1:50) y se incubó a 37°C con agitación hasta que alcanzó una D₀ de 0.4 a 590 nm. Las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos, resuspendidas en el mismo volumen de MgSO₄ 10⁻²M e irradiadas con luz UV, como en el método cuantitativo, a las dosis especificadas. Una vez irradiadas, 1 x 10⁸ células fueron infectadas simultáneamente con λ N7N53 y λ P80 a una multiplicidad de infección de 5, es decir con 5 x 10⁸ fagos de cada tipo y se adsorbieron durante 15 minutos a 37°C. Se agregaron 3 ml de MgSO₄ 10⁻²M a cada tubo, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar los fagos no adsorbidos. El botón se resuspendió en 3 ml de TBD y posteriormente se incubó a 37°C con agitación durante 80 minutos, tiempo suficiente para completar un ciclo lítico del bacteriófago. Al final se agregaron unas gotas de cloroformo a cada tubo y se dejaron en agitación durante 10 minutos, al cabo de los cuales se centrifugaron a 10,000 rpm y el sobrenadante, en donde se encuentran tanto los fagos progenitores como los recombinantes, fue recuperado y titulado.

La titulación se hizo siguiendo el mismo procedimiento que el de la titulación de los stocks de λ obtenidos por inducción de lisógenas o infección de la cepa C600, sólo que en este caso, además de sembrar en tapiz C600 para conocer el título total de los lisados, también se sembraron en la cepa 594 para conocer las progenies recombinantes λ NN⁺P⁺.

4.2.7 Estadística

La prueba estadística que se utilizó para comparar las progenies virales en huéspedes irradiados contra las progenies en el mismo tipo de huéspedes no irradiados fue la T de Student con (n₁ + n₂ - 2) grados de libertad y con una probabilidad (p) de 0.05.

5 RESULTADOS

5.1 Transducción

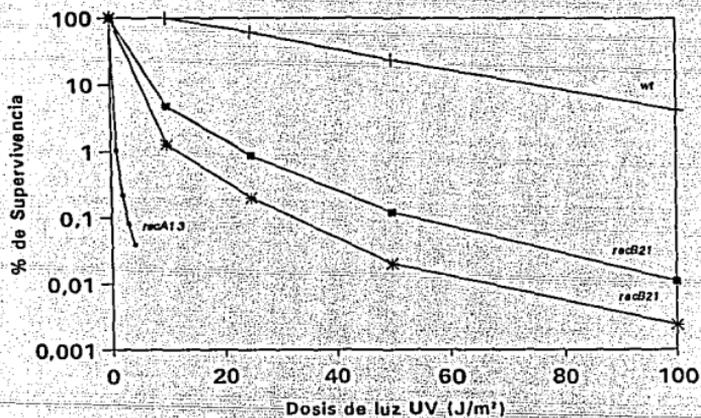
Por medio de la transducción con el fago P1 se llevó a cabo la construcción de la cepa AB1157 *recB21*, utilizando AQ5931 como la cepa donadora de la mutación *recB21*. Los transductantes fueron seleccionados por su resistencia a tetraciclina (tetra^R) y se obtuvieron 9 clones, de los cuales sólo dos resultaron sensibles a la luz UV, asumiéndose que estos dos transductantes eran portadores de la mutación *recB21* y fueron denominados AB11571 y AB11572.

La construcción de los dobles mutantes *recA recB* se realizó utilizando AB2463 *recA13* como cepa receptora y AQ5931 como cepa donadora de la mutación *recB21*. De esta transducción se obtuvieron 5 derivados resistentes a tetraciclina y sensibles a la luz ultravioleta. Para confirmar cuales de éstos eran verdaderos portadores de ambas mutaciones, se utilizó la característica que posee el bacteriófago λ *red gam* de formar placas en cepas de *E. coli recA-recB* pero no en cepas *recA* solamente. Puesto que el fago es deficiente en recombinación y carece además de la proteína Gam, que normalmente inhibe la actividad exonucleolítica de RecBCD, sólo puede multiplicarse cuando esta última enzima es también deficiente. Con esta prueba pudimos identificar sólo 2 transductantes portadores de las mutaciones *recA13* y *recB21* los cuales fueron denominados AB24631 y AB24632.

5.2 Sensibilidad a UV

Uno de los criterios más sencillos para la caracterización de las cepas utilizadas como huéspedes en las cruces virales fue la supervivencia a la luz UV ya que, como se mencionó en la introducción, las mutaciones que poseen afectan la capacidad de reparación del material genético. Como se puede apreciar en la Gráfica 1, la mayor sensibilidad la presenta un mutante *recA13* debido a que la proteína RecA es esencial tanto en la reparación por recombinación como para la inducción del sistema SOS. Un mutante *recB21* es menos sensible y fue por lo tanto este parámetro el que se utilizó para distinguir los mutantes *recB21* de los *recA13*.

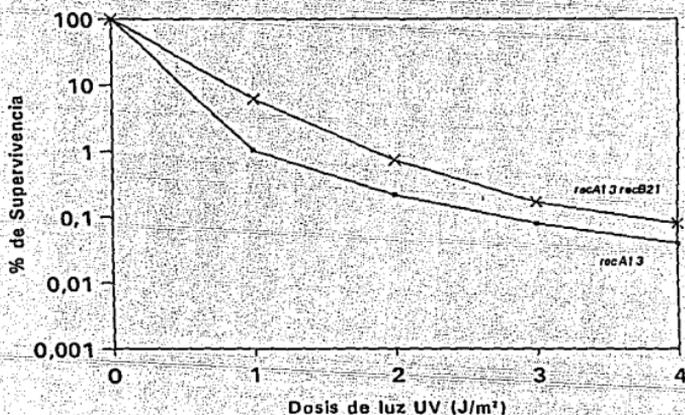
Gráfica 1: Sensibilidad a luz UV en cepas de *E. coli*
Porcentaje de supervivencia a a diferentes dosis de UV



○ AB2463 △ AB1157 * AB11571 ■ AB2470

En la Gráfica 2 se muestran las curvas de supervivencia a irradiación UV de la cepa mutante AB2463 *recA13* y de la doble mutante AB24631 *recA13 recB21*, en la que podemos ver que ambas cepas tienen el mismo comportamiento a las diferentes dosis de UV, aunque la doble mutante es ligeramente menos sensible que la mutante simple.

Gráfica 2: Sensibilidad a luz UV en cepas de *E. coli*:
Porcentaje de Supervivencia a diferentes dosis de UV



— AB2463 × AB24631

5.3 Cruzas virales

Para determinar si la enzima RecBCD interviene en el fenómeno recombinogénico del bacteriófago lambda, que es el objetivo central de este trabajo, una vez obtenidas las cepas deficientes en la enzima RecBCD, es decir los mutantes *recB21*, se llevaron a cabo las cruzas de los fagos λ N53N7 y λ P80 tanto en células irradiadas como no irradiadas con luz UV. Los resultados se muestran en las tablas III, IV y V, los cuales son promedios de por lo menos 3 experimentos.

En una cepa tipo silvestre tal como AB1157, donde los mecanismos de reparación del ADN son normales, existe un incremento de 3 veces en la progenie total y casi de 6 veces en la progenie recombinante cuando las células fueron previamente expuestas a una dosis de 50 J/m² de luz UV (Tabla III). Al comparar estos resultados con los obtenidos en la cepa AB2463, podemos observar que, a pesar que esta cepa carece de la respuesta SOS y es deficiente en recombinación, presenta la misma respuesta recombinogénica de lambda que la cepa tipo silvestre (Tabla III). En cambio en las cepas deficientes en la enzima RecBCD, es decir los mutantes AB11571 y AB11572, el incremento en ambas progenies a la misma dosis de luz UV no fue estadísticamente significativo al compararlo con su control no irradiado según la prueba T de Student (Tabla III).

Estos resultados indican claramente que la proteína RecBCD interviene de alguna manera en la recombinogénesis de lambda, pues aunque el fenómeno no desaparece completamente si disminuye drásticamente (Gráfica 3). Esta conclusión es apoyada por los experimentos hechos en otras cepas portadoras también de la mutación *recB21* tales como la AB2470 y la AQ5937, en los que se observó que el efecto recombinogénico también desaparecía (Tabla IV). De la misma manera, la adición de la mutación *recB21* a una cepa portadora de la mutación *recA13* anula el efecto recombinogénico observado en esta última, como lo demuestran los resultados obtenidos en las cepas AB24631 y AB24632 (Tabla V).

Tabla III. Efecto de la irradiación UV de diferentes cepas de de *E. coli* sobre las progenies total y recombinante del bacteriófago lambda

Cepa	Dosis J/m ²	PT/ml	I	PR/ml	I
AB1157 <i>wt</i>	0	7.72 x 10 ⁸	1	8.3 x 10 ⁶	1
	25	2.16 x 10 ⁹ (2.12) *	2.8	4.4 x 10 ⁷ (3.47) *	5.3
	50	2.88 x 10 ⁹ (2.80) *	3.7	6.1 x 10 ⁷ (4.78) *	7.3
AB2463 <i>recA13</i>	0	4.3 x 10 ⁸	1	1.3 x 10 ⁶	1
	25	8.5 x 10 ⁸ (1.53)	2.0	3.91 x 10 ⁶ (2.30) *	3.01
	50	1.31 x 10 ⁹ (2.33) *	3.05	7.42 x 10 ⁶ (4.36) *	5.7
AB11571 <i>recB21</i>	0	6.05 x 10 ⁸	1	5.09 x 10 ⁶	1
	25	7.35 x 10 ⁸ (0.41)	1.21	8.89 x 10 ⁶ (1.58)	1.75
	50	7.08 x 10 ⁸ (0.31)	1.17	9.92 x 10 ⁶ (1.61)	1.95
AB11572 <i>recB21</i>	0	6.51 x 10 ⁸	1	6.67 x 10 ⁶	1
	25	9.15 x 10 ⁸ (1.38)	1.40	1.16 x 10 ⁷ (1.88)	1.73
	50	9.8 x 10 ⁸ (1.44)	1.50	1.34 x 10 ⁷ (2.50)	2.0

PT = Progenie Total

PR = Progenie Recombinante

I = Incremento (progenie en huéspedes irradiados/progenie en huéspedes no irradiados)

El número entre paréntesis es el valor de la prueba estadística T de Student que se utilizó para comparar las progenies en huéspedes irradiados contra las progenies en huéspedes no irradiados de la misma cepa, con una p de 0.05.

* representa un valor estadísticamente significativo para una p de 0.05.

Tabla IV. Efecto de la irradiación UV de mutantes *recB21* de *E. coli* sobre las progenies total y recombinante del bacteriófago lambda

Cepa	Dosis J/m ²	PT/ml	I	PR/ml	I
AB2470	0	1.63 x 10 ⁸	1	5.76 x 10 ⁶	1
	25	9.57 x 10 ⁸ (1.18)	0.60	5.91 x 10 ⁶ (0.07)	1.03
	50	1.37 x 10 ⁹ (0.38)	0.84	5.14 x 10 ⁶ (0.29)	0.91
AQ5937	0	1.04 x 10 ⁸	1	1.41 x 10 ⁶	1
	25	9.87 x 10 ⁷ (0.21)	0.95	1.61 x 10 ⁶ (0.53)	1.14
	50	1.08 x 10 ⁸ (0.05)	1.04	1.51 x 10 ⁶ (0.29)	1.07

PT = Progenie Total

PR = Progenie Recombinante

I = Incremento (progenie en huéspedes irradiados/progenie en huéspedes no irradiados)

El número entre paréntesis es el valor de la prueba estadística T de Student que se utilizó para comparar las progenies en huéspedes irradiados contra las progenies en huéspedes no irradiados de la misma cepa, con una p de 0.05.

Tabla V. Efecto de la irradiación UV de cepas de *E. coli* dobles mutantes *recA13 recB21* sobre las progenies total y recombinante del bacteriófago lambda

Cepa	Dosis J/m ²	PT/ml	I	PR/ml	I
AB14631	0	6.97 x 10 ⁷	1	9.18 x 10 ⁵	1
	25	9.37 x 10 ⁷ (0.85)	1.35	1.14 x 10 ⁶ (0.81)	1.24
	50	7.63 x 10 ⁸ (0.33)	1.09	9.98 x 10 ⁵ (0.23)	1.09
AB24632	0	1.04 x 10 ⁸	1	1.12 x 10 ⁶	1
	25	1.68 x 10 ⁸ (1.01)	1.61	1.75 x 10 ⁶ (1.38)	1.56
	50	1.67 x 10 ⁸ (0.92)	1.60	1.86 x 10 ⁶ (1.45)	1.66

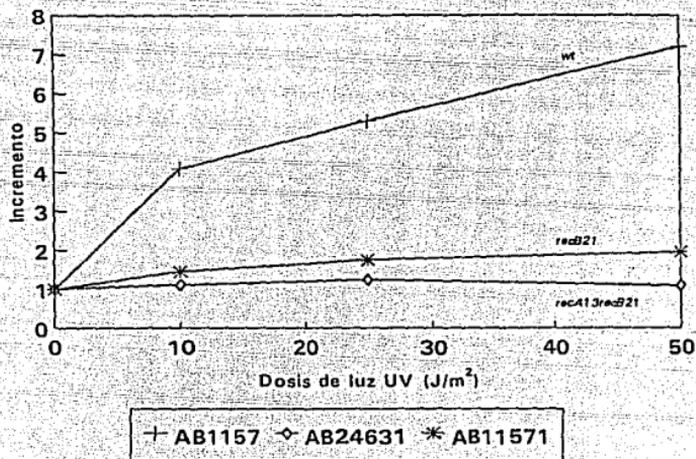
PT = Progenie Total

PR = Progenie Recombinante

I = Incremento (progenie en huéspedes irradiados/progenie en huéspedes no irradiados)

El número entre paréntesis es el valor de la prueba estadística T de Student que se utilizó para comparar las progenies en huéspedes irradiados contra las progenies en huéspedes no irradiados de la misma cepa, con una p de 0.05.

Gráfica 3: Efecto de la Irradiación UV de diferentes cepas de *E. coli* sobre el incremento en la progenie recombinante de lambda.



Todos esos resultados indican que la mayor parte del efecto observado tanto en células tipo silvestre como en *recA*, depende de alguna actividad enzimática de RecBCD.

6 DISCUSION

Los datos presentados aquí indican que la enzima RecBCD participa en el fenómeno de la recombinogénesis indirecta del bacteriófago lambda, el cual tiene lugar cuando las células huéspedes son previamente irradiadas con luz UV. Puesto que la síntesis de RecBCD es constitutiva y sus actividades enzimáticas son inhibidas por la proteína Gam de λ (Karu y col., 1975; Murphy, 1991), originalmente se había asumido que no existía relación entre ella y el fenómeno que estamos estudiando.

La inhibición de RecBCD por la proteína Gam protege a los cromosomas lineales de λ , producto de la replicación sigma, contra la degradación llevada a cabo por la actividad de exonucleasa de ADN doble de la enzima. Sin embargo, la participación de RecBCD en la recombinogénesis indirecta de λ implica que en células infectadas con el fago, la enzima no está totalmente inhibida o que posee alguna otra función no conocida, resistente a Gam.

Para estudiar las propiedades de la inhibición de RecBCD por la proteína Gam, Murphy (1991) insertó el gene *gam* en un plásmido multicopia que luego utilizó para transformar células de *E. coli*. Aunque en esas condiciones la proteína Gam inhibe todas las funciones de RecBCD en más de un 95%, las células presentan características que no concuerdan con las de mutantes *recBC*, carentes de todas las actividades de RecBCD. Por ejemplo, a diferencia de ellos, las células transformadas Gam⁺ son normales en su capacidad de recombinación y bastante más resistentes a UV. Estas diferencias fenotípicas, llevaron a Murphy (1991) a proponer que RecBCD puede poseer una actividad aún no conocida que no es inhibida por Gam o que incluso puede aparecer sólo en presencia de ella. La naturaleza de esta actividad es puramente especulativa y entre las posibilidades que se han mencionado se encuentran las siguientes: i) la enzima RecBCD puede intervenir en algún otro punto de la recombinación, distinto al de la producción de bandas simples. Tal punto podría ser por ejemplo la resolución de los intermediarios de Holliday al final del proceso, como ha sido propuesto en algunos modelos (Taylor y Smith, 1990); ii) RecBCD podría formar parte, *in vivo*, de un complejo enzimático mayor que adquiere una nueva actividad, no inhibida por Gam, en virtud de la sola presencia de RecBCD; iii) la actividad desconocida de RecBCD, podría ser parte de un complejo proteico, resistente a Gam, que incluye RecB y/o RecC

independientemente de la enzima completa; y iv) Gam podría promover *in vivo* la asociación de RecBCD con otra subunidad, de manera que la actividad desconocida existiría sólo en presencia de la proteína Gam.

En células infectadas con λ sin embargo, donde la concentración celular de la proteína Gam es mucho más baja que en células Gam⁺, la inhibición de RecBCD debe ser mucho menos eficiente. Bajo tales condiciones se ha visto que la enzima puede llegar a conservar hasta un 40% de su actividad total, suficiente para promover cierta cantidad de recombinación. De esta manera, aunque no podemos descartar la existencia en RecBCD, de una actividad extra resistente a Gam, la interpretación más simple de nuestros datos es que en células infectadas con λ , la enzima conserva cierta actividad residual suficiente para provocar el efecto observado por nosotros. Desde este punto de vista sería interesante probar el efecto de la eliminación total de la proteína Gam sobre la recombinogénesis indirecta de λ , siempre y cuando esto no afecte el crecimiento viral.

Nuestros resultados, obtenidos en los huéspedes *recB21*, indican que la supresión de las actividades enzimáticas de RecBCD anulan el fenómeno de la recombinogénesis indirecta de lambda, sin embargo, no proporcionan ningún indicio acerca de si las 5 actividades de la enzima son necesarias o si sólo alguna de ellas es suficiente para que el fenómeno tenga lugar. Cruzas de λ en huéspedes mutantes *recD1013* podrían ayudar a resolver esta cuestión. La mutación *recD1013* afecta la subunidad RecD de la enzima RecBCD y aunque las células son normales en su capacidad de recombinación, no ha sido posible demostrar la presencia en ellos de las actividades de exonucleasa y de helicasa, ni de corte en *chi*, dependientes de RecBCD (Chaudhury y Smith, 1984; Amundsen y col., 1986; Biek y Cohen, 1986; Smith, 1987). Posiblemente la recombinación en esos mutantes se lleva a cabo de una manera distinta, utilizando los productos de otros genes que normalmente no serían usados en bacterias RecBCD⁺. Por ejemplo, Lovett y col. (1988) han demostrado que si se agrega una mutación *recJ* a un mutante *recD*, la tasa de recombinación disminuye más de 80 veces y que la sobreproducción intracelular de la proteína RecJ va acompañada por la aparición de una nueva actividad de exonucleasa, lo cual sugiere que los mutantes *recD1013* son deficientes en la actividad de exonucleasa provista por la enzima RecBCD⁺. Ciertos resultados preliminares (no mostrados) obtenidos en huéspedes *recD1013*, en los que

la recombinogénesis indirecta de λ parece estar ausente, podrían ser considerados como evidencia de que la participación de RecBCD en la recombinogénesis indirecta de λ es a través de su actividad de exonucleasa de ADN de doble banda y que las otras actividades son irrelevantes para el fenómeno en cuestión.

A diferencia de lo que ocurre con la expresión de los genes SOS regulados por LexA, la síntesis de RecBCD es constitutiva y por lo tanto no sujeta a control por algún sistema de regulación. Entonces, ¿cómo se puede explicar la aparente inducibilidad de la recombinogénesis indirecta de λ ? Un proceso celular puede ser estimulado por dos mecanismos: por un aumento de la enzimas participantes o por un aumento en la cantidad de los substratos sobre los que ellas actúan. Existen tres líneas de argumentación que apoyan la idea de que un aumento en la cantidad de substratos moleculares en el ADN es un factor importante en la determinación de la tasa de recombinación: i) La radiación UV, que provoca un incremento notable en la frecuencia de recombinación sin necesidad de sintetizar nuevas proteínas, produce una gran cantidad de lesiones en el ADN que pueden transformarse en substratos recombinogénicos. Tales lesiones, como ya vimos, son principalmente dímeros de timina que durante la replicación del ADN dan lugar a huecos postreplicativos. ii) Las mutaciones que causan fenotipos *hiper-rec* en *E. coli*, tales como *polA*, *lig* y *dam*, son aquellas que provocan un aumento en la cantidad de rupturas dobles o sencillas en el ADN, las cuales pueden iniciar la recombinación (Konrad, 1977). iii) Las mutaciones *recA^o* de *E. coli*, que afectan al operador del gene *recA* y provocan la síntesis constitutiva de un alto nivel de proteína RecA, tienen muy poco efecto sobre la tasa de recombinación basal (Clark, 1982).

Todas esas observaciones apoyan la idea de que la recombinación puede ser estimulada más por un aumento en la cantidad de ciertas estructuras en el ADN que por un incremento en la concentración intracelular de las enzimas participantes. Si esto es así, la recombinogénesis indirecta de λ podría deberse a un aumento en tales estructuras y no a la inducción de la síntesis de RecBCD. Pero, ¿qué tipo de estructuras son las que pueden estar aumentando en el ADN de λ como consecuencia de la irradiación UV de las células huéspedes?

Como ya vimos antes, los substratos ideales para RecBCD corresponden a moléculas lineales de ADN con extremos dobles parejos o casi parejos, a través de los cuales la enzima penetra y desenrolla o degrada el ADN, dando lugar a extremos libres 3'OH. Un aumento en la cantidad de cromosomas de λ en replicación sigma o círculo rodante podría favorecer por un lado, la producción de sitios de entrada para RecBCD y por otro, un aumento en la progenie total del fago, tal como se observa en la cepa AB1157. Desde este punto de vista, el efecto primario de la irradiación de los huéspedes sería una estimulación de la replicación del ADN viral, lo cual a su vez daría por resultado una mayor disponibilidad de substratos para la enzima RecBCD de *E. coli*.

Algunos experimentos (no mostrados) en los que se agregó ácido nalidíxico, inhibidor de la ADN-girasa y de la síntesis de ADN (Gellert y col., 1976), están de acuerdo con esa hipótesis. En esos experimentos se observó que a medida que la concentración del ácido nalidíxico aumentaba, el efecto provocado por la irradiación UV sobre las progenies total y recombinante de λ disminuía. Sin embargo, esta disminución fue más notable en la progenie recombinante, ya que una pequeña reducción en la progenie total, afectó severamente la cantidad de recombinantes. Esta observación apoya la idea de que una estimulación en la tasa de replicación del ADN viral es una condición previa para que la recombinogénesis indirecta de lambda ocurra. Una frecuencia más alta de moléculas lineales de ADN con extremos dobles, derivados de un mayor número de cromosomas de λ en replicación sigma, aumentaría entonces la probabilidad de recombinación al ser los substratos preferidos por RecBCD.

Todo lo anterior ha quedado incluido en el esquema mostrado en la Fig 18, que trata de explicar el fenómeno de la recombinogénesis indirecta de lambda. En él, los cromosomas virales producidos en la fase tardía del ciclo lítico, están representados como moléculas lineales, por uno de cuyos extremos penetra la enzima RecBCD y promueve la formación de cadenas simples de ADN, ya sea por desenrollamiento y corte en *chi* o por degradación exonucleolítica de una de las cadenas. La ausencia de verdaderos sitios *chi* en lambda y la falta de respuesta recombinogénica viral en mutantes *recD* de *E. coli* apoyan la hipótesis de que RecBCD participa en la recombinogénesis indirecta de lambda a través de su actividad de exonucleasa,

Según ese modelo, la irradiación UV de los huéspedes provoca una estimulación de la replicación del ADN viral que a su vez dispara la recombinación, al generar los substratos adecuados para RecBCD. Tal estimulación podría ser general, es decir, abarcar ambos tipos de replicación (theta y sigma), o ser exclusiva de alguna de ellas. Una posibilidad interesante es que el paso de un tipo de replicación a otro sea más eficiente en huéspedes irradiados y de que tal evento sea llevado a cabo por enzimas inducibles. Desafortunadamente, no existe información suficiente acerca de los factores que determinan el cambio en el tipo de replicación y de si estos factores incluyen la actividad de enzimas específicas. De cualquier manera, el resultado de todas esas posibles alteraciones en la replicación del ADN viral, sería una mayor producción de cromosomas lineales de λ que sirven de sustrato para RecBCD.

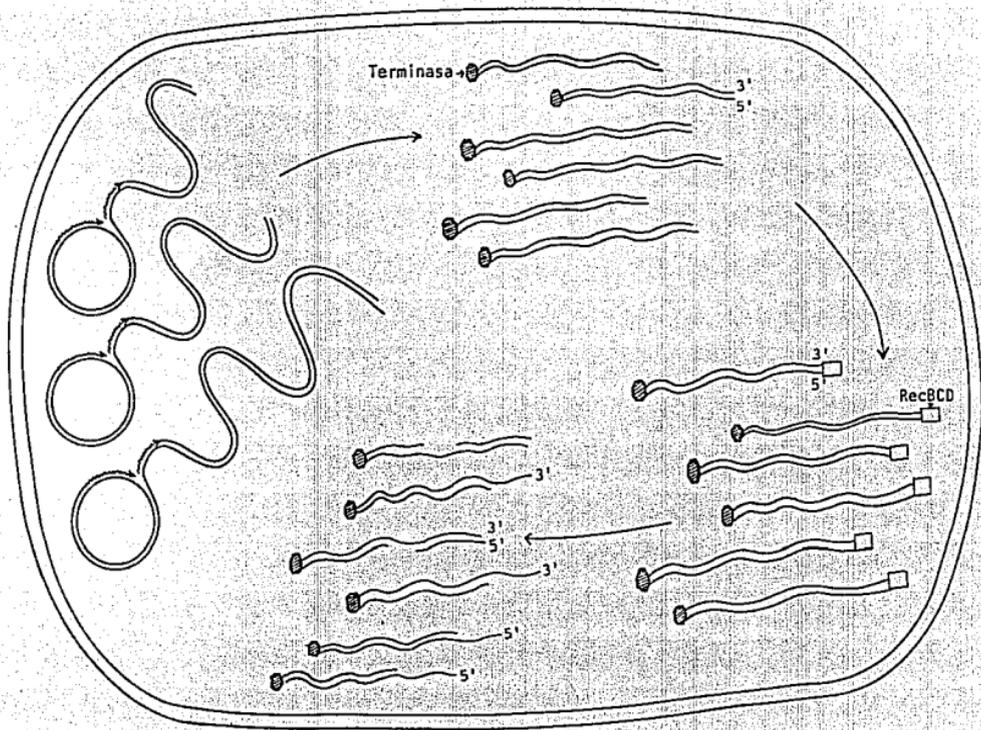


Fig 18. UNA ESTIMULACION EN LA REPLICACION DEL ADN DE LAMBDA AUMENTARIA LOS SUBSTRATOS SOBRE LOS CUALES ACTUA LA ENZIMA RecBCD

7 CONCLUSIONES

- 1- La recombinogénesis indirecta de lambda no se presenta en huéspedes *recB21*, obtenidos tanto por tratamiento mutagénico como por transducción con el fago P1. Esto indica que la presencia de la enzima RecBCD funcional es un requisito indispensable para que el fenómeno tenga lugar.**
- 2- La inhibición de la enzima RecBCD por la proteína Gam no es completa en huéspedes irradiados con UV infectados con lambda.**

8 BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Nueva York. pp.1218
- Alcántara, D.D. 1986a. Inducción de Recombinación Genética en el Bacteriófago Lambda por Irradiación UV de las Células de *E. coli*. Informe Técnico-Científico, Radiobiol. 86-08 del proyecto BZ-87. Depto. de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México
- Alcántara, D.D. 1986b. Inducción de Recombinación Genética en el Bacteriófago Lambda por Irradiación UV de las Células de *E. coli*. Informe Técnico-Científico, Radiobiol. 86-09 del proyecto BZ-87. Depto. de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México
- Alcántara, D.D. 1987. Inducción de Recombinación Genética en Bacteriófago Lambda por Irradiación UV de las Células de *E. coli*. III Papel de los Genes *ruvA* y *recN*. Informe Técnico-Científico, Radiobiol. 87-04 del proyecto BZ-87. Depto. de Radiobiología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México
- Amundsen, S.K., A.F. Taylor, A.M. Chaudhury y G.R. Smith. 1986. *recD*: the gene for an essential third subunit of exonuclease V. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5558-5562
- Amundsen, S.K., A.M. Neiman, S.M. Thibodeaux y G.R. Smith. 1990. Genetic Dissection of the Biochemical Activities of RecBCD Enzyme. Genetics 126:25-40
- Arber, W. 1983. A Beginner's Guide to Lambda Biology. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 381-394
- Arber, W., L. Enquist, B. Hohn, N.E. Murray y K. Murray. 1983. Experimental Methods for Use with Lambda. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 433-466
- Bachmann, B.J. 1987. Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 7. En: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger, Eds. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 2:807-876

- Biek, D.P. y S.N. Cohen. 1986. Identification and characterization of *recD*, a gene affecting plasmid maintenance and recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **130**:167-172
- Clark, A.J. 1973. Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* and other bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **7**:67-86
- Clark, A.J. 1982. *recA* operator mutations and their usefulness. *Biochimie*, **64**:669-675
- Clark, A.J., S.J. Sandler, K.D. Willis, C.C. Chu, M.A. Blamar y S.T. Lovett. 1984. Genes of the RecE and RecF pathways of conjugational recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**:453-462
- Clark, A.J. y K.B. Low. 1988. Systems and pathways of homologous recombination in *Escherichia coli*. En: The Recombination of Genetic Material. Low, K.B. Ed. Academic Press, Inc. Nueva York. pp. 155-215
- Connolly, B., C.A. Parsons, F.E. Benson, H.J. Dunderdale, G.J. Sharples, R.G. Lloyd y S.C. West. 1991. Resolution of Holliday junctions *in vitro* requires the *Escherichia coli* *ruvC* product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6063-6067
- Cox, M.M. 1991. The RecA protein as a recombinational repair system. *MicroReview. Molecular Microbiology* **5**(6):1295-1299
- Cox, M.M. y I.R. Lehman. 1987. Enzymes of general recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:229-262
- Chaudhury, A.M., y G.R. Smith. 1984. A new class of *Escherichia coli* *recBC* mutants: implications for the role of RecBC enzyme in homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7850-7854
- Cheng, K.C. y G.R. Smith. 1984. Recombinational hotspot activity of Chi-like sequences. *J. Mol. Biol.* **180**:371-377
- Cheng, K.C. y G.R. Smith. 1989. Distribution of Chi-Stimulated Recombinational Exchanges and Heteroduplex Endpoints in Phage Lambda. *Genetics* **123**:5-17
- Daniels, L.D., J.L. Schroeder, W. Szybalski, F. Sanger y F.R. Blattner. 1983. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 469-517
- Dri, A.M. y P.L. Moreau. 1991. Properties of RecA441 reveal a possible role for RecF and SSB proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **227**:488-492

- Elliot, J. y W. Arber. 1978. *Escherichia coli* K-12 *pel* mutants, which block phage λ DNA injection, coincide with *pstM*, which determines a component of a sugar transport system. Mol. Gen. Genet. 167:1-8
- Enquist, L. y A. Skalka. 1973. Replication of Bacteriophage λ DNA dependent on the function of host and viral genes, I. Interaction of *red gam* and *recD*. Mol. Biol. 75:185
- Flory, J., S.S. Tsang, K. Muniyappa, M. Branchi, D. Gonda, R. Kahn, E. Azhderian, C. Eigner, S. y C.M. Radding. 1984. Intermediates in homologous pairing promoted by RecA protein and correlations of recombination *in vitro* and *in vivo*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49:513-523
- Folkmanis, A., W. Maltzman, P. Mellon, A. Skalka, y H. Echols. 1977. The essential role of the *cro* gene in lytic development by bacteriophage λ . Virology 87:352
- Friedberg, E.C. 1985. DNA repair. W.H. Freeman, Nueva York. pp. 613
- Furth, M.E. y S.H. Wickner. 1983. Lambda DNA Replication. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 145-175
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M.H. O'Dea y H.A. Nash. 1976. DNA gyrase that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3872-3876
- Griffin N.T.J. y R.D. Kolodner. 1990. Purification and Preliminary Characterization of the *Escherichia coli* K-12 RecF Protein. J. Bacteriol. 172:6291-6299
- Gussin, G.N., A.D. Johnson, C.O. Pabo, y R.T. Sauer. 1983. Repressor and Cro Protein: Structure, Function, and Role in Lysogenization. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 93-121
- Hannan, M.A. y A. Nasim. 1984. Repair Mechanisms and Mutagenesis in Microorganisms. En: Repairable Lesions in Microorganisms. Hurst, A. y A. Nasim, Eds. Academic Press, Inc. Orlando, Florida. pp. 123-145
- Hélène, C. 1984. Las Estructuras del ADN. Mundo Científico (La Recherche). 4:742-759
- Hershey, A.D., y W. Dove. 1983. Introduction to Lambda. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 3-11
- Howard-Flanders, P. 1981. Inducible Repair of DNA. Sci. Am. 245(5):56-64

- Howard-Flanders, P. y R.P. Boyce. 1966. DNA repair and genetic recombination: studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes. *Radiat. Res.* (Suppl.) 6:156
- Iwasaki, H., T. Shiba, K. Makino, A. Nakata y H. Shinagawa. 1989. Overproduction, purification, and ATPase activity of the *Escherichia coli* RuvB protein involved in DNA repair. *J. Bacteriol.* 171:5276-5280
- Iwasaki, H., M. Takahaki, T. Shiba, A. Nakata y H. Shinagawa. 1991. *Escherichia coli* RuvC protein is an endonuclease that resolves the Holliday structure. *The EMBO Journal* 10:4381-4389
- Joseph, J.W. y R.D. Kotodner. 1983. Exonucleasa VIII of *Escherichia coli*, II. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 258:10418-10424
- Karu, A.E., V. Mackay, P.J. Goldmark y S. Linn. 1973. The *recBC* Deoxyribonuclease of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 14:4874-4884
- Karu, A.E., Y. Sakaki, H. Echols y S. Linn. 1975. The γ protein specified by bacteriophage λ . *J. Biol. Chem.* 250:7377-7387
- Katsura, I. 1983. Tail Assembly and Injection. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 331-346
- Kellenberger, E. y R.S. Edgar. 1971. Structure and Assembly of Phage Particles. En: The Bacteriophage Lambda. Hershey A.D., Ed. Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 271-295
- Kmiec, E. y W.K. Holloman. 1981. β protein of bacteriophage λ promotes renaturation of DNA. *J. Biol. Chem.* 256:12636-12639
- Kobayashi, I., M.M. Stahl y F.W. Stahl. 1984. The mechanism of the Chi-cos interaction in RecA-RecBC-mediated recombination in phage λ . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48:497-506
- Konrad, E.B. 1977. Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced recombination between chromosomal duplications. *J. Bacteriol.* 167:594-603
- Kushner, S.R. 1987. DNA Repair. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger, Eds. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 2:1044-1053

- Lieb, M. 1976. Mapping missense and non sense mutations in gen *cl* of bacteriophage Lambda. Marker effects. *Mol. Gen. Genet.* 146:285-290
- Little, J.W. y D.W. Mount. 1982. The SOS Regulatory System of *Escherchia coli*. *Cell* 29:11-22
- Lovett, S.T., C. Luisi-DeLuca y R.D. Kolodner. 1988. The genetic dependence of recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetic* 120:37-45
- Mackay V. y S. Linn. 1974. The Mechanism of Degradation of Duplex Deoxyribonucleic Acid by the *recBC* Enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 249:4286-4294
- Madiraju, M.V.V.S., A. Templin y A.J. Clark. 1988. Properties of a mutant *recA*-encoded protein reveal a possible role for *Escherichia coli recF*-encoded protein in genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6592-6596
- Miller, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Col Spring Harbor, Nueva York. pp. 466
- Moreau, P.L. 1987. Effects of overproduction of single-stranded DNA-binding protein on RecA protein-dependent processes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 194:621-643
- Muniyappa, K., S.L. Shaner, S.S. Tsang y C.M. Radding. 1984. Mechanism of the concerted action of RecA protein and helix-destabilizing proteins in homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2757-2761
- Murphy, K.C. 1991. λ Gam Protein Inhibits the Helicase and χ -Stimulated Recombination Activities of *Escherichia coli* RecBCD Enzyme. *J. Bacteriol.* 173:5808-5821
- Nichols, B.P. y J.E. Donelson. 1978. A 178 nucleotide sequence surrounding the *cos* site of λ DNA. *J. Virol.* 26:429
- Paterson, M.C. y N.E. Gentner. 1984. Introduction: Enviromentally Induced DNA Lesions and Their Biological Consequences. En: Repairable Lesions in Microorganisms. Hurst, A. y A. Nasim, Eds. Academic Press, Inc. Orlando, Florida. pp. 1-56
- Ponticelli, A.S., D.N. Schultz, A.F. Taylor y G.R. Smith. 1985. Chi-dependent DNA strand cleavage by RecBCD enzyme. *Cell* 41:145-151
- Radding, C.M. 1982. Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination. *Annu. Rev. Genet.* 16:405-437

- Radding, C.M., J. Rosensweig, F. Richards y E. Cassuto. 1971. Separation and characterization of exonuclease, β protein and a complex of both. *J. Biol. Chem.* **246**:2510
- Radman, M. 1975. SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible repair which is accompanied by mutagenesis. En: Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Hanawalt, D.C y R.B. Setlow, Eds. Nueva York. pp. 355-367
- Randall-Hazelbauer, L. y M. Schwartz. 1973. Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **116**:1436
- Roberts, J.W. y R. Devoret. 1983. Lysogenic Induction. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 123-144
- Rosenberg, S.M. 1988. Chain-bias of *Escherichia coli* Rec-mediated λ patch recombinants is independent of the orientation of λ *cos*. *Genetics* **119**:7-21
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press **1**:2.3
- Sancar, A. y G. Sancar. 1988. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:29-67
- Schnos, M. y R. Inman. 1970. Position of branch points in replicating lambda DNA. *J. Mol. Biol.* **51**:61
- Sharples, G.J., F.E. Benson, G.T. Illing y R.G. Lloyd. 1990. Molecular and functional analysis of the *ruv* region of *Escherichia coli* K-12, reveals three genes involved in DNA repair and recombination. *Mol. Gen. Genet.* **221**:219-226
- Sharples, G.J. y R.G. Lloyd. 1991. Resolution of Holliday Junctions in *Escherichia coli*: Identification of the *ruvC* gene product as a 19-Kilodalton Protein. *J. Bacteriol.* **173**:7711-7715
- Shinagawa, H., K. Makino, M. Amemura, S. Kimura, H. Iwasaki y A. Nakata. 1988. Structure and regulation of the *Escherichia coli* *ruv* operon involved in DNA repair and recombination. *J. Bacteriol.* **170**:4322-4329
- Shinagawa, H., T. Shiba, H. Iwasaki, K. Makino, T. Takahagi y A. Nakata. 1991. Properties of the *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins involved in DNA repair, recombination and mutagenesis. *Biochimie* **73**:505-508

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Smith, G.R. 1983. General Recombination. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 175-209
- Smith, G.R. 1987. Mechanisms and control of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 21:179-201
- Smith, G.R. 1988. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol. Rev.* 52:1-28
- Smith, G.R., D.W. Schutz, A. Taylor y K. Triman. 1981. Chi sites, RecBC enzyme, and generalized recombination. *Stadler Genet. Symp.* 13:25-37
- Stahl, F.W. 1987. Genetic Recombination. *Sci. Am.* 256(2):52-63
- Stahl, F.W., I. Kobayashi y M.M. Stahl. 1985. In phage λ , *cos* is a recombinator in the Red pathway. *J. Mol. Biol.* 187:199-209.
- Stahl, F.W., I. Kobayashi, D. Thaler y M.M. Stahl. 1986. Direction of travel of RecBC recombinase through bacteriophage λ DNA. *Genetics* 113:215-227
- Stahl, F.W., L.C. Thomason, I. Siddiqi y M.M. Stahl. 1990. Further Tests of a Recombination Model in Which χ Removes the RecD Subunit From the RecBCD Enzyme of *Escherichia coli*. *Genetics* 126:519-533
- Szybalski, E. y W. Szybalski. 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7:217
- Taylor, A.F. 1988. The RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. En: Genetic Recombination. Kucherlapati R. y G.R. Smith, Eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 231-263
- Taylor, A.F. y G.R. Smith. 1990. Action of RecBCD Enzyme on Cruciform DNA. *J. Mol. Biol.* 217:117-134
- Telander-Muskavitch, K.M. y S. Linn. 1981. RecBC-like enzymes: Exonucleasa V deoxyribonucleases. En: The Enzymes. Boyer, P.D., Ed. Academic Press, Nueva York. 14:233-250
- Thaler, D.S., E. Sampson, I. Siddiqi, S.M. Rosenberg, L.C. Thomason, F.W. Stahl y M.M. Stahl. 1989. Recombination of bacteriophage λ in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genome* 31:53-67
- Tomizawa J. y T. Ogawa. 1969. Replication of phage lambda DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33:501

- Umezū, K., K. Nakayama y H. Nakayama. 1990. *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5363-5367
- Walker, G.C. 1987. The SOS response of *E. coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger, Eds. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 2:1346-1357.
- Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steitz y A.M. Weiner. 1987. Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing, USA. pp. 1163
- Weinstock, G.M. 1987. General Recombination in *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y .E. Umbarger, Eds. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 2:1034-1043.
- West, S.C. 1992. Enzymes and Molecular Mechanisms of Genetic Recombination. Annu. Rev. Biochem. 61:603-640
- Wu, R. y E. Taylor. 1971. Nucleotide sequence analysis of DNA. II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA. J. Mol. Biol. 57:491
- Wulff, D.L. y M. Rosenberg. 1983. Establishment of Repressor Synthesis. En: Lambda II. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl, y R.A. Weisberg, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 53-73
- Yen, K.M. y G.N. Gussin. 1980. Kinetics of bacteriophage λ repressor synthesis directed by the P_{NE} promoter: Influence of temperature, multiplicity of infection, and mutation of P_{RM} or the *cro* gene. Mol. Gen. Genet. 179:409
- Zissler, J., E. Signer y F. Schaffer. 1971. The role of recombination in the growth of bacteriophage λ : I. The *gamma* gene. En: The Bacteriophage Lambda. Hendrix, A.D., Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York. pp. 455-468.