

Trabajo de Revisión

Toxicología Experimental

Ensayo SOS, una revisión actualizada.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{1*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{2}, Juan Francisco Infante Bourzac^{3*}, Dayisell Lazara Curveco Sánchez^{4***}.**

¹Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia

²Licenciado en Microbiología

³Doctor en Medicina Veterinaria, PhD

⁴Técnico Medio en Farmacia.

*Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad Habana, Cuba.

**Centro de Química Farmacéutica (CQF), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de La Habana, Cuba.

***Centro de Productos Naturales (CPN), Calle 198 e/19 y 21, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola.

Email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En procariontes se denomina respuesta SOS, al sistema de emergencia celular que permite la sobrevivencia bacteriana ante la detención de la replicación del ADN que ha sido dañado por agentes genotóxicos. La respuesta SOS consiste en la inducción de más de 20 genes que están bajo el control del circuito *recA/lexA*. La proteína *recA*, es el regulador positivo del circuito, es activada después de la interacción con la molécula señal: ADN de simple cadena, *lexA* es el regulador negativo, conocido como el represor transcripcional de todos los genes SOS en los que se incluyen el propio *lexA* y *recA*. El presente trabajo tuvo como objetivo actualizar sobre el tema del fenómeno SOS y respuesta SOS, destacando su utilidad como ensayo genotóxico comunmente llamado (Ensayo SOS), siendo útil a los investigadores que trabajan esta rama de la toxicología genética *in vitro*, para determinar la genotoxicidad y/o radioprotección de sus productos. Se hace alusión al efecto de la radiación ionizante sobre el ADN, respuesta SOS en bacterias, reparación por recombinación, mutagénesis SOS, otros genes involucrados en la respuesta SOS, ensayos bacterianos basados en fusiones transcripcionales de genes SOS y por último la antimutagénesis y radioprotección vinculada a este ensayo.

Palabras clave: Ensayo SOS, *lexA*, *recA*, radioprotector, toxicología genética.

Abstract

SOS assay, a current review.

In prokaryotes it is denominated SOS response, to the system cellular emergency that allows the bacterial survival before the detention of the DNA replication that has been damaged by genotoxic agents. The SOS response consists on the induction of more than 20 genes that are low the control of the *recA/lexA* circuit. The *recA* protein, is the positive regulator of the circuit, it is activated after the interaction with the sign molecule: DNA of simple chain, *lexA* is the negative regulator, well-known as the transcriptional repressor of all the SOS genes in those that the own *lexA* and *recA* are included. The present work had as objective to current on the SOS phenomenon topic and SOS response, highlighting their utility like genotoxic assay commonly call (SOS assay), being useful to the researchers that work the genetic toxicology *in vitro* topic, to determine the genotoxicity and radioprotective of their products. We made allusion the ionizing radiation effect on the DNA, bacterial SOS response, repair for recombination, SOS mutagenesis, other genes involved in the SOS response, bacterial assay based on transcriptionals melt of SOS genes and lastly the antimutagenesis and radioprotective linked to this assay.

Key words: SOS assay, *lexA*, *recA*, radioprotector, genetic toxicology.

Introducción

En procariontes se denomina respuesta SOS, ¹ al sistema de emergencia celular que permite la sobrevivencia bacteriana ante la detención de la replicación del DNA que ha sido dañado por agentes genotóxicos.² La respuesta SOS consiste en la inducción de más de 20 genes que están bajo el control del circuito *recA/lexA*. La proteína *recA* es el regulador positivo del circuito, es activada después de la interacción con la molécula señal: DNA de simple cadena,³ *lexA*, el regulador negativo, es el represor transcripcional de todos los genes SOS en los que se incluyen el propio *lexA* y *recA*.⁴

El circuito *recA/lexA* regula y modula importantes funciones celulares, entre las que se encuentran: reparación del DNA, recombinación homóloga, síntesis post-lesión⁵ y el proceso de formación del septo celular que tiene lugar con la participación de *sfiA*. La ejecución de tales funciones persigue la restauración de la división celular, garantizando con ello la sobrevivencia de la célula. Adicionalmente, y bajo el control del propio sistema SOS, se encuentran otros fenómenos como es la inducción del profago λ .⁶

Los ensayos que se basan en la utilización de fusiones transcripcionales con genes SOS han sido ampliamente empleados como biosensores del daño genético. Incluidos en esta categoría se encuentran el SOS Chromotest, *rec-lac* test, *umu* test y el test de genes *lux*.⁷

Los sistemas basados en fusiones transcripcionales con promotores de genes SOS han sido ampliamente empleados en la búsqueda de antimutágenos, así como en el estudio de los mecanismos de (anti)mutagenicidad por medio de los cuales muchos compuestos interactúan con el DNA de la célula. Por último, podemos añadir que los ensayos SOS son excelentes biosensores del daño producido por radiaciones ionizantes.

Nuestro país cuenta con experiencia en cuanto a la inducción SOS por medio de radiación gamma. Para ello se ha recurrido específicamente a los sistemas de ensayo que monitorean la expresión de las fusiones génicas con el gen reportero *lacZ*.⁸ Sin embargo, es de señalar que queda mucho por conocer acerca de los mecanismos de interacción de

la radiación ionizante con la célula viva y su DNA; así como del papel jugado por los genes SOS frente a los daños provocados por la radiación gamma.

Recientemente se introdujo la fusión *sfIA::lacZ* en *E. coli* AB1157 y en líneas mutantes derivadas de esta, las cuales poseen mutaciones en genes de reparación del DNA (*uvrA*, *recB*, *recC*, *recF* y *recM*). Estos genes tienen una participación activa en los procesos de reparación y recombinación que ocurren durante la respuesta SOS.⁹

Se ha demostrado que las modificaciones genéticas de esta índole pueden aumentar la sensibilidad de la célula bacteriana ante el daño en su material genético. Paralelamente, este hecho ha servido de base para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la genotoxicidad y la inducción de la respuesta SOS.¹⁰

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo actualizar sobre el fenómeno SOS y la respuesta SOS, destacando su utilidad como ensayo genotóxico comunmente llamado (Ensayo SOS), siendo útil a los investigadores que trabajan esta rama de la toxicología genética *in vitro*, para determinar la genotoxicidad y/o radioprotección de sus productos.

Desarrollo

- Efecto de la radiación ionizante sobre el DNA.

La deposición aleatoria de energía de la radiación ionizante induce un amplio espectro de lesiones en el DNA. Estas pueden ser provocadas por ionización directa o a través de la generación de radicales libres en la vecindad de la molécula; lo que trae como consecuencia la ocurrencia de roturas de cadenas y el daño oxidativo.¹¹

La presencia de lesiones en la doble hélice del DNA puede ser múltiple. Cuando estas son de naturaleza similar (o no) y ocupan posiciones muy próximas unas de las otras en cadenas opuestas (generalmente en el espacio comprendido entre dos vueltas de hélice) se denominan lesiones agrupadas del DNA o "clustered DNA lesions". Dentro de esta denominación podemos encontrar: roturas de simple cadena (SSB), roturas de doble cadena (DSB) y lesiones de tipo oxidativo. Recientemente, se demostró que la radiación

ionizante provoca la formación de lesiones agrupadas conformadas principalmente por sitios abásicos (AP), bases oxidadas y que estas constituyen del 50 al 80% del total del daño inducido en el DNA por este tipo de radiación.¹¹

Teóricamente las lesiones agrupadas pueden resultar de múltiples eventos independientes de radiación en los que cada uno produzca uno de los daños que la constituyen o sino, pueden originarse a partir de un solo impacto (con su tracto acompañante respectivo).¹² La probabilidad de formación de lesiones agrupadas del DNA aumenta con la densidad de ionización de la radiación. En el caso de la radiación densamente ionizante (partículas α), la producción de lesiones agrupadas es alta, estando más del 50 % de las SSB acompañadas de lesiones vecinas.¹¹

Las lesiones aisladas en el DNA son reparadas generalmente de forma eficiente, sin embargo, se ha sugerido que cuando se encuentran agrupadas son más difíciles, sino imposibles de reparar. El estudio de la eficiencia de diferentes enzimas de reparación en cuanto al corte de duplex oligonucleotídicos que contienen lesiones espaciadas a corta distancia mostró que los sitios AP, bases oxidadas o SSB muy próximos entre sí reducen o eliminan el reconocimiento o el corte de dichas enzimas.¹³ Por otra parte, se ha demostrado que la reparabilidad de las lesiones agrupadas de DNA esta determinada por la identidad de las lesiones componentes del grupo; así como, por la distancia relativa entre ellas.¹²

¿La reparación de lesiones agrupadas está exenta de errores o se pueden generar DSB y deleciones durante su procesamiento? Esta interrogante se ha analizado en diferentes ocasiones. Recientemente se estudió este fenómeno empleando células bacterianas (y de mamíferos) transformadas con construcciones de DNA plasmídico que contenían lesiones agrupadas obtenidas artificialmente. La realización de estas investigaciones arrojó que en ambos casos aproximadamente 1(2), de cada 10 eventos de reparación, donde están involucradas lesiones opuestas muy cercanas, conducían a la ocurrencia de deleciones y DSB.¹¹

Hasta el momento se han descrito más de cien tipos de lesiones diferentes provocadas por daño oxidativo las que a su vez pueden devenir indirectamente en roturas de cadena. Dentro del grupo de radicales libres generados por radiación ionizante se encuentran: $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$, $^1\text{O}_2$ y H_2O_2 . La interacción de estos con los componentes celulares también comprende a lípidos y proteínas. La generación intracelular de las especies reactivas del oxígeno anteriores contribuye a la mutagénesis bacteriana, siendo más afectadas las células deficientes en sus mecanismos de protección y reparación.¹⁴

Uno de los daños oxidativos predominantes en el DNA después de recibir radiación gamma en atmósfera de oxígeno es la generación de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG).¹⁵ Este daño es el resultado del ataque de un radical $\cdot\text{OH}$ a la posición C-8 de la guanina. La 8oxoG presente en la cadena de DNA molde de la replicación posibilita la incorporación tanto de dCTP como de dATP y por ende es fuente de transversiones G:C \Rightarrow T:A. Por otra parte, la 8oxo-dGTP se incorpora fácilmente en oposición a un residuo A del molde de DNA y con ello posibilita la ocurrencia de transversiones A:T \Rightarrow C:G.⁶

Además de 8oxoG, existen otras lesiones oxidativas importantes como son: 8-oxo-adenina, bases pirimidínicas hidroxiladas (glicol-timina y 5-hidroxicitocina) y bases púricas con el anillo imidazol abierto (formamidopiridinas: Fapy-adenina y Fapy-guanina). La 8-oxo-adenina y la 5-hidroxicitocina son lesiones mutagénicas; mientras que la glicol-timina, Fapy-adenina y Fapy-guanina son capaces de bloquear la replicación del DNA, teniendo un efecto citotóxico potencial.¹⁶

- Respuesta SOS en bacterias.

En *E. coli* existe un conjunto de genes no ligados (más de 20) conocido como regulón SOS. Su expresión origina la respuesta del mismo nombre la cual tiene lugar bajo una variedad de estados fisiológicos: a consecuencia de cambios de pH, transición de crecimiento exponencial a estacionario, carencias nutricionales de la célula, así como por tratamiento con agente físicos y químicos.¹⁷

La respuesta SOS garantiza la sobrevivencia celular, elevando los niveles de enzimas de reparación y recombinación, así como la mutagénesis.⁶ Por otra parte, y en respuesta a

mutaciones en ciertos genes, en la célula se observa una inducción crónica (o sub-inducción) de los genes SOS; por lo que se plantea que la expresión del sistema SOS no constituye un intento desesperado de la célula de permanecer con vida, sino más bien una reacción de esta ante la detención de la replicación de su DNA.¹⁸

Para su mejor comprensión, la respuesta SOS se puede dividir en dos vías cuyas enzimas procesan las lesiones del DNA de diferente manera:

- Con alta fidelidad de copia (vía libre de error, para reparación, recombinación y replicación; que emplea primariamente polimerasas no SOS-inducibles como Pol I y Pol III)
- Con baja fidelidad de copia (vía con propensión al error, en la que intervienen tres polimerasas reguladas por SOS como son Pol II, Pol IV y Pol V).

Sin embargo, no hay una separación funcional estricta entre estas vías, por ejemplo, Pol III (vía I) es necesaria para reemplazar la polimerasa propensa al error (vía II) y completar la replicación genómica después que se ha copiado a partir de un DNA con nucleótidos dañados.⁵

En concordancia con su función reparadora general del DNA, el sistema SOS responde a una señal general que es la presencia de DNA de simple cadena (ssDNA) provocada por la acción de cualquier agente que dañe el cromosoma bacteriano. Este ssDNA puede generarse por diferentes vías:

- *SSB que devienen en huecos por acción de las exonucleasas celulares.*
- *DSB que pueden convertirse en regiones de simple cadena por acción de la exonucleasa V (recBCD) que degrada ambas cadenas comenzando por la rotura y continuando hasta encontrar un octámero de secuencia conocido como Chi (5'GCTGGTGG3').*
- *Replicación de cadenas molde de DNA que contengan lesiones. La existencia de dúplex de DNA con huecos en sus cadenas hijas se debe a que Pol III no puede desempeñar su actividad en una cadena molde que presente anomalías en sus bases.¹⁹*

La expresión de los genes SOS esta controlada ajustadamente. Por ejemplo, *sfiA (sulA)* es uno de los genes que se inducen más tardíamente; codifica para una proteína que inhibe la división celular e induce el crecimiento filamentoso de la célula por inhibición de

la polimerización de la proteína *FtsZ*.¹⁸ Los principales genes involucrados en la regulación de la expresión SOS son: *lexA*, *recA* y *dinI*.

- *lexA*.

El gen *lexA* de *E. coli* codifica una proteína de 202 aa y un peso molecular de 22.7 kDa la cual constituye el represor de todos los genes SOS.²⁰

El *lexA* forma dímeros y se autohidroliza a pH básico o en presencia de *recA* como catalizador. El *recA* en su forma activa causa el autoclivaje proteolítico del represor *lexA* por ruptura del enlace Ala₈₄-Gly₈₅ en la estructura de este. Paralelamente, el represor del fago λ , similar en estructura y función a *lexA*, puede sufrir también corte autocatalítico (*recA*-dependiente) por tratamiento de células hospedero portadoras del profago λ con agentes físicos como la luz UV.²⁰

La proteína *lexA* actúa uniéndose a la caja SOS de los genes del mismo nombre. Dicha caja ocupa una sección específica dentro de la región promotora (que funciona como una región operadora) de estos genes y está conformada por un palíndromo perfecto cuya secuencia consenso es: 5'-TACTGT-N₈-ACAGTA-3'. De forma general, cada gen del regulón SOS tiene una sola caja SOS, aunque en algunos casos puede haber dos (*lexA* y *ydjM*) e incluso tres (*recM*) regiones operadoras. Cada una de las bases del motivo consenso tiene un grado diferente de importancia, siendo las más conservadas entre los genes regulados por *lexA*: CTGT-N₈-ACAG. La región específica del operador que se une a esta proteína es CTGTNNNN.^{18, 20}

El represor *lexA* se une a la región operadora de los diferentes genes, lo que sugiere que esta proteína actúa inhibiendo la iniciación de la transcripción, al impedir la unión de la RNA polimerasa. El grado de represión de la proteína *lexA* frente a los diferentes genes es variable y depende de la localización exacta de las regiones operadoras con respecto al inicio de la transcripción (ATG), los posibles cambios de base frente a la caja consenso, el número de cajas presentes y la fuerza de la interacción operador-represor. Por ejemplo, en una célula no inducida y en crecimiento normal algunos de los genes (*uvr*) de este sistema presentan una expresión basal significativa que les permite cumplir con

diferentes funciones vitales para la célula. Por otra parte, genes como *suIA* o el operón *umuCD* tienen mayor afinidad por su represor por lo que son dereprimidos tardíamente (aproximadamente a los 45 min. e haberse inducido la respuesta SOS).^{5,18,20}

- *recA*.

El gen *recA* no forma parte de ningún operón, localizándose en una zona del cromosoma en los que se encuentran los genes de mantenimiento (o "house keeping") y metabólicos, está bloqueado por los genes *recX* y *alaS*. El *recA* mantiene la expresión de la proteína *recA* a un nivel basal relativamente alto entre 1000 y 10 000 monómeros por célula. Sin embargo, en estado inducido esta cifra aumenta considerablemente.¹⁸

Los monómeros de *recA* son polipéptidos de 352 aa. Estos se encuentran empaquetados en los cristales purificados de esta proteína, formando un filamento espiral continuo con seis unidades por vuelta de hélice (de izquierda a derecha). El *recA* forma un filamento helicoidal sobre el ssDNA o un DNA de doble cadena (dsDNA) que presente huecos. El ensamblaje es en dirección 5'→3' con respecto a la cadena simple de DNA, presentándose un monómero por cada tres nucleótidos o pares de bases.³

La nucleación sobre el *ssDNA* (que constituye la forma activa de *recA*, denominada *recA**) es un proceso mucho más rápido que sobre el *dsDNA*, siendo el sitio más efectivo el hueco de simple cadena en el DNA. La nucleación no aumenta por el daño en el DNA como se ha sugerido en ocasiones, sino por las perturbaciones (particularmente desenrollamiento del dúplex) en la estructura del DNA que es consecuencia del daño.³

Los filamentos de *recA* pueden unir realmente hasta 3 cadenas de DNA al surco de su hélice presentando tres sitios de unión diferentes. Estos se han denominado simplemente: I, II y III. El sitio I tiene la mayor afinidad por el DNA y es generalmente por donde se une el *ssDNA* a *recA*. El sitio II generalmente es ocupado por una cadena complementaria a la del I, aunque se tolera la presencia de cadenas heterólogas. El sitio III estaría ocupado por una cadena de DNA que se desplaza durante el intercambio de recombinación. La cadena que ocupa el sitio de unión a *recA* que normalmente le corresponde al *ssDNA* (sitio I) está protegido de la actividad nucleasa 2 ó 3 veces más

que su complementaria (sitio II). Por otra parte, el desensamblaje del filamento de *recA* dependiente del extremo, ocurre en el sitio opuesto al del ensamblaje.³

Se considera la formación del filamento *recA-ssDNA* como la base estructural o “punto común” del que parte la activación de procesos aparentemente tan desvinculados como la reparación por recombinación, la inducción SOS y la mutagénesis SOS.⁵

- Reparación por recombinación.

Este es un proceso que se dispara cuando en el DNA hay lesiones frente a las que Pol III no puede continuar su funcionamiento normal y tiene que “saltar”, dejando un hueco de unos 1000 pares de bases en la cadena que estaba replicando (cadena hija). Por esta razón no se podrá realizar una reparación por replicación al no contarse con una cadena molde intacta. Mediante la reparación por recombinación la célula es capaz de reconstituir la cadena hija con huecos y, después de ello, realizar la reparación de las lesiones mediante las vías convencionales.

El papel de *recA* durante la reparación por recombinación consiste en juntar dos moléculas homólogas de DNA y promover el intercambio entre ellas. La unión de la primera cadena puede tomarse como unión primaria, incluyendo lo mismo *ssDNA* en el sitio I que *dsDNA* en el sitio I y II. La unión de un segundo DNA puede tomarse como unión secundaria. Cuando se une *ssDNA* al sitio I, la unión secundaria puede contemplar *dsDNA* que ocuparía los sitios II y III. El *recA* promueve eficientemente una reacción de intercambio de 4 cadenas, pero el apareamiento inicial siempre se inicia en el contexto de un hueco de simple cadena. Es decir, que los intercambios de cuatro cadenas deben iniciarse como reacciones de tres.³

En este proceso intervienen además las vías *recF*, *recBCD* y los productos de expresión de los genes *ruvABC* y *recG*.

- Mutagénesis SOS.

La mutagénesis SOS ocurre durante la síntesis post-lesión a cargo de la DNA polimerasa V (Pol V) y es consecuencia de la reparación del DNA con tendencia al error. Este es un mecanismo relacionado directamente con el sistema SOS. Tiene lugar cuando el nivel de

daño en el DNA es muy alto y permite a la célula reanudar la replicación sin haber reparado todas las lesiones primarias y eficientemente.⁶

La enzima Pol V está constituida por las subunidades $Umu(D')_2C$ que se expresan a partir del operón *umuCD* regulado por *lexA*. El *umuC* contiene el dominio catalítico de esta enzima la cual está esencialmente fuera de servicio en ausencia de *recA*. Esta polimerasa actúa de conjunto con *recA**, las proteínas SSB, ATP y el complejo β y γ de Pol III tiene N como característica un alto rango de error durante la polimerización (entre 10^{-3} y 10^{-4} /por par de bases incorporadas).^{5,6}

El papel de *recA** durante la síntesis post-lesión es múltiple actuando por ejemplo como coproteasa que cataliza el autoclivaje de *UmuD* a *UmuD'*. Por otra parte, se plantea que *recA** podría funcionar como un cebo que sitúa a las proteínas *Umu* frente al *ssDNA* lesionado que no ha podido replicarse o bien que la proteína *UmuD* y la molécula de DNA podrían estar compitiendo por la misma región de unión en el filamento nucleoproteico de *recA*.^{5,6}

La regulación del nivel de Pol V es especialmente importante porque su actividad resulta nociva para la célula. Su acceso al DNA está modulado por la combinación de una inducción SOS tardía, el procesamiento postraslacional de *UmuC* por las proteasas Lon y ClpXp y por el clivaje de *UmuD* a *UmuD'* por parte de *recA**, lo que hace del complejo ($UmuD'_2C$) una polimerasa activa.⁵

Recientemente, se ha planteado que todas las DNA polimerasas SOS inducibles pueden estar involucradas en la mutagénesis inducida y que esto depende de la naturaleza de la lesión en el DNA y del contexto de su secuencia. Las polimerasas SOS-inducibles no son procesativas, sino distributivas. Sintetizan sólo un pequeño fragmento de 6 a 8 nucleótidos a lo largo de la lesión no codificadora para ser luego liberadas y sustituidas por Pol III.² Sin embargo, hasta el momento no se conoce con exactitud la necesidad de la interacción de estas con *recA* durante la síntesis post-lesión.⁴

- dinl .

El "apagado" de la maquinaria SOS es un paso importante en la regulación de la respuesta SOS. Este garantiza la progresión normal de la replicación, reduce la alta

mutabilidad y revierte la filamentación celular; lo que contribuye a mantener la eficiencia energética.²¹ El producto génico del gen *dinI* interviene directamente en este proceso.

El *dinI* no inhibe la inducción de la Respuesta SOS por competencia por el *ssDNA* con *recA*, más bien compete con el DNA por el sitio catalítico que este ocupa en *recA*. El sitio activo de *dinI* (extremo C-terminal) mimetiza las cargas negativas de la molécula de DNA, actuando esencialmente como un competidor con el DNA por *recA*.²²

- Otros genes involucrados en la respuesta SOS.

Genes *uvr*.

La radiación UV (254 nm) produce dos tipos de lesiones primarias en el DNA: dímeros de pirimidina (*cys*) *syn*-ciclobutano y el fotoproducto pirimidina-6-4-pirimidona el cual causa una distorsión estructural mayor. Ambos dímeros son intracatenarios y se forman por exposición a la luz solar. Lesiones voluminosas como estas, capaces de bloquear la progresión de la maquinaria de replicación, también pueden ser provocadas por agentes químicos como es el caso del benzo-amino-pireno.⁴

Inicialmente se relacionó al mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) con la eliminación de daños de esta naturaleza, capaces de provocar una distorsión considerable en la molécula de DNA.²³ Sin embargo, recientes evidencias han demostrado que NER también interactúa con daños oxidativos en el DNA. Ejemplo de ello son la glicol-timina y los sitios AP los cuales presuntamente sólo provocan distorsiones menores en la molécula.²⁴

La principal diferencia entre el modo de operación de la reparación por escisión de bases y NER estriba en que la escisión de bases incluye sólo el corte y reparación del nucleótido dañado mientras que NER implica la escisión del nucleótido dañado y de varios de los adyacentes.²³ La ejecución de NER incluye la expresión de al menos seis productos génicos diferentes: *UvrA*, *UvrB*, *UvrC*, *UvrD* (o DNA helicasa II), DNA Pol I y una ligasa.²⁵

La proteína *UvrA*, en particular, contiene dos sitios de unión al ATP y tres motivos estructurales adicionales (dos motivos en forma de dedos de Zinc y otro en forma de hélice) los cuales, se plantea, se requieren para el reconocimiento de las lesiones en el DNA. El *UvrA* se expresa constitutivamente en *E. coli* a razón de 25 monómeros por

célula; sin embargo, después de la inducción SOS su nivel aumenta a la cifra de 250 moléculas por célula. Por su parte, las proteínas *UvrB* y *UvrD* también se inducen durante la respuesta SOS; lo que no sucede en el caso de *UvrC*.²⁶

Genes *recBCD*.

La vía principal de recombinación en *E. coli* es la ruta *recBCD*, involucrada en la recombinación por transducción y conjugación, reparación del DNA y degradación del DNA foráneo.²⁷

La ruta *recBCD* es esencial para la iniciación de la recombinación homóloga de moléculas lineales de DNA en *E. coli*. *recB*, *recC* y *recD* son subunidades de la nucleasa multifuncional *recBCD* (exonucleasa V) la cual presenta actividad DNA helicasa ATP dependiente, endonucleasa Chi específica, exonucleasa sobre *dsDNA* y exonucleasa sobre *ssDNA*.¹⁹

El *recBCD* se une a los extremos de *dsDNA* y emplea la energía de hidrólisis de ATP para desenrollar la molécula.²¹ Esta enzima reconoce específicamente los extremos romos o cercanamente romos del *dsDNA* y los degrada hasta encontrar una secuencia Chi. Reconocida Chi, ocurre una atenuación de la actividad nucleasa de *recBCD*, pero no de su actividad helicasa. Se considera que la actividad helicasa de *recBCD* es esencial para la iniciación de la recombinación homóloga al generar extremos de simple cadena en el DNA que pueden ser asimilados en un dúplex homólogo mediante la acción de la proteína *recA*. Por ello, podemos plantear que Chi estimula la recombinación homóloga mediada por *recBCD*.²⁸

Otras observaciones interesantes relacionadas con el complejo *recBCD* incluyen su intervención en la supresión de la replicación lítica del fago λ y del P22, la supresión de la replicación en círculo rodante de los plásmidos y el predominio de su acción en la región terminal del cromosoma. También es de notar, por razones hasta ahora no definidas, que las secuencias Chi están orientadas predominantemente en la dirección de progresión de la horquilla y que ese predominio es más pronunciado a medida que se acerca el origen de replicación del cromosoma.⁴

La reparación eficiente de DSB requiere de la inducción de la respuesta SOS.²¹ En estas condiciones la función de Chi es inhibida parcialmente y por ello no puede ocurrir eficientemente la atenuación de la actividad nucleasa *recBCD* (los sitios Chi están sobrepresados en el cromosoma de *E. coli*, presentándose uno por cada cuatro kb como promedio). En su lugar se inducen inhibidores de la nucleasa *recBCD* que convierten la enzima en una helicasa sin actividad degradativa del DNA.

Genes rector.

Además de *recA*, se han identificado otros productos génicos que interactúan con la horquilla de replicación después que la célula ha sufrido la acción de agentes genotóxicos. En esta categoría se incluyen los constituyentes de la ruta *recF*, *recF*, *recO* y *recR*.^{4, 21}

Existen otras proteínas relacionadas con la vía *recF* y con el procesamiento de las horquillas de replicación que se encuentran detenidas por la presencia de lesiones en el DNA.²⁸ Por ejemplo, la degradación del DNA naciente de una horquilla, que ocurre en células salvajes de *E. coli* y más extensamente en sus mutantes *recF*, *recO* o *recR*, depende de la acción combinada de *recQ* (helicasa 3'→5') y *recJ* (exonucleasa de simple cadena 5'→3').⁴

Las mutaciones lo mismo en *recQ* que en *recJ* alteran la frecuencia y los sitios en los cuales ocurre la recombinación en el cromosoma. De la misma forma, los homólogos de *recQ* en levadura, *Drosophila melanogaster* y el hombre tienen funciones críticas en el mantenimiento de la replicación procesativa y en la supresión del intercambio de cadenas de DNA. Por esta razón, y tomando en cuenta los resultados alcanzados en estudios de naturaleza similar a los anteriores, se ha sugerido que *recJ* y *recQ* degradan específicamente la cadena retardada en la horquilla cuando está bloqueada la replicación y que la degradación mediada por *recJ* y *recQ* genera un sustrato mucho más extenso sobre el cual *recA* puede unirse y estabilizarse. De esta forma se asegura la reanudación de la replicación a partir del mismo sitio donde ocurrió el desensamblaje.⁴

Gen recN.

Actualmente se plantea que el producto de expresión de *recN* se requiere para la reparación de DSB que resulta del daño en el DNA. No obstante, hasta el momento su función específica no se conoce con claridad;^{18,27} no existiendo siquiera reportes acerca de la actividad *in vitro* de *recN*. Esto se debe a que esta proteína es prácticamente insoluble y bastante difícil de trabajar. Las preparaciones parcialmente purificadas de *recN* presentan una débil actividad ATPasa y cierto grado de actividad nucleasa. Sin embargo, la pureza de estas muestras no ha sido la suficiente como para atribuir estas funciones directamente a *recN*.³

La secuencia aminoacídica de *recN* guarda relación con la de las proteínas eucarióticas Smc. Esta familia de proteínas cumple con varias funciones relacionadas con el mantenimiento de la integridad cromosómica, como lo es por ejemplo garantizar la condensación del cromosoma. La estructura terciaria predicha para estas proteínas contiene dos dominios (supuestamente asociados con una función ATPasa) conectados por un eje principal.³ Por ello, se ha sugerido que, durante la recombinación homóloga, RecN pudiese tener una función enzimática, estructural o ambas. Adicionalmente, se ha planteado que RecN pudiese estar involucrada en posicionar adecuadamente los segmentos de DNA recombinante, garantizando el curso normal del proceso de recombinación.^{18,27}

- Ensayos bacterianos basados en fusiones transcripcionales de genes SOS.

Los ensayos bacterianos basados en fusiones transcripcionales de genes SOS estiman el nivel de daño primario ocurrido en el DNA por medio de la cuantificación del nivel de expresión de un gen marcador. Dicho gen puede codificar para una proteína fluorescente o una enzima que en presencia del sustrato apropiado desarrolla color o fluorescencia.²⁹

El ensayo SOS Chromotest en específico, consiste en la determinación cuantitativa del nivel de inducción de la respuesta SOS a través del monitoreo de la expresión del gen *sfiA*.³⁰ Para registrar la inducción de este gen se tomó la cepa de *E. coli* K12 donde se introdujo la fusión *sfiA::lacZ*. Esta última posibilita que ante la inducción SOS se sintetice β -galactosidasa cuya actividad se cuantifica a través de un ensayo colorimétrico. En la cepa obtenida, denominada PQ37, se realiza la determinación en paralelo de la actividad

fosfatasa alcalina; enzima que se expresa constitutivamente y permite cuantificar la marcha de la síntesis proteica celular.³¹

Este sistema microbiano fue validado por estudios comparativos con el ensayo de Ames y mediante el empleo de una amplia gama de mutágenos conocidos. También ha sido utilizado para estudiar el efecto de la radiación ionizante sobre el ADN y de iones pesados como son: Helio, Berilio, Deuterio y Criptón.³² En este sentido, nuestro laboratorio cuenta actualmente con cepa PQ37, habiéndose empleado adicionalmente en el estudio productos naturales y compuestos con un efecto radioprotector potencial.

En general, los ensayos de inducción de genes SOS como el SOS Chromotest sirven como complemento para el estudio de las bacterias que han sido sometidas a la acción de agentes genotóxicos como la radiación ionizante. Los resultados obtenidos con este tipo de modelo experimental, cuando se combinan con datos de frecuencia mutagénica, letalidad celular y cuantificaciones moleculares de las roturas de cadena del DNA (por sólo citar algunos ejemplos); resultan de gran utilidad al complementar la información acumulada acerca del efecto biológico de las radiaciones ionizantes.³³ Además de ello, la realización de este tipo de ensayo bacteriano presenta ventajas prácticas, al arrojar una respuesta en poco tiempo, ser de fácil ejecución y bajo costo.

- Antimutagénesis y radioprotección.

La antimutagénesis es el proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de mutaciones espontáneas o inducidas. Tomando como referencia este concepto, la acción antimutagénica de un compuesto queda definida como su capacidad para disminuir o evitar el daño mutacional en el DNA de la célula. Por su parte, la radioprotección reside en reducir los efectos biológicos adversos de las radiaciones ionizantes en los organismos vivos.³⁴

Los antimutágenos se pueden clasificar a su vez como desmutágenos o bioantimutágenos. Los desmutágenos interactúan de forma directa con el mutágeno, modificándolo química o bioquímicamente antes de que el mismo alcance la molécula blanco. Los bioantimutágenos constituyen agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del

DNA dañado; implicando una disminución de la frecuencia de las mutaciones espontáneas e inducidas.

Referencias Bibliográficas

1. Radman M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway In *Escherichia coli* : SOS repair hypothesis. In Sherman S, Miller M, Lawrence C, Tabor W H, editors. Mol. asp. of mut. Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1974. p.128-142.
2. Janion C, Sikora A, Nowosielska A, Grzesiuk E. *E. coli* BW535, a triple mutant for the DNA repair genes *xth*, *nth* and *nfo*, chronically induces the SOS response. Env. and Mol. Mut 2003; 41: 237-242.
3. Cox M.M. Recombinational DNA Repair in Bacteria and the RecA Protein. Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol 2000; 63: 311-365.
4. Courcelle J, Hanawalt P.C. RecA-Dependent Recovery of Arrested DNA Replication Forks. Annu. Rev. Gen 2003; 37: 611-646.
5. Tippin B, Pham P, Goodman M.F. Error-prone replication for better or worse. Trends in Microb 2004; 12 (6): 288-295.
6. Janion C, Sikora A, Grzesiuk E. Induction of the SOS Response in Starved *Escherichia coli*. Env. and Mol. Mut 2002; 40: 129-133
7. Gu M.B, Min J, LaRossa R.A. Bacterial bioluminescent emission from recombinant *Escherichia coli* harboring a *recA::luxCDABE* fusion. J. Bioch. Bioph. Meth 2000; 45: 45-56.
8. Alonso A, Fuentes J.L, Prieto E, Sánchez-Lamar A, Ferrer M, Llagostera M. Antigenotoxic Effect of the aqueous Extract of *Phyllanthus orbicularis* HBK in γ -irradiated *Escherichia coli* Cells. Phytother 2005; 10: 15-23.
9. Chow K-H, Courcelle J. RecO acts with RecF and RecR to protect and maintain replication forks blocked by UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. JBC Papers in Press. Published on Nov. 18 as Manuscript M311012200 2003.p.43-45.

10. Breña-Valle M, Serment-Guerrero J. SOS induction in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mut* 1998; 13: 637-641.
11. Dianov G.L, O'Neill P, Goodhead D.T. Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA. *BioEssays* 2001; 23: 745-749.
12. Sutherland B.M, Bennett P.V, Sidorkina O, Laval J. Clustered Damages and Total Lesions Induced in DNA by Ionizing Radiation: Oxidized Bases and Strand Breaks. *Bioch* 2000; 39: 8026-8031.
13. Geogarkilas A G, Bennett P.V, Sutherland B.M. High efficiency detection of bi-stranded abasic clusters in γ -irradiated DNA by putrescine. *Nucl. Acid. Res* 2002; 30(13): 2800-2808.
14. Volkert M.R, Elliott N.A, Housman D.E. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *PNAS* 2000; 97(26): 14530-14535.
15. Ravanat J.L, Martinez G.R, Medeiros M.G, Di Mascio P, Cadet J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Archives of Bioch. and Bioph* 2004; 423: 23-30.
16. Kuipers G.K, Poldervaart H.A, Slotman B.J, Lafleur V.M. The influence of formaamidopyrimidine-DNA glycosylase on the spontaneous and γ -radiation-induced mutation spectrum of the *lacZ α* gene. *Mut. Res* 1999; 435: 141-150.
17. Baverstock K. Radiation-induced genomic instability: a paradigm-breaking phenomenon and its relevance to environmentally induced cancer. *Mut. Res* 2000; 454: 89-109.
18. Janion C. Some aspects of the SOS response system – A critical survey. *Act. Bioc. Pol* 2001; 48(3): 599-610.
19. Volkert M.R, Landini P. Transcriptional responses to DNA damage. *Mic* 2001; 4: 178-185.

- 20.**Casadaban M, Cohen S. Lactose genes fused to an exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76(9):4530-4533.
- 21.**Keller K.L, Overbeck-Carrick T.L, Beck D.J. Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mut. Res* 2001; 486:21-29.
- 22.**Voloshin O.N, Ramirez B.E, Bax A, Camerini-Otero R.D. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA. *Gen. & Dev* 2001; 15:415-427.
- 23.**Kuipers G.K, Slotman B.J, Poldervaart H.A, Van-Vilsteren I.M. The role of nucleotide excision repair of *Escherichia coli* in repair of spontaneous and gamma-radiation-induced DNA damage in the *lacZ α* gene. *Mut. Res* 2000; 460:117-125.
- 24.**Ferrer M, Sánchez-Lamar A, Fuentes J.L, Barbé J, Llagostera M. Studies on antimutagenesis of *Phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mut. Res* 2001; 467: 99-105.
- 25.**Miyabe I, Zhang Q-M, Kano Y, Yonei S. Histone-like protein HU is required for *recA* gene-dependet DNA repair and SOS induction pathways in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Int. J. Rad. Biol* 2000; 76(1): 43-49.
- 26.**Wang J, Grossman L. Mutations in the helix-turn-helix motif of the *Escherichia coli* UvrA protein eliminate its specificity for UV-damaged DNA. *Jour. Of Biol. Chem* 1993; 268(7):5323-5331.
- 27.**Skaar E.P, Lazio M.P, Seifert H.S. Roles of the *recJ* and *recN* in Homologous Recombination and DNA Repair Pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *Jour. of Bact* 2002; 184(4): 919-927.
- 28.**Kogoma T, Cadwell G.W, Bardard K.G, Asai T. The DNA Replication Priming Protein, PriA, Is Required for Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Jour. of Bact* 1996; 1258-1264.

29. Rosen R, Davidov Y, LaRossa R.A, Belkin S. Microbial Sensors of Ultraviolet Radiation Based on *recA* :: *lux* Fusions. Appl. Bioch. and Biot 2000; 89:151-160.
30. Quillardet P, Hofnung M. Le SOS Chromotest: des cellules bactériennes pour détecter et caractériser produits et radiations génotoxiques. Radioprot 1994 ; 29(4):539-557.
31. Laugier J, Ksas B. Entre la dosimétrie physique et la dosimétrie biologique, la dosimétrie d'effets: SOS Chromotest. J. Chim. Phys 1994; 91:1149-1160.
32. Kozubek S, Krasavin E.A, Soska J, Drasil V, Amirtayev K.G, Tokarova B, Bonev M. Induction of SOS response in *Escherichia coli* by heavy ions Mut. Res 1989; 215: 49-53.
33. Koudela K, Ryznar L, Kozubek S, Slotova J. Induction of SOS repair by ionizing radiation. Rad. Env. Biop 1992; 31:343-348.
34. Littlefield L.G, Joiner E.E, Coiler S.P, Sallam F, Frome E.L. Concentration dependent protection against X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by aminothiols WR-1065. Rad. Res 1993; 133:88-93.

Recibido: 11/09/09

Aceptado: 14/09/09