

PARTICIPACIÓN DE DIFERENTES GENES EN LA REPARACIÓN DE RUPTURAS DE DOBLE CADENA EN CEPAS DE *Escherichia coli* EXPUESTAS A RADIACIÓN GAMMA

Jorge Humberto SERMENT GUERRERO*, Estefany MARTÍNEZ MARTÍNEZ y David ALCÁNTARA DÍAZ

Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México

*Autor responsable: jorge.serment@inin.gob.mx

(Recibido mayo 2012, aceptado octubre 2012)

Palabras clave: reparación de rupturas dobles, recombinación, radiación gamma

RESUMEN

Todos los seres vivos están expuestos a la radiación proveniente de diversas fuentes. La radiación ionizante puede dañar al material genético causando rupturas en una o en ambas cadenas, o bien lesiones diversas en las bases. Las rupturas de doble banda (RDB) tienen gran importancia biológica ya que de no eliminarse producen la muerte celular. En *Escherichia coli* este tipo de lesiones se reparan en su mayoría por recombinación homóloga. En el presente trabajo se evalúa la participación de algunos genes de recombinación en la reparación de RDB causadas por radiación gamma. Se expusieron mutantes de *E. coli* defectuosos en genes de recombinación a diversas dosis de radiación gamma y se incubaron por diferentes periodos en condiciones ideales. Para evaluar las RDB se utilizaron tanto la técnica de microelectroforesis como la de electroforesis de campos pulsados. En ambos casos los resultados muestran la cinética de recuperación para cada cepa, lo que refleja la importancia de cada gen en el proceso de reparación de RDB.

Key words: DSB repair, recombination, gamma radiation

ABSTRACT

All living organisms are naturally exposed to radiation from different sources. Ionizing radiation produces a plethora of lesions upon ADN that can be categorized as single and double strand breaks and base damage. Among them, unrepaired double strand breaks (DSB) have the greatest biological significance, since they are responsible of cell death. In *Escherichia coli* this kind of lesions are repaired mostly by homologous recombination. In this work the participation of some recombination genes in the repair of DSB is evaluated. *E. coli* defective strains were exposed to gamma radiation and incubated for different periods in ideal conditions. Both microelectrophoresis and pulse field gel electrophoresis techniques were used to evaluate the kinetics of repair of such lesions, reflecting the importance of each defective gene in the process.

INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos están expuestos a la radiación proveniente ya sea de fuentes naturales (como son los rayos cósmicos o sustancias radioactivas existentes en la tierra, tales como el gas radón), o bien como resultado de diversas actividades humanas que se agregan a la exposición natural (explosiones nucleares, aplicaciones médicas, investigación, etc.). Casi desde el descubrimiento de la radiación se observaron los efectos que ésta tenía sobre los seres vivos; sin embargo, fue a partir de las explosiones de las bombas de Hiroshima y Nagasaki que se despertó una gran inquietud por los daños producidos por este agente. La radiación consiste de partículas subatómicas u ondas electromagnéticas energéticas que viajan a través de un medio o espacio y que cuando chocan con las moléculas de otro material les transfieren su energía. Al hacerlo, dependiendo de la energía que posea o que deposite, puede provocar que los electrones orbitales vibren, que se exciten al pasar a niveles de energía superiores o bien que salgan de su órbita dando lugar a iones. A la radiación que tiene la capacidad de transferir la energía suficiente para que ocurra esto último se le conoce como radiación ionizante. Al incidir sobre las células la radiación ionizante afecta tanto a los componentes estructurales como al material genético, pero mientras que el daño en los primeros es momentáneo (ya que existe la posibilidad de sintetizar nuevas moléculas para reemplazarlas), en el material genético los efectos pueden ser permanentes y traer graves consecuencias a nivel celular, tisular, en los organismos o incluso en la población, por lo que en general cuando se refiere a los efectos de la radiación se considera al ADN como la molécula blanco (Teoulé 1987, Averbek *et al.* 2006).

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

La radiación ionizante puede dañar al material genético causando diversas lesiones en las bases y rupturas en una o en ambas cadenas. Las rupturas de doble banda (RDB) representan uno de los daños más perjudiciales al ADN ya que de no eliminarse producen la muerte celular (Sargentini y Smith 1986). Para reparar estas lesiones la única posibilidad en la

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

En *Escherichia coli* existen dos vías principales de recombinación homóloga, la vía RecBCD y la vía RecFOR, aunque en algunas bacterias existe también la vía RecE que depende de la presencia del profago *rac* (Kuzminov 1999). La más importante es la que lleva a cabo la enzima RecBCD, ya que es la principal responsable de la reparación de rupturas de doble cadena. Esta enzima reconoce los extremos libres parejos o casi parejos de ADN duplex y degrada el extremo 3' hasta encontrar una secuencia específica denominada sitio *chi* (llamado así por sus siglas en inglés *crossover hotspot instigator*, comúnmente representado con la letra griega χ), en donde el complejo RecBCD se detiene, cambia de polaridad y degrada preferentemente el extremo 5', de modo que se genera una cadena libre terminada en 3'. Al mismo tiempo la enzima promueve la polimerización de RecA sobre esta cadena, iniciando el apareamiento con una secuencia homóloga y el intercambio de bandas de ADN. Posteriormente la polimerasa I del ADN sintetiza la parte faltante (Dillingham y Kowalczykowski 2008).

La vía RecFOR por su parte se encarga de la recombinación en tramos de ADN de cadena sencilla (huecos). Cabe mencionar que estos huecos pueden formarse por la actividad de nucleasas como RecJ o Exo I a partir de cortes de cadena sencilla o bien por la interrupción de la síntesis de ADN. Al formarse este tipo de estructuras la enzima SSB (por sus siglas en inglés *single-strand binding protein*) se pega a ellas para protegerlas y darles estabilidad; sin embargo, esta actividad interfiere con la formación del filamento de RecA sobre el ADN. Posteriormente el complejo FOR (formado por las subunidades RecF, RecO y RecR) estimula precisamente el desalojamiento de SSB del ADN y promueve la entrada de RecA, que realiza el intercambio con la secuencia homóloga de otra molécula de ADN (Umezu y Kolodner 1993, Umezu y Kolodner 1994).

Como ya se mencionó, las rupturas de doble banda tienen gran relevancia biológica ya que de no repararse son responsables de la muerte celular y por ello es importante contar con técnicas para evaluarlas. En el presente trabajo se estudió la importancia de diferentes genes de recombinación (*recB*, *xonA*, *recJ* y *recO*) en la reparación de rupturas dobles, en cepas de *E. coli* defectuosas en dichos genes, mediante las técnicas de microelectroforesis unicelular (ensayo cometa) y electroforesis en campos pulsados.

METODOLOGÍA

Las cepas utilizadas en el presente trabajo forman parte de la colección del laboratorio de Genética Microbiana del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y se enlistan en el **cuadro I**. Se utilizaron cepas con defectos en uno o dos de los genes de recombinación arriba mencionados.

Cultivo e irradiación de las bacterias

Se tomó una alícuota de un cultivo en fase estacionaria, se diluyó 50 veces en caldo de Luria-Bertani (LB) y se incubó hasta alcanzar la fase logarítmica

media de crecimiento, que corresponde a una concentración de aproximadamente 2×10^8 células/mL ($Abs_{600} = 0.5$). Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos, se resuspendió el botón en amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7, se tomaron alícuotas de 1 mL y se expusieron a diferentes dosis de radiación gamma en un irradiador Gammacell ^{60}Co . Posteriormente, las suspensiones bacterianas se centrifugaron, se resuspendieron los botones en LB y se incubaron a 37 °C. Se tomaron muestras de cada tratamiento a diferentes intervalos de tiempo (de 5 a 80 minutos) y se analizó la fragmentación del ADN mediante la técnica de microelectroforesis unicelular y electroforesis de campos pulsados (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*).

Microelectroforesis unicelular

Las bacterias se mezclaron con un volumen igual de una solución de agarosa 1 % y de esta mezcla se formó una capa de agarosa sobre portaobjetos preparados previamente con una capa de agarosa al 0.5 % que se dejó secar toda la noche. Se agregaron 80 μ L de la primera solución de lisis (0.25 % SDS, lisozima 0.5 mg/mL, ribonucleasa 5 mg/mL) y se incubaron en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37 °C. Se agregó el mismo volumen de una segunda solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris pH10, 1 % de TritonX-100) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se sumergieron los portaobjetos en un amortiguador de digestión (2.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.4) con proteinasa K (1 mg/mL) durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente en amortiguador de corrimiento (500 mM de acetato de sodio y 100 mM de Tris, pH 9) dentro de una cámara de electroforesis. Se ajustó el volumen para dar una corriente de 100 mA durante 60 minutos a 4 °C. Se retiraron los portaobjetos, se sumergieron en una solución 1M de acetato de sodio/etanol (5 mL de acetato de sodio 5M en 45 mL de etanol absoluto) durante 30 minutos y se transfirieron a etanol al 70 %, durante 15 minutos. A cada preparación se le agregaron 50 μ L de una solución 1 mM. de YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum

CUADRO I. CEPAS DE *Escherichia coli* UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

Cepa	Genotipo	Origen
PQ30	F ⁻ , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>his</i> , <i>pyrD</i> , <i>thi</i> , <i>trp</i> ::MuC ⁺ , <i>srl</i> ::Tn10, <i>rpoB</i> , <i>sfiA</i> ::MuD(Ap <i>lacZ</i>), <i>cts</i> , <i>lac</i> Δ U169, <i>galE</i> , <i>galY</i> , <i>phoC</i> .	Quillardet y Hofnung 1985
IN602	Igual a PQ30 pero <i>zga</i> ::Tn10, <i>recB</i>	Breña y Serment 1998
IN237	Igual a PQ30 pero <i>recO</i> ::Tn5	Breña y Serment 1998
IN400	Igual a PQ30 pero <i>recJ</i> ::Tn10	Breña y Serment 1998
IN900	Igual a PQ30 pero <i>DxonA</i> ::cam	Serment <i>et al.</i> 2008
IN901	Igual a PQ30 pero <i>DxonA</i> ::cam, <i>recJ</i> ::Tn10	Serment <i>et al.</i> 2008

oxazole yellow homodimer) o bromuro de etidio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 minutos, se enjuagaron con PBS y se observaron al microscopio. Se contaron 250 células por preparación (Singh *et al.* 1999).

Electroforesis de campos pulsados

A partir de una colonia bacteriana se hizo un cultivo de 16-20 horas en caldo LB y de este cultivo se tomaron alícuotas de 1 mL; cada una se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM. Se conservaron los tubos en hielo y se expusieron a diferentes dosis de radiación gamma. Posteriormente una fracción se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200 μL de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 1 % a 37 °C. Los botones se repartieron en los moldes para formar pequeños bloques de agarosa usados con el equipo de electroforesis por pulsos (PFGE) y el resto del cultivo se resuspendió en 1 mL de LB y se incubó a 37 °C durante diferentes periodos. Posteriormente se centrifugó nuevamente, se resuspendieron las bacterias en ABPF y se formaron los bloques como se indicó anteriormente.

Lisis celular

Este procedimiento fue adaptado a partir del trabajo de diversos autores (Chang y Taylor 1990, Barrett *et al.* 1994, Johnson *et al.* 1995, Matushek *et al.* 1996, Sheneman y Katz 2003). Los bloques de agarosa se colocaron dentro de microtubos con 1 mL de solución de lisis (100mM Tris HCl, 100mM EDTA, 20 mM NaCl, 1 % SDS, pH \approx 10.0) adicionados con lisozima (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 1 hora a 50 °C; pasada la hora, se retiró la solución de lisis y se lavaron los bloques dos veces con Tris-EDTA (TE) (20 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, pH \approx 8.0), por 10 minutos para cada lavado. Después se agregó 1 mL de solución de lisis (pH \approx 7.5) adicionada con proteinasa K (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó durante 1 hora a 50 °C, para nuevamente realizar los dos lavados bajo las mismas condiciones. Las muestras se conservaron en TE a 4 °C.

Determinación de rupturas de doble banda (RDB) por electroforesis de campos pulsados (PFGE)

En un gel de agarosa al 1 %, se introdujeron las muestras (bloques) en los pozos y se selló cada uno de ellos con agarosa de bajo punto de fusión al 1 %. Como testigo se añadió un marcador de peso molecular de ADN (Pulse Marker 0.1-200kb-Sigma-). Se colocó el gel en el equipo Chef- Dr® III (Bio-Rad),

se agregó el amortiguador (TBE 0.5x) y se corrió por 18 horas a 6V con periodos de cambio de 40 segundos y ángulo de 120°. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos, se colocó en un transiluminador de UV, se documentó y se analizó mediante el software Quantity One® de Bio-Rad, que permite medir la intensidad luminosa de cada carril respecto a una distancia relativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microelectroforesis

La técnica original de microelectroforesis unicelular neutra en bacterias propone el uso del colorante fluorescente YOYO para teñir el ADN en las preparaciones; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales y con las dosis utilizadas, las imágenes que se obtenían eran muy confusas; por ello se probó en su lugar el bromuro de etidio. Bajo el microscopio se identificaron tres distintas morfologías (**Fig. 1**), cuyo porcentaje variaba en función de la dosis, que se utilizaron como parámetros para evaluar el grado de fragmentación (rupturas dobles), así como la reparación de los daños. Para verificar que estas morfologías estaban asociadas a RDB se hicieron experimentos con la enzima de restricción *XbaI*, utilizando una concentración relativamente baja (0.01 unidades por laminilla) y diferentes tiempos de incubación (5, 10, 20 y 40 minutos). Se observaron las mismas morfologías que con la radiación y que variaba la proporción de éstas conforme transcurría el tiempo de incubación, lo que nos confirmó que dichas morfologías estaban asociadas a RDB.

En los diagramas de barras (**Fig. 2**) se presentan los niveles de fragmentación de ADN en función de la dosis y el tiempo de incubación postirradiación. Al extremo izquierdo se aprecian dichos niveles de fragmentación al tiempo 0 y se puede notar que en todas las cepas aumenta con la dosis. Cabe hacer notar que en los testigos sin irradiar hay ADN fragmentado lo que posiblemente se deba a que los cultivos están en fase de crecimiento logarítmico y este daño aparente es reflejo de las rupturas que se producen durante la replicación normal del ADN. A medida que pasa el tiempo y que hay oportunidad de eliminar el daño, se observa que en la cepa de referencia PQ30, las rupturas producidas por la radiación gamma desaparecen gradualmente conforme aumenta el periodo de incubación y a los 80 minutos incluso a la dosis más alta (100 Gy), prácticamente desaparecen. En cambio en todas las demás, especialmente en el mutante doble

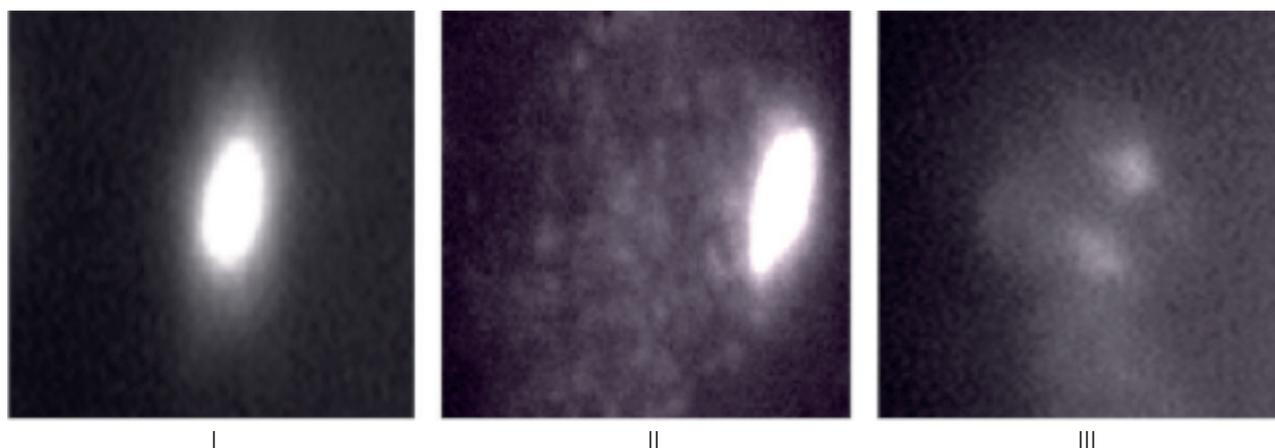


Fig. 1. Diferentes morfologías observadas bajo el microscopio, obtenidas mediante la técnica de microelectroforesis. Se asoció cada una de estas morfologías con diferentes niveles de daño. I) Bacteria sin daño; II) fragmentación (cometa real); III) fragmentación severa. Se observaron estas mismas morfologías al tratar al ADN con la enzima de restricción XbaI y su frecuencia variaba en relación con la concentración y el tiempo de incubación utilizados

recJ,xonA y en la cepa deficiente en *recB* se observan en abundancia las morfologías IV y V que persisten al transcurrir el tiempo, lo que pone de manifiesto la importancia de todos estos genes en la reparación de RDB. Como era de esperarse, en la cepa *recB* no hay una reparación importante ni siquiera al tiempo de incubación mayor, ya que el producto de este gen es el encargado del inicio del proceso de recombinación. A la dosis más alta, el porcentaje de células que han reparado el daño coincide con los datos de letalidad ya existentes en el laboratorio (**Fig. 3**), lo que apoya la idea de que los cometas efectivamente reflejan RDB y que son estas lesiones no reparadas las responsables de la muerte celular.

En la cepa defectuosa en *recO* se observa que a los 80 minutos de incubación hay una disminución importante en la frecuencia de las morfologías asociadas a fragmentación, si bien no es tan marcada como en la cepa silvestre. El producto de *recO* forma parte del complejo enzimático RecFOR, que desplaza a la enzima SSB cuando se une a ADN de una hebra y promueve la entrada de RecA para que pueda llevarse a cabo la recombinación. Esto sugiere que, si bien sí tiene una participación en la eliminación de RDB, la vía RecF no es la principal opción para reparar RDB. En las cepas *recJ* o *xonA* también se observa reparación, sin embargo esto ocurre más lentamente que en PQ30 (*wt*) o IN237 (*recO*). Ambos genes codifican para exonucleasas que están involucradas en diversos procesos de reparación, como la reparación por escisión de bases o en eventos de recombinación. Se ha propuesto que el producto de estos genes “rasura” RDB con extremos dispares para que las pueda reconocer RecBCD. El que no actúen estas enzimas

retrasa considerablemente el proceso de reparación, sin embargo la célula es capaz de sobreponerse. El doble mutante *recJ,xonA* (IN901) confirma lo anterior, ya que se observa un comportamiento similar al de la cepa *recB*, lo que apoya la idea de la participación de estas exonucleasas en la preparación del sustrato para RecBCD.

Electroforesis de campos pulsados

Para evaluar estos experimentos se tomó la intensidad de fluorescencia por carril y se calculó la distribución del porcentaje en tres diferentes regiones conforme a lo reportado por Handa y Kobayashi (2001) y que corresponde a tres tipos de conformación de ADN de acuerdo con la región del gel en la que se encuentre: Circular, ADN lineal de alto peso molecular y fragmentos de ADN (**Fig. 4**). El ADN circular se queda atrapado en las ramificaciones de la agarosa en el momento de formarse los bloques (Beverly 1988, Birren y Lai 1993); el ADN lineal de alto peso molecular (DLAPM) como consecuencia de una ruptura doble sale de los pozos y forma una banda muy ancha e intensa un poco más adelante, mientras que los fragmentos más pequeños migran más allá a lo largo del carril (Kusano *et al.* 1995, Naito *et al.* 1995).

En los experimentos sin incubación podemos observar que el grado de fragmentación aumenta conforme aumenta la dosis de exposición para todas las cepas; sin embargo, se observa una diferencia entre las cepas de acuerdo con el gen de reparación defectuoso. Así, la cepa con menor fragmentación fue la silvestre, mientras que la que presenta mayor grado de fragmentación fue IN602, defectuosa en

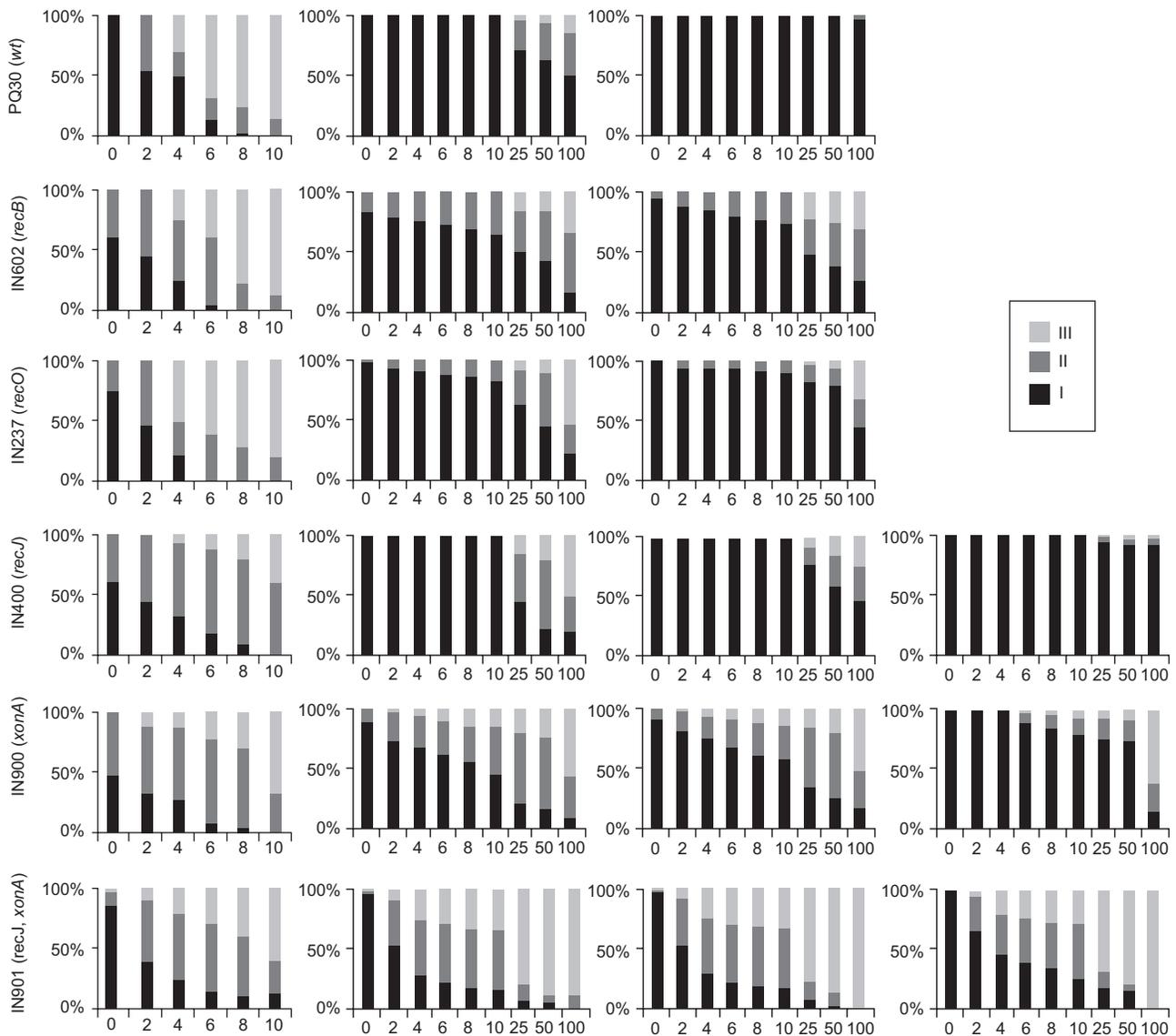


Fig. 2. Frecuencia de morfologías de acuerdo a la dosis y tiempo de incubación. En el eje de las abscisas se representan las diferentes dosis en Gy utilizadas

recB, lo que sugiere que ya desde el principio ha ocurrido cierto grado de reparación (**Fig. 5**). Esto concuerda con reportes anteriores que indican que estos mecanismos de recombinación se encuentran presentes dentro de la bacteria como genes “de mantenimiento” (*housekeeping*) y empiezan a funcionar en el momento mismo en que ocurre una lesión (Kuzminov 1999, Cox *et al.* 2000).

En cuanto a los experimentos de cinética de reparación, los resultados de las electroforesis en campos pulsados nos muestran un comportamiento muy similar a lo observado en la microelectroforesis. En la **figura 6** se observa que al aumentar el tiempo de incubación postirradiación, la intensidad a lo largo

del carril disminuye y se concentra en ciertas zonas (bandas), lo que indica la reparación de las RDB. En la cepa silvestre (PQ30) la intensidad es menor con respecto a las demás, pues al poseer todos sus mecanismos de recombinación intactos, es capaz de reparar eficientemente las lesiones y eliminar casi por completo las rupturas.

Para la cepa IN237 *recO* puede verse que para las dosis más altas (100 y 150Gy) y al tiempo de incubación más corto, la intensidad es alta y al aumentar el tiempo, su intensidad disminuye drásticamente. Esto confirma lo reportado recientemente por Handa y colaboradores (2009), en donde a partir de extractos de las diferentes proteínas pertenecientes

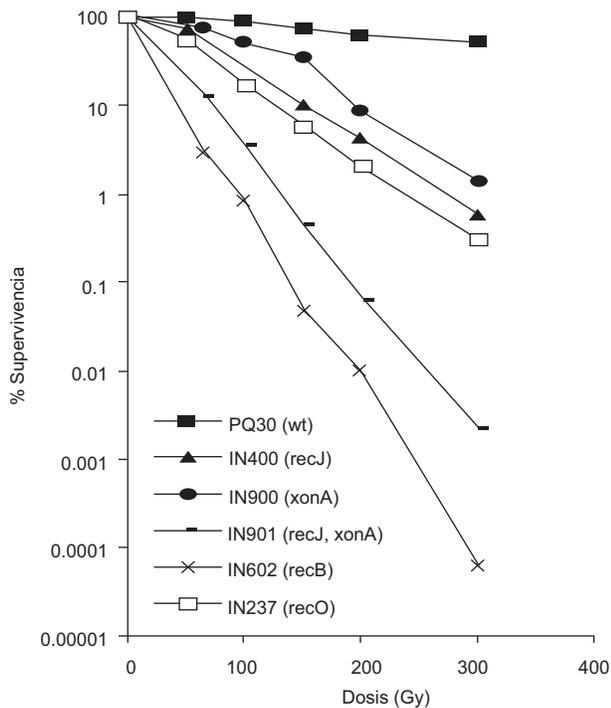


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de las cepas utilizadas al exponerse a diferentes dosis de radiación gamma

a la vía RecF sugieren que RecO junto con RecR, RecF y RecJ pueden participar en la reparación de rupturas dobles de un modo similar al que realiza el grupo epistático Rad52 en levaduras y otros eucariontes. Los autores proponen que Rad52 y RecO son homólogos funcionales ya que facilitan el reconocimiento y unión de RecA o de su homólogo Rad51 sobre ADN de cadena sencilla sustituyendo a SSB (o RPA) con lo que se genera un filamento nucleoprotéico que permite la recombinación homóloga y por ende la reparación de rupturas dobles. Del mismo modo parece haber una similitud entre las funciones de RecF y RecR y las de Rad55/57, así como de RecJ y ExoI.

En las cepas con defectos en las exonucleasas de cadena sencilla RecJ (IN400) y ExoI (IN900), se observa un efecto muy similar entre sí. A los 20 minutos de incubación aún permanece una buena parte de las rupturas, pues la fragmentación de ADN es muy notoria (intensidad); sin embargo, a pesar de que la reparación es más lenta se puede apreciar que en el periodo de incubación más largo las bacterias logran eliminar la mayor parte de las rupturas. En el mutante doble *recJ, xonA* (IN901) se observa

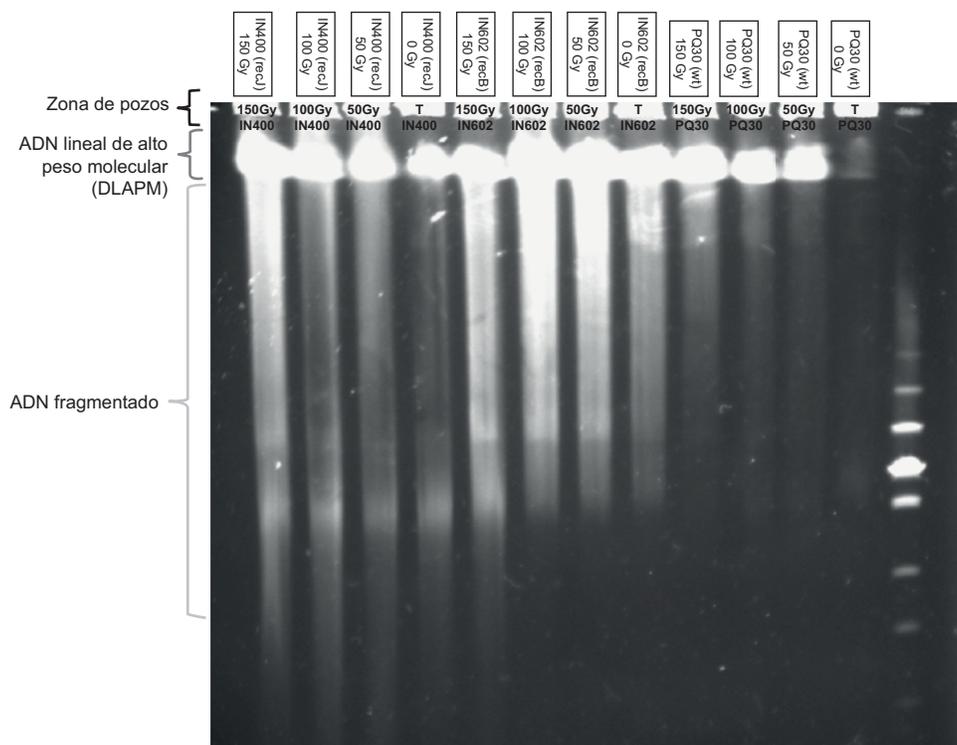


Fig. 4. Corrimiento de muestras de bacterias expuestas a diferentes dosis de radiación gamma en un gel de agarosa. Se muestran las distintas zonas consideradas para el análisis de las muestras: Zona de pozos, ADN Lineal de Alto Peso Molecular (DLAPM) y ADN fragmentado

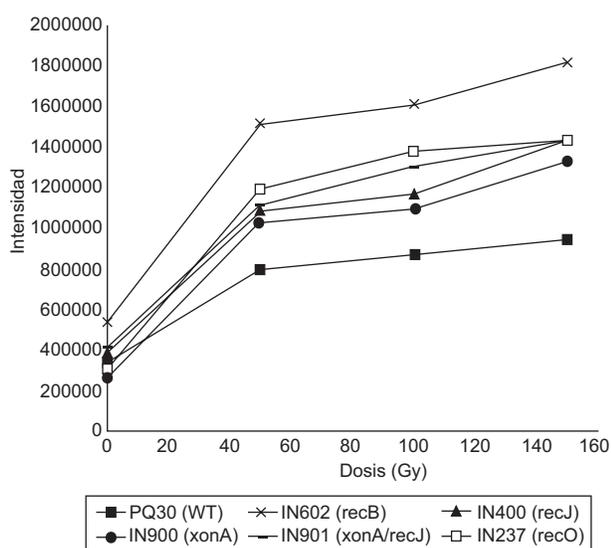


Fig. 5. Fragmentación de ADN para cada cepa a las diferentes dosis de radiación. Los datos representan la sumatoria de la intensidad de fluorescencia presente en la zona de ADN fragmentado

un sinergismo dado por ambos defectos, de manera que ni aún en el tiempo de incubación más largo se eliminan las rupturas. Una limitante para el complejo enzimático RecBCD es que sólo reconoce rupturas dobles parejas, así que para poder reparar las que no tienen este tipo de estructura, es necesario que tales extremos colgantes se emparejen y tal es la actividad que al parecer llevan a cabo exonucleasas como ExoI (*xonA*) y RecJ (*recJ*) (Thoms y Wackernagel, 1998). Los resultados con el mutante doble *recJ*, *xonA* IN901 apoyan lo anterior pues se observa que la intensidad de los carriles correspondientes a las dosis de 100 y 150 Gy son muy altas (similares a las observadas en IN602 *recB*) y no disminuye con el tiempo de incubación, lo que indica que el daño no se elimina. Esto concuerda con los datos de supervivencia en los que se puede ver que al faltar ambas enzimas aumenta notablemente la letalidad con respecto a la cepa silvestre.

En la cepa IN602 se observa que la reparación del daño es muy deficiente incluso a los tiempos de incubación más prolongados (60 minutos), lo que pone de manifiesto la importancia que tiene *recB* en la reparación de este tipo de lesiones. En *Escherichia coli* la reparación de rupturas dobles se lleva a cabo principalmente por el mecanismo de recombinación homóloga, de tal modo que el ADN se restaura en la forma correcta y no se generan translocaciones en las que también se logra restaurar la continuidad de la molécula pero de una manera incorrecta. Los extremos de ADN en las rupturas

dobles se unen en la forma correcta a través de la participación de regiones de ADN homólogas no dañadas. En términos generales el proceso ocurre así: RecBCD se une a uno de los extremos de la ruptura doble y comienza a degradar la cadena de ADN (liberando nucleótidos si es en el extremo 3' ó bien oligonucleótidos si es en el 5') hasta encontrar una secuencia específica conocida como sitio χ . A partir de aquí se inactiva RecD y RecBC sigue funcionando como helicasa que en el extremo 3' promueve la entrada de RecA formando un filamento nucleoprotéico que se puede intercambiar con la secuencia homóloga de otra molécula de ADN de cadena doble (Anderson y Kowalczykowski 1997, Dillingham y Kowalczykowski 2008). Así, la cepa *recB* IN602 tiene sensibilidad muy alta a la radiación gamma, debido a que es incapaz de iniciar este proceso de recombinación homóloga, lo que coincide con reportes previos (Sargentini y Smith 1986, Brčić-Kostić *et al.* 1991)

Dentro de la bacteria con frecuencia se producen rupturas de doble banda durante la replicación del ADN y para que se reinicie este proceso es necesaria la participación de los diferentes sistemas de recombinación, por lo que, como se había mencionado antes, se considera a éstos como de mantenimiento. Las deficiencias en estos sistemas hacen que la reactivación de las horquillas de replicación, y por lo tanto el crecimiento de los cultivos, sea más lenta en relación con una cepa silvestre. En la **figura 7** se muestra la cinética de crecimiento de cultivos sin irradiar de las diferentes cepas utilizadas. Durante su progresión las horquillas de duplicación frecuentemente encuentran lesiones que las inactivan; éstas aparecen ya sea durante condiciones normales de crecimiento aerobio o bien por la exposición a agentes que dañan al ADN. Cuando son cortes en la cadena se convierten en rupturas dobles que son reparadas principalmente por la vía RecBCD, mientras que si encuentran otro tipo de lesiones, estas podrían detener la actividad de la polimerasa III de modo que se formaría un hueco que sería reparado principalmente por la vía RecFOR. En ambos casos intervendrían mecanismos de recombinación ya sea para reparar la ruptura doble o bien para reactivar las horquillas y reiniciar la síntesis de ADN. Los defectos en genes de las distintas vías de recombinación suponen un retardo en la reactivación de las horquillas (o incluso la muerte de las células) lo que llevaría un retardo en el crecimiento de los cultivos. La ausencia de RecO hace que los huecos (gaps) permanezcan por más tiempo y que eventualmente se conviertan en RDB que finalmente podrían repararse por la vía RecBCD.

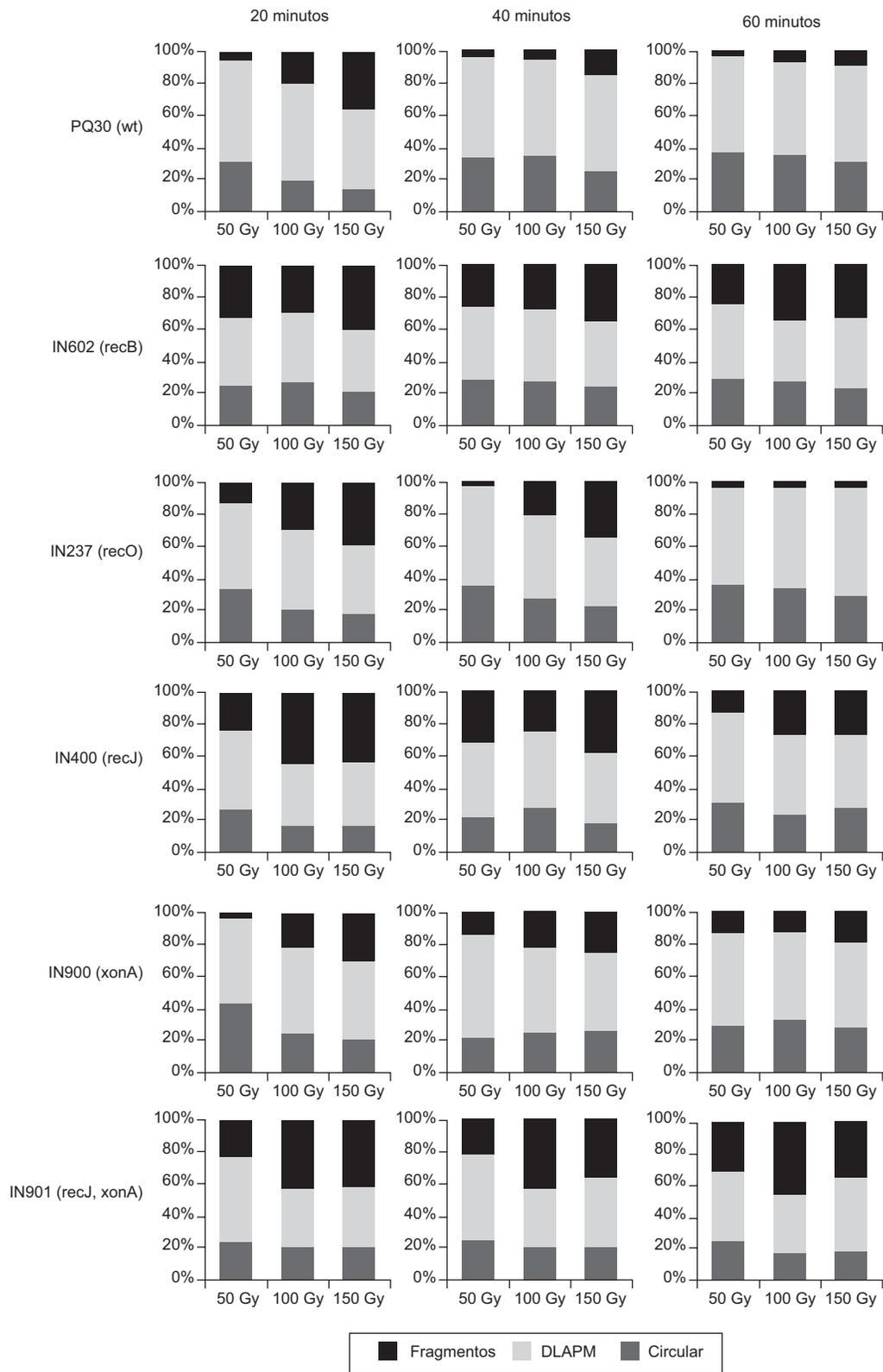


Fig. 6. Cinética de reparación de las diferentes cepas estudiadas. Se presenta el porcentaje de fluorescencia por zona en cada carril por dosis y tiempo de incubación para cada cepa. En el eje de las X se representan las diferentes dosis utilizadas

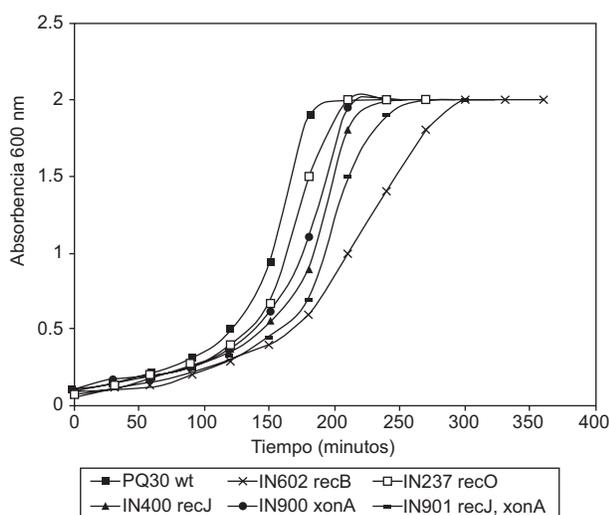


Fig. 7. Cinética de crecimiento de cultivos bacterianos de las diferentes cepas utilizadas

En el caso de las exonucleasas (RecJ y ExoI), estas pueden intervenir tanto en el caso de rupturas dobles, procesando extremos dispares que no pudiera reconocer la enzima RecBCD, como en el caso de la aparición de cortes o huecos, extendiendo las regiones de ADN de banda sencilla para que se puedan reparar y reactivar. Se ha propuesto también que intervienen en la reactivación por regresión de la horquilla, de modo que las deficiencias en estos genes retardan el crecimiento de los cultivos (Cox 2001). La importancia de cada uno de los defectos propuesta en el presente trabajo coincide con el retardo en la cinética de crecimiento, así como con los datos de supervivencia, lo que refleja la importancia de los genes defectuosos en la reparación de rupturas dobles.

CONCLUSIONES

El empleo de la técnica de electroforesis por pulsos es un método adecuado para demostrar la formación de rupturas de doble banda en el ADN, inducidas por la radiación gamma, pues los resultados encontrados concuerdan perfectamente con los resultados reportados en el experimento realizado empleando la técnica de microelectroforesis neutra (ensayo cometa). La electroforesis por campos pulsados tiene la ventaja de ser un método relativamente más sencillo ya que es más fácil la manipulación de las muestras y en consecuencia el tiempo empleado en su ejecución es considerablemente menor.

La respuesta celular al daño depende de la dosis empleada, el estado de la célula y los mecanismos de

los que se valga para resarcir el daño; así por ejemplo, a una dosis mayor de radiación y con una pobre recombinación, la célula tiene menos posibilidades de tolerar el daño, pues se genera una mayor cantidad de RDB que no pueden ser reparadas debido a la deficiencia en sus mecanismos de reparación, dando por resultado una mayor letalidad.

Finalmente puede decirse que la importancia de los genes implicados en la reparación de rupturas dobles tiene el siguiente orden, de mayor a menor: **recB**>**xonA/recJ**>**xonA**>**recJ**>**recO**. De ello se puede concluir que, si bien, las diversas vías de recombinación actúan preferentemente sobre un tipo específico de estructuras en el ADN, en la realidad esas vías son capaces de interactuar unas con otras para lograr la supervivencia de la célula.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la C. Alicia Hernández Arenas por la valiosa ayuda técnica durante el desarrollo de esta investigación. Este trabajo está dedicado a la memoria de la M. en C. Matilde Breña Valle, quien fuera Jefe del Departamento de Biología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

REFERENCIAS

- Averbeck D., Testard I. y Boucher D. (2006). Changing views in ionizing radiation-induced cellular effects. *Int. J. Low Radiation* 3, 117-134.
- Barrett T.J., Lior H., Green J.H., Khakhria R., Wells J.G., Bell B.P., Greene K.D., Lewis J. y Griffin P.M. (1994). Laboratory investigation of a multistate foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.* 32, 3013-3017.
- Beverly S.M. (1988). Characterization of the 'unusual' mobility of large circular ADNs in pulsed field-gradient electrophoresis. *NAR* 16, 925-939.
- Brčić-Kostić K., Salaj-Šmic E., Maršić N., Kajić S., Stojiljković I. y Trgovčević Ž. (1991). Interaction of RecBCD enzyme with ADN damaged by gamma radiation. *Mol. Gen. Genet.* 228, 136-142.
- Breña M. y Serment J. (1998). SOS induction by gamma radiation in *E. coli* strains defective in repair and or recombination mechanisms. *Mutagenesis* 13, 637-641.
- Cox M. (2001). Recombinational ADN repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu. Rev. Genet.* 35, 53-82.

- Cox M., Goodman M., Kreuzer K., Sherrat D., Sandler S. y Mariani K. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 38-41.
- Dillingham M.S. y Kowalczykowski S.C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded ADN breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 642-671.
- Game J.C., Sitney K.C., Cook V.E. y Mortimer R.K. (1989). Use of a ring chromosome and pulsed-field gels to study interhomolog recombination, double-strand ADN breaks and sister-chromatid exchange in yeast. *Genetics* 123, 695-713.
- Handa N. y Kobayashi I. (2003) Accumulation of large non-circular forms of the chromosome in recombination-defective mutants of *Escherichia coli*. *BMC Molecular Biology* doi:10.1186/1471-2199-4-5.
- Handa N., Morimatsu K., Lovett S.T. y Kowalczykowski S.C. (2009). Reconstitution of initial steps of dsADN break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Gene Dev.* 23, 1234-1245.
- Johnson J.M., Weagant S.D., Jinneman K.C., Bryant J.L. (1995). Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak. *App. Env. Microbiol.* 61, 2806-2808.
- Kusano K., Naito T., Handa N. y Kobayashi I. (1995). Restriction-modification systems as genomic parasites in competition for specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11095-11099.
- Kuzminov A. (1999). Recombinational repair of ADN damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 751-813.
- Matushek M.G., Bonten M.J. M. y Hayden M.K. (1996). Rapid preparation of bacterial ADN for pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2598-2600.
- Chang N. y Taylor D.E. (1990). Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size genomes of *Campylobacter* species and to construct a Sall map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J. Bacteriol.* 172, 5211-5217.
- Naito T., Kusano K. y Kobayashi I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science*, 267, 897-899
- Quillardet P. y Hofnung M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 147, 65-78.
- Singh N.P., Stephens R.E., Singh H. y Lai H. (1999). Visual quantification of ADN double-strand breaks in bacteria. *Mutat. Res.* 429, 159-168.
- Sargentini N.J. y Smith K.C. (1986). Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray-induced ADN double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiat. Res.* 107, 58-72.
- Serment-Guerrero J., Breña-Valle M. y Espinosa-Aguirre, J.J. (2008). *In vivo* role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis* 23, 317-323.
- Sheneman D.E. y Katz D.S. (2003). An inexpensive sample mold for pulsed-field electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.* 53, 127-129.
- Téoule R. (1987) Radiation-induced ADN damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 51, 573-589.
- Thoms B. y Wackernagel W. (1998). Interaction of RecBCD enzyme with ADN at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: requirement for ADN end processing. *J. Bacteriol.* 180, 5639-5645.
- Umezumi K. y Kolodner R. (1993). Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded ADN binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3875-3879.
- Umezumi K. y Kolodner R. (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*: interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded ADN binding protein. *J. Biol. Chem.* 269, 30005-30013.