

Tesis de Posgrado

Mecanismos de inducción de deleciones en procariotas

Levy, Myriam Susana

1993

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Levy, Myriam Susana. (1993). Mecanismos de inducción de deleciones en procariotas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2589_Levy.pdf

Cita tipo Chicago:

Levy, Myriam Susana. "Mecanismos de inducción de deleciones en procariotas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2589_Levy.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MECANISMOS DE INDUCCION DE DELECCIONES EN
PROCARIOTAS**

MYRIAM SUSANA LEVY

DIRECTOR DE TESIS: Dra. ROSA NAGEL

LUGAR DE TRABAJO: CEFYBO-CONICET

AD_aN Y RAZA AZAR Y N_aDA

Reflexioné, después, que más poético es el caso de un hombre que se propone un fin que no está vedado a los otros, pero sí a él.

La busca de Averroes

TRABAJOS PUBLICADOS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Levy, M. S., P. Pomposiello and R. Nagel (1991) RecA dependent increased precise excision of Tn10 in *Salmonella typhimurium*, Mutation Res., 255, 95-100.

Levy M. S., E. Balbinder, and R. Nagel (1993) Effect of mutations in SOS genes on UV-induced precise excision of Tn10 in *Escherichia coli*, Mutat. Res., 293, 241-247.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Rearreglos genéticos en procariontas y eucariotas.	2
1.2. Deleciones genéticas en procariontas	3
1.2.1. Estructura	3
1.2.2. Modelos de deleciones genéticas	3
1.2.2.1. Modelos basados en errores de replicación	4
1.2.2.2. Modelos basados en la rotura y reunión del ADN	5
1.2.2.3. Modelos mixtos	5
1.3. Inducción de deleciones por agentes que dañan al ADN	9
1.3.1. Irradiación ultravioleta	9
1.3.2. Mitomicina C	10
1.4. Sistemas de reparación del ADN...	10
1.4.1. Reparación de apareamiento erróneo.....	11
1.4.2. Reparación por escisión...	11
1.4.3. El sistema SOS de reparación	12
1.4.3.1. Regulación ...	12
1.4.3.2. Procesamiento mutagénico SOS	17
1.4.4. Reparación recombinacional o postreplicativa	17
1.5. Otros mecanismos de recombinación genética	23
1.5.1. Recombinación sitio específica.	23
1.5.2. Recombinación ilegítima	23
1.6. El transposón Tn10 como sistema modelo para el estudio de deleciones genéticas en procariontas	25
1.6.1. Estructura	25

1.6.2. Descubrimiento..	26
1.6.3. La transposición puede inactivar o activar genes	26
1.6.4. Rearreglos genéticos dependientes de la transposasa	28
1.6.4.1. Transposición	28
1.6.4.2. Transposición inversa y delección/ inversión	28
1.6.5. Rearreglos genéticos independientes de la transposasa	29
1.6.5.1. Escisión precisa de Tn10	29
1.6.5.2. Escisión casi precisa de Tn10	29
1.6.5.3. Escisión precisa del remanente	30
1.6.5.4. Análisis genético y mecanismos propuestos	32
1.7. El derivado mini-Tn10 (Km) como sistema modelo para el estudio de delecciones genéticas en procariotas	34
1.7.1. Estructura	34
1.7.2. Inserción....	34
1.7.3. Escisión precisa	35
2. OBJETIVO	36
3. MATERIALES Y METODOS	38
4. RESULTADOS	55
4.1. Estudios sobre la modulación de la escisión precisa de Tn10 en <i>Salmonella typhimurium</i> .	56
4.1.1. Escisión precisa de Tn10 inducida por deficiencia en la helicasa II	56
4.1.1.1. Efecto de la mutación <i>recA</i>	56
4.1.1.2. Efecto del tratamiento con cafeína	57
4.1.1.3. Efecto del tratamiento con procaína	59
4.1.2. Escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C	60
4.1.2.1. Efecto de la mutación <i>recA</i>	60

4.1.3. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta	61
4.1.3.1. Destino del transposón	62
4.1.3.2. Efecto de la mutación <i>recA</i>	62
4.1.3.3. Efecto de la mutación <i>uvrB</i>	65
4.1.3.4. Efecto del plásmido pKM101	65
4.1.3.5. Efecto de la mutación <i>topA</i>	68
4.1.3.6. Efecto del plásmido pKM101 en las mutantes <i>topA</i>	68
4.2. Estudios sobre la modulación de la inducción de la escisión precisa de Tn10 en <i>Escherichia coli</i> BIK12.	71
4.2.1. Escisión precisa de Tn10 en mutantes SOS constitutivas	71
4.2.1.1. Efecto de la mutación <i>recA730</i>	71
4.2.1.2. Efecto de la mutación <i>lexA</i> defectiva	72
4.2.2. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta	73
4.2.2.1. Destino del transposón	73
4.2.2.2. Efecto de la mutación <i>recA1</i>	73
4.2.2.3. Efecto de la mutación <i>lexA3</i> (ind -)	74
4.2.2.4. Efecto del plásmido pTRecA102.	75
4.2.2.5. Efecto de la mutación <i>recA730</i>	75
4.2.2.6. Efecto de la mutación <i>lexA</i> ::Tn5.	76
4.2.2.7. Efecto del alelo <i>recA727</i>	78
4.2.2.8. Efecto de la mutación <i>umuC</i> ::Tn5	80
4.2.2.9. Efecto del plásmido pKM101	80
4.3. Estudios sobre la inducción de la escisión precisa de Tn10 en mutantes de recombinación de <i>Escherichia coli</i> K12	84

4.3.1. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta	84
4.3.1.1. Efecto de la mutación <i>recN262</i>	84
4.3.1.2. Efecto de las mutaciones <i>ruvA60</i> y <i>ruvB52</i>	85
4.3.1.3. Efecto de la mutación <i>recG::Tn5</i>	86
4.3.1.4. Efecto de la mutación <i>recF::Tn3</i>	86
4.3.1.5. Efecto de las mutaciones <i>recB21C22 sbcB15</i>	87
4.4. Estudios sobre la inducción de la escisión precisa de mini-Tn10 (Km) en <i>Escherichia coli</i> K12	94
4.4.1. Construcción de cepas portadoras de mini-Tn10 (Km)	94
4.4.2. Escisión precisa de mini-Tn10 (Km) inducida por mitomicina C	94
4.4.2.1. Efecto de la mutación <i>lexA3</i> (ind)	95
4.4.3. Escisión precisa de mini-Tn10 (Km) inducida por irradiación ultravioleta	98
4.4.3.1. Destino del minitransposón	98
4.4.3.2. Efecto de la mutación <i>lexA3</i> (ind-)	98
4.4.3.3. Efecto de la mutación <i>recN262</i>	99
4.4.3.4. Efecto de la mutación <i>ruvB52</i>	100
5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	102
6. RESUMEN	116
7. REFERENCIAS	120

1. INTRODUCCION

1.1. Rearreglos genéticos en procariontas y eucariotas

El genoma de un organismo puede ser modificado por mutaciones puntuales, que involucran uno o pocos pares de bases, o por rearrreglos genéticos tales como deleciones, inserciones, translocaciones, o duplicaciones, que pueden involucrar cientos o miles de pares de bases del ADN. La frecuencia de rearrreglos del genoma relativa a la ocurrencia de mutaciones puntuales es variable (Ehrlich, 1989).

Los rearrreglos del genoma son importantes evolutivamente. Así, las duplicaciones proveen copias suplementarias de genes que pueden acumular mutaciones y de esta forma desarrollar nuevas funciones. Las translocaciones y deleciones alteran el entorno de un gen y pueden llevar a su integración dentro de nuevos circuitos de regulación. La inserción de material genético extraño en el genoma facilita la transferencia horizontal de genes.

Los rearrreglos del genoma presentan importancia desde el punto de vista médico. Estos pueden dar origen a desórdenes hereditarios (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne o ictiosis ligada al cromosoma X) o a cambios somáticos provocando o acompañando algunos tipos de cánceres (Cairns, 1981).

Se postula que la acumulación de deleciones en el ADN mitocondrial durante la vida de un individuo es un factor importante en el envejecimiento humano (Zhang y col., 1992; Cortopassi y col., 1990).

Los rearrreglos genéticos pueden provocar problemas biotecnológicos vinculados a la inestabilidad de cepas portadoras de secuencias propensas a deleccionarse (Ishiura y col., 1989; Doherty y col., 1993).

La alta frecuencia, la importancia y la ubicuidad de los rearrreglos genómicos, justifican el interés en el estudio de los mecanismos que los provocan.

1.2. Deleciones genéticas en procariontas

1.2.1. Estructura

La secuenciación de deleciones espontáneas tanto en procariontas como en eucariotas, demostró que la mayoría de las mismas ocurre por eliminación de material genético flanqueado por secuencias cortas repetidas directas de aproximadamente 3 a 20-pb (Farabaugh y col., 1978; Albertini y col., 1982; Mita y col., 1990; Balbinder y col., 1989); estas deleciones son facilitadas por palindromes internos (Albertini y col., 1982; Foster y col., 1981; Das Gupta y col., 1987; Glickman y col., 1984). Las secuencias palindrómicas favorecerían, por apareamiento intracatenario en una o ambas hebras del ADN, la formación y/o estabilidad de estructuras de tipo horquilla o cruciformes.

1.2.2. Modelos de deleciones genéticas

Las deleciones conforman un grupo heterogéneo de rearrreglos genéticos que pueden ser generados por una gran variedad de caminos metabólicos que involucran tanto la recombinación como la replicación del ADN. Se demostró que numerosas deleciones en fagos, plásmidos y cromosoma ocurren con igual frecuencia en presencia o ausencia de proteína RecA (Foster y col., 1981; Das Gupta y col., 1987); sin embargo también se demostró que la frecuencia de algunas deleciones puede ser incrementada en presencia de RecA (Albertini y col., 1982; Singer y Westlye, 1988).

Se han postulado diversos modelos para explicar los mecanismos de generación de deleciones genéticas que ocurren entre secuencias cortas repetidas que no son,

aparetemente, sustrato de enzimas específicas conocidas. Algunos de estos modelos se detallan a continuación. Asimismo, se ha sugerido que una misma deleción puede ser producida por distintos mecanismos y que la frecuencia absoluta y relativa de los mismos, variaría dependiendo de parámetros fisiológicos tales como la disponibilidad de nucleótidos, el superenrollamiento del ADN, la cantidad de enzimas de replicación y de reparación, la estabilidad de las estructuras secundarias que involucran repeticiones inversas, los componentes de las repeticiones directas y la secuencia y estructura de las regiones de ADN circundantes al sitio de deleción (Balbinder y col., 1989).

1.2.2.1. Modelos basados en errores de replicación

Los modelos basados en errores de replicación están conceptualmente relacionados al modelo de recombinación homóloga por elección de copia. Según este modelo la maquinaria de replicación que está copiando un templado determinado puede "saltar" y seguir copiando una secuencia de templado homóloga. El tipo de rearrreglo que resulta como consecuencia de este salto depende de la ubicación relativa de las secuencias entre las cuales ocurre el salto. Una deleción se generaría por desplazamiento de la maquinaria de replicación hacia una secuencia homóloga localizada en dirección 3'; debido a que no se replicarían las secuencias flanqueadas por estas secuencias homólogas cortas (Figura 1-1). La posterior replicación o clivaje del rulo y reparación producirían una molécula donde se ha eliminado todo el material genético existente entre las secuencias homólogas cortas y una copia de dichas secuencias. Existen diversas variantes de este modelo básico de elección de copia o corrimiento de la replicación (Ehrlich, 1989).

1.2.2.2. Modelos basados en la rotura y reunión del ADN

La delección entre secuencias homólogas cortas podría ocurrir por rotura y reunión del ADN.

DasGupta y col. (1987), Ehrlich (1989) y Dianov y col. (1991) propusieron un modelo que involucra los siguientes pasos (Figura 1-2): a) introducción de una rotura de doble cadena entre las secuencias repetidas directas; b) generación de regiones de ADN simple cadena por degradación oxonucleolítica a partir de la rotura de doble cadena; c) exposición de secuencias complementarias cortas que se aparean por complementaridad de bases; d) reparación o cortado de los huecos o trozos simple cadena que posiblemente se generan; e) ligado de los cortes en el ADN formados durante la reparación. De esta forma, se eliminaría la región entre las secuencias repetidas cortas y una copia de las repeticiones. Se ha sugerido que las enzimas que resuelven estructuras intermediarias en la recombinación y en la reparación podrían ocasionalmente introducir roturas de doble cadena recombinogénicas en el ADN (Mahan y Roth, 1989; Das Gupta, 1987). Se demostró que la endonucleasa VII del fago T4 y la endonucleasa I del fago T7 clivan *in vitro* estructuras cruciformes. Se ha sugerido que las estructuras cruciformes producidas *in vivo* podrían ser clivadas por nucleasas específicas para dicha conformación (Ehrlich, 1989).

Sargentini y Smith (1992) propusieron un modelo derivado de los esquemas de reparación de roturas de doble cadena del ADN (ver más adelante Sistemas de Reparación del ADN) y de los modelos de recombinación dependientes de RecBCD para explicar la inducción por irradiación gamma de delecciones entre secuencias cortas repetidas directas.

1.2.2.3. Modelos mixtos

Se han propuesto modelos mixtos que involucran rotura del ADN y replicación. La mayoría de las delecciones que ocurren cercanas a un origen de replicación, se

ajustan a este modelo ya que requieren rotura del ADN y posterior replicación (Bierne y col., 1991).

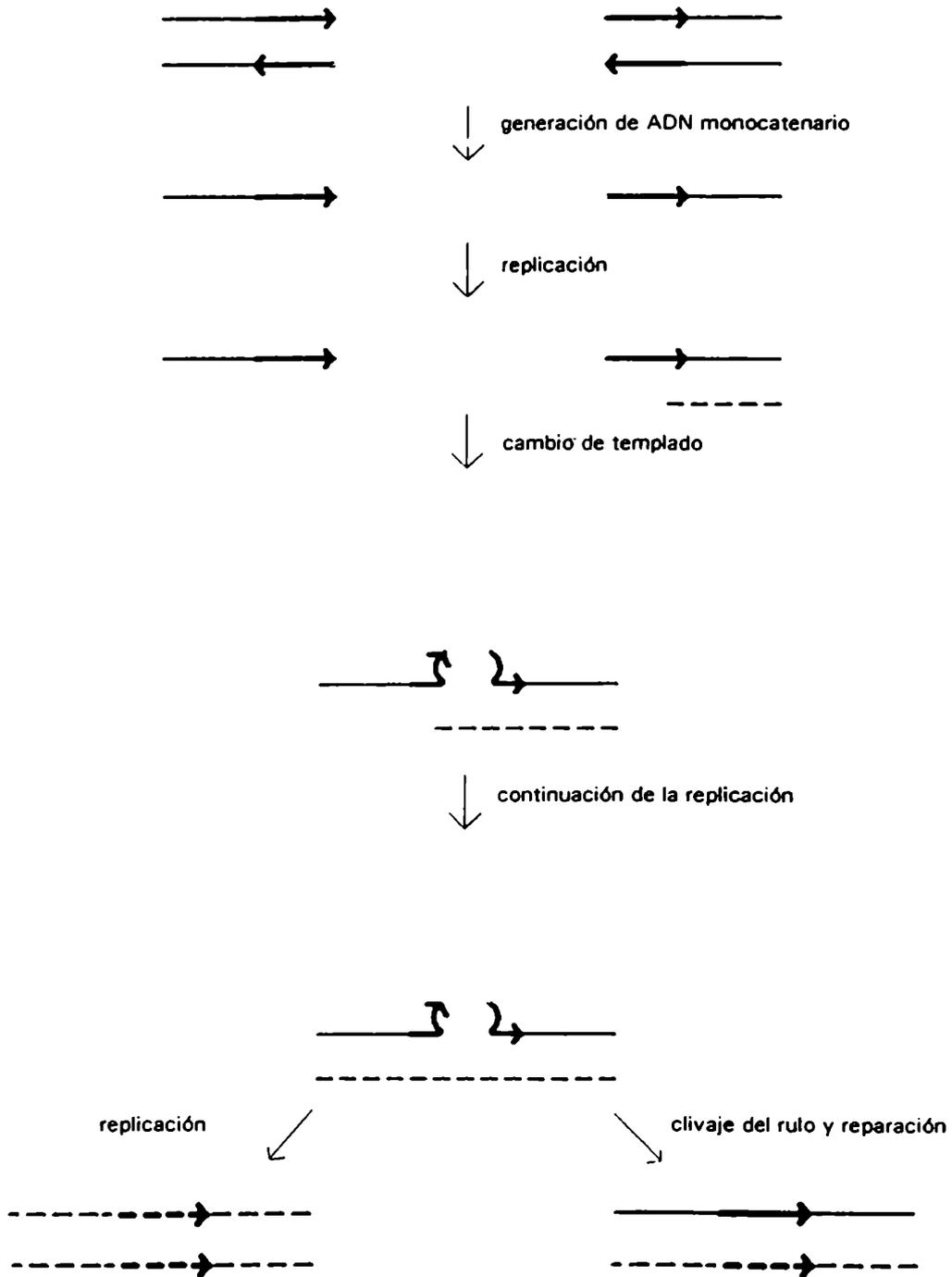


Figura 1-1 Modelo de generación de deleciones basado en errores de replicación (adaptado de DasGupta y col., 1987 y Brunier y col., 1988). Las líneas continuas indican ADN preexistente, las líneas quebradas indican ADN recién sintetizado, las flechas negras indican secuencias repetidas directas, las líneas grises indican secuencias palindrómicas

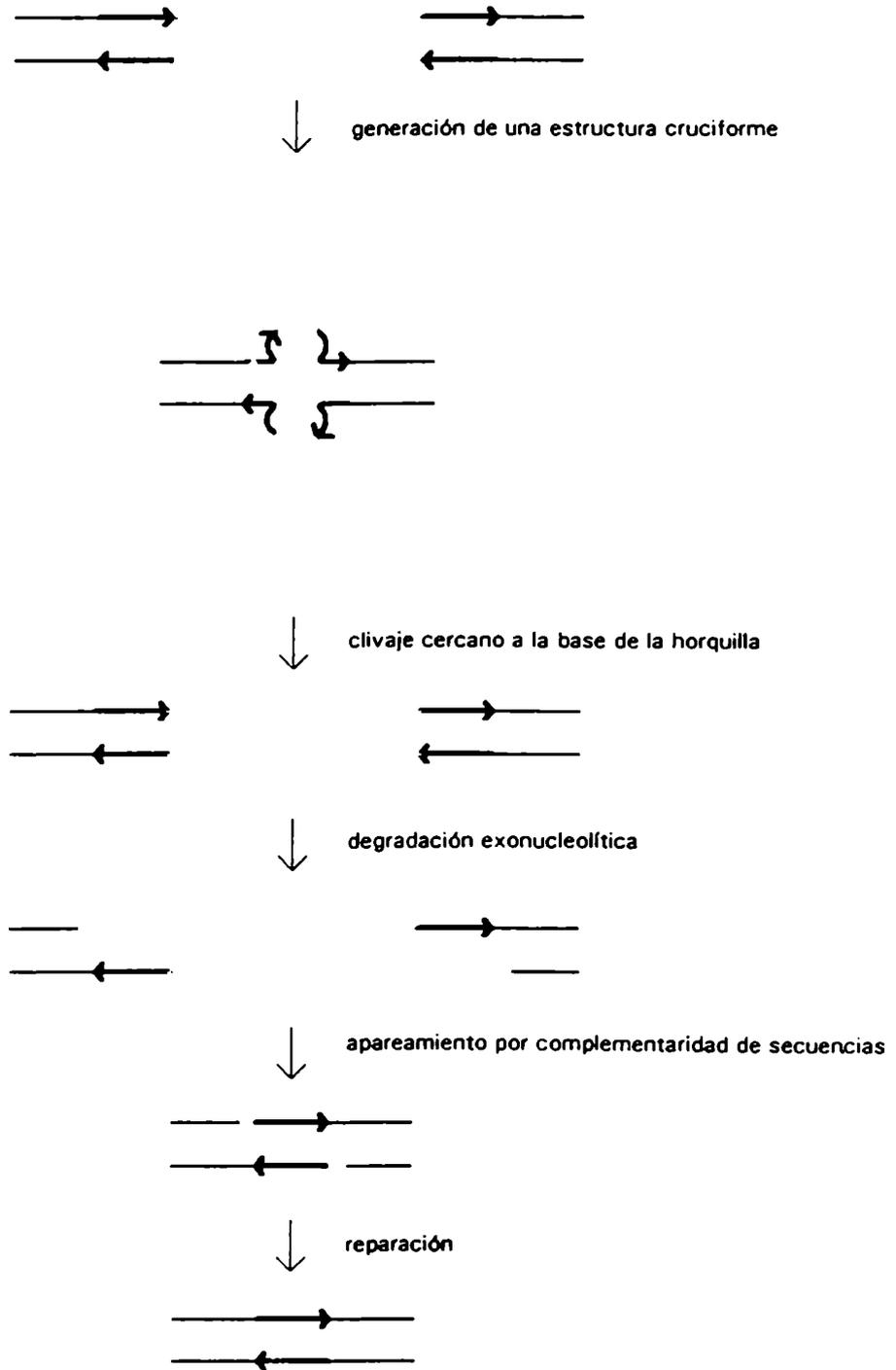


Figura 1-2 Modelo de generación de deleciones basado en la rotura y reunión del ADN (adaptado de DasGupta y col., 1987 y Brunier y col., 1988). Las flechas negras indican secuencias repetidas directas, las líneas grises indican secuencias palindrómicas.

1.3. Inducción de deleciones por agentes que dañan al ADN

El material genético es dañado por una gran variedad de agentes físicos y químicos que provocan modificación de bases, dimerización de bases, entrecruzamiento de hebras, roturas de la cadena, etc. Estos daños pueden ser reparados con o sin producción de alteraciones genéticas o mutaciones. Diversos estudios demostraron que agentes genotóxicos tales como el ácido nitroso, la 4-nitroquinololína, la mostaza nitrogenada, la mitomicina C y las radiaciones ultravioleta, gamma y X, inducen con alta frecuencia deleciones de 0,7 a 40-Kb en *Escherichia coli* y en *Salmonella typhimurium* (Alper y Ames, 1975; Schwartz y Beckewith, 1969).

En este trabajo se generaron daños en el material genético por irradiación ultravioleta o por tratamiento con mitomicina C.

1.3.1. Irradiación ultravioleta

La irradiación ultravioleta de longitud de onda alrededor de los 260 nm es fuertemente absorbida por las bases del ADN, y una consecuencia de ello, es la fusión fotoquímica de dos bases adyacentes de pirimidinas, generando una estructura no apareable y por ende no codificante. La irradiación ultravioleta, que es un poderoso agente bactericida y mutagénico, es un componente de la luz solar y de la luz emitida por lámparas fluorescentes y halógenas (Haseltine, 1983; De Flora y D'Agostini, 1992).

1.3.2. Mitomicina C

La mitomicina C es un potente mutágeno y carcinógeno que genera cruzamientos entre las cadenas de ADN impidiendo la separación de las mismas. La mitomicina C es una sustancia radiomimética, en el sentido de que induce respuestas celulares similares a las inducidas por la irradiación.

1.4. Sistemas de reparación del ADN

Las bacterias han desarrollado mecanismos de reparación altamente sofisticados para proteger su integridad genética y su sobrevivencia. Existen sistemas especializados en la corrección de lesiones específicas y otros que reconocen varios tipos distintos de lesiones siempre que provoquen distorsiones en la estructura de doble hélice del ADN. Algunos mecanismos son libres de error y por lo tanto no mutagénicos y otros son propensos a error y altamente mutagénicos. En general los distintos sistemas cooperan y se interrelacionan en el proceso de reparación del material genético dañado. Por ejemplo, el daño producido por irradiación ultravioleta es reparado por tres sistemas que actúan en forma sucesiva: la reparación por escisión de dímeros, la reparación recombinacional y la reparación propensa a error o procesamiento mutagénico SOS.

En este trabajo se estudiaron genes pertenecientes a los sistemas de reparación de apareamiento erróneo, reparación por escisión, reparación recombinacional y

reparación SOS. La regulación y funcionamiento de dichos sistemas se detalla a continuación.

1.4.1. Reparación de apareamiento erróneo

El sistema de reparación de apareamiento erróneo dirigida por metilación (methyl directed mismatch repair) reemplaza bases erróneas o incorrectamente apareadas en la hebra de ADN de cadena doble recién sintetizada. Este sistema, en el que participan los productos de los genes *mutH*, *mutL*, *mutS*, *mutU* (= *uvrD*), reconoce a la cadena de ADN recién sintetizada porque en ella la secuencia GATC está sin metilar. Luego de un intervalo corto, la metilasa codificada por *dam*, metila la adenina de las secuencias GATC haciendo indistinguibles al templado y a la nueva cadena. Las proteínas *mutC* y *mutS* se unen al ADN y reconocen sitios de apareamiento erróneo, la helicasa II codificada por *mutU* (= *uvrD*) separa las hebras de ADN y la proteína *mutH* cliva a la hebra no metilada en sitios GATC cercanos al sitio mal apareado. La discontinuidad del ADN es reparada por la ADN polimerasa (Kushner, 1987).

Este sistema no sólo detecta bases mal apareadas sino también pequeñas adiciones y sustituciones, reduciendo la incidencia de mutaciones por corrimiento del marco de lectura o por sustitución de bases.

1.4.2. Reparación por escisión

La exinucleasa UvrABC del sistema de reparación por escisión, reconoce regiones del ADN conteniendo dímeros de pirimidinas u otras lesiones que afecten la estructura de doble hélice y su actividad nucleasa provoca cortes a ambos lados del

sitio dañado. La helicasa II, codificada por *uvrD*, separa las hebras de ADN permitiendo la escisión del segmento dañado. La polimerasa rellena la discontinuidad del ADN y la ligasa une los segmentos. Los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* están regulados por el represor LexA del sistema SOS pero sin embargo tienen cierto nivel de expresión constitutiva. Se ha sugerido que estas proteínas actuarían en un paso limitante del proceso de reparación por escisión. La reparación de daños mediada por el sistema de reparación por escisión no introduce mutaciones.

1.4.3. El sistema SOS de reparación

El sistema SOS de reparación del ADN se conoce como operativo en bacterias gram-negativas y gram-positivas, también se han observado respuestas similares a la SOS en organismos eucariotes (Walker, 1984).

1.4.3.1. Regulación

En *Escherichia coli* el sistema SOS consiste en un conjunto de genes cuya transcripción se activa por la acción de agentes que dañan al cromosoma o que inhiben la replicación del ADN. Estos genes codifican para enzimas involucradas en gran cantidad de procesos tales como, la reparación del ADN por escisión de dímeros de pirimidinas o por recombinación , mutagénesis SOS, replicación del ADN y división celular. Existen genes SOS, que codifican para proteínas cuya función aún no se ha dilucidado. Se han identificado aproximadamente 19 genes del sistema SOS de *Escherichia coli* (Figura 1-3). Algunos genes de ciertos fagos y plásmidos son también regulados por el sistema SOS. Recientemente se descubrió que el transposón Tn5 posee una región de unión para la proteína LexA (Kuan y col., 1991).

Los miembros del regulón SOS se distinguen de otros genes cuya transcripción se activa en respuesta al daño al material genético (por ejemplo: respuesta de shock térmico, respuesta adaptativa a agentes alquilantes, respuesta a agentes oxidativos, etc.) a través de su regulación por las proteínas RecA y LexA (Figura 1-4).

La proteína LexA es el represor común a todos los genes SOS, incluyendo a *recA* y al propio gen *lexA*. La proteína LexA se une a secuencias presentes en los operadores de dichos genes, inhibiendo su expresión. Algunos loci, por ejemplo *recA*, tienen un solo sitio de unión para LexA; mientras que otros, por ejemplo *lexA* y *umuDC*, tienen dos sitios de unión. Muchos genes SOS, incluyendo a *recA* y *lexA*, se transcriben en cantidad significativa aún estando reprimidos.

La proteína RecA promueve la proteólisis de LexA en células con ADN dañado o con la replicación del ADN inhibida. Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* sugieren que la proteína RecA se une a regiones de ADN simple cadena, producidos por inhibición de la replicación o por procesamiento enzimático de extremos de ADN rotos, y adquiere una conformación activada (Sassanfar y Roberts, 1991b). Esta forma activada (RecA*) promueve el autoclivaje de LexA, que deja de funcionar como represor y permite la expresión de los genes SOS. La proteína RecA* también promueve el clivaje de los represores de los fagos λ y $\phi 80$ y de la proteína UmuD.

La reparación de los sitios dañados mediada por las enzimas SOS y otros factores celulares determinan la disminución de los niveles de RecA* y el consiguiente retorno a las condiciones fisiológicas normales de la célula.

La respuesta SOS puede ser activada por mutaciones en los genes regulatorios *recA* y *lexA*. Las mutantes que expresan el sistema SOS de reparación en forma constitutiva son viables sólo si el gen *sulA* (*sfiA*) está mutado de forma tal de inactivar su producto, el cual es un inhibidor de la división celular. Las mutantes SOS constitutivas son ampliamente usadas para el estudio de la respuesta SOS ya

que evitan el uso de agentes externos que causen lesiones en el ADN (Dimpfl y Echols, 1989; Sweasy y col, 1990).

Se han aislado y caracterizado numerosas mutantes en el gen *lexA*, por ejemplo la mutación *lexA3* (ind-) que codifica para una proteína no clivable por RecA activada y la mutación nula *lexA:: Tn5* que codifica para un represor inactivo (Little y col., 1980).

Se han aislado y caracterizado gran cantidad de mutantes en el gen *recA* y se han identificado dominios funcionales separados para la actividad de recombinasa y coproteasa. En este trabajo se utilizaron las mutaciones *recA1*, *recA730* y *recA727*.

La proteína mutante RecA1 (Gly 160 --> Asp) es deficiente para todas las funciones conocidas de RecA (Dutreix y col., 1989). La proteína RecA730 es coproteasa constitutiva y con capacidad recombinatoria normal (Sweasy y col., 1990). La proteína mutante RecA727 tiene dos aminoácidos cambiados con respecto a la proteína salvaje (Gly204 --> Ser y Glu18 --> Lys), presenta actividad recombinatoria y coproteasa normales, pero las portadoras de esta mutación no son mutables por irradiación ultravioleta (Sweasy y col., 1990).

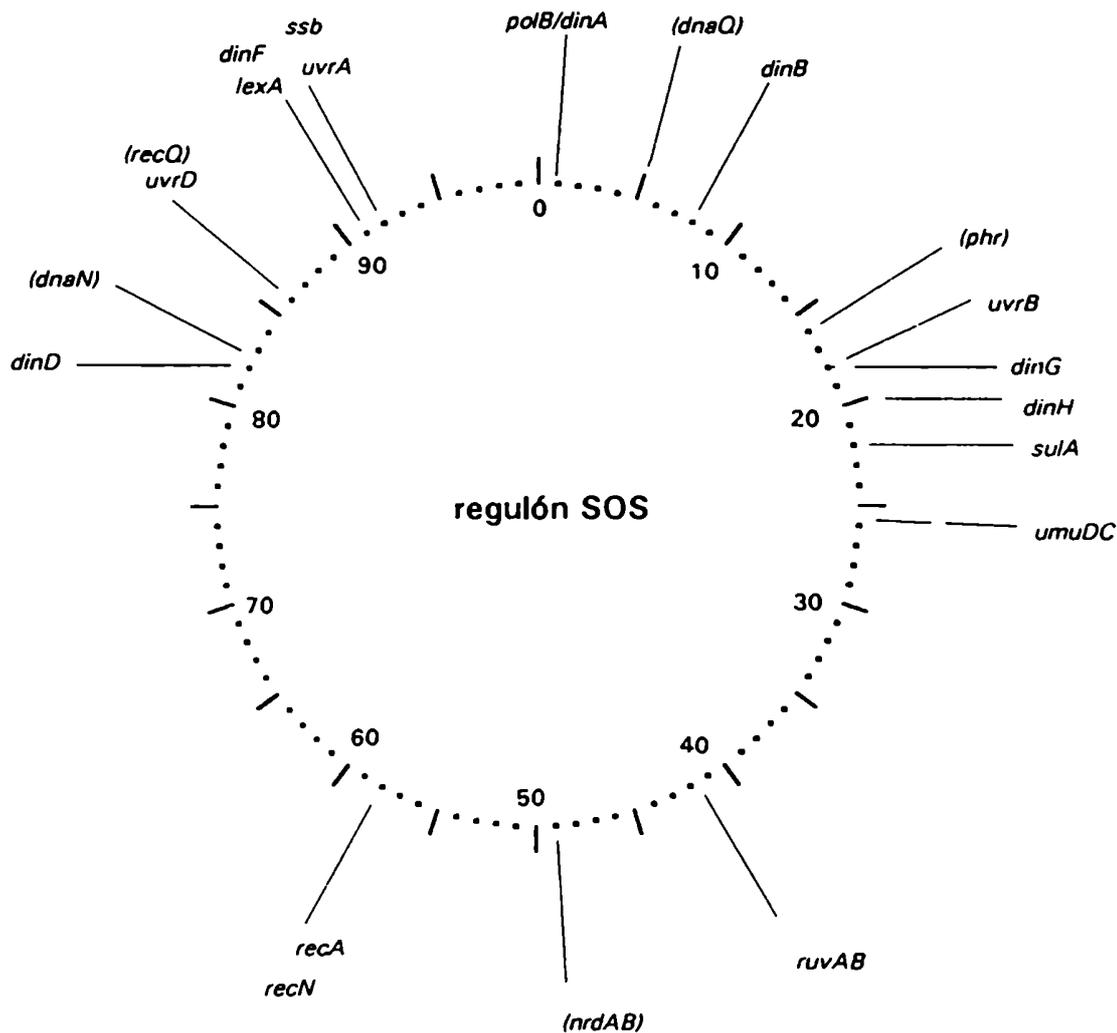


Figura 1-3 Localización de los genes pertenecientes al regulón SOS en el mapa genético de *Escherichia coli* (adaptado de Lewis y col., 1992). Los genes *phr*, *recQ*, *dnaA*, *dnaN* y *dnaQ* requieren *recA*⁺ y *lexA*⁺ para su inducción transcripcional luego de daño al ADN, pero no estarían directamente reprimidos por LexA.

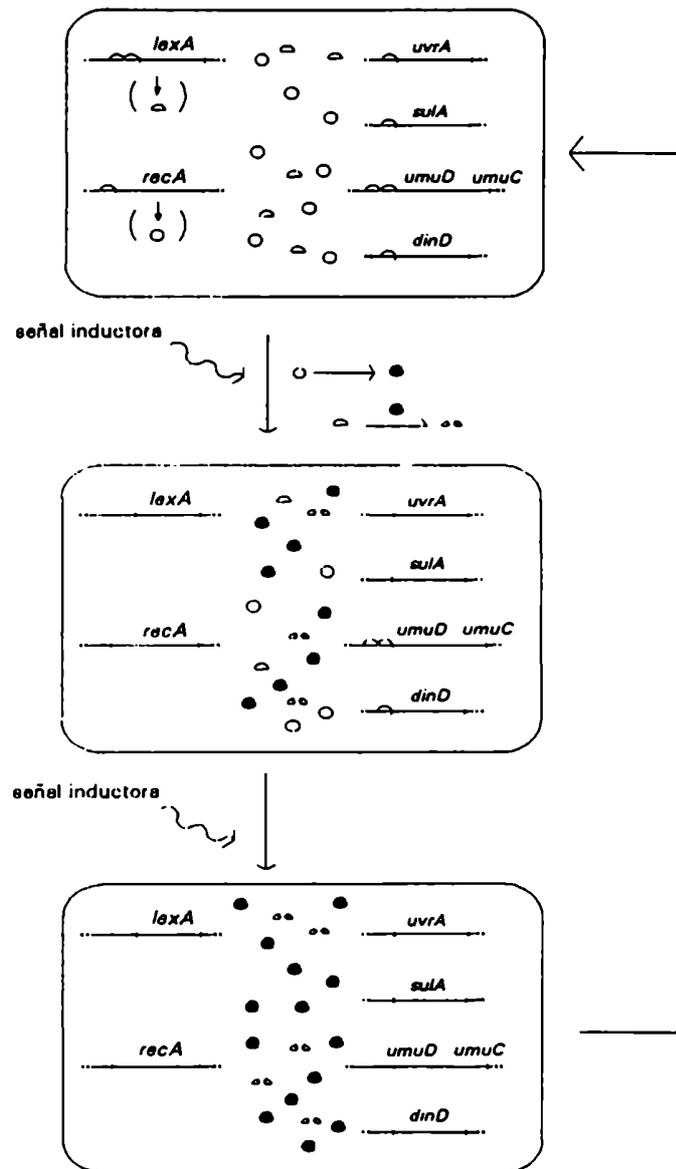


Figura 1-4 Modelo del sistema regulatorio SOS (adaptado de Walker, 1984). Los círculos blancos representan proteína RecA inactiva como proteasa, los círculos negros representan proteína RecA activada. Los semicírculos representan moléculas de LexA, los semicírculos partidos representan moléculas de LexA clivadas. El daño al ADN o la interferencia en la replicación, generan una señal inductora que provoca la activación de la proteína RecA. La proteína RecA activada promueve el clivaje del represor LexA y se induce parcialmente el sistema SOS. Si la señal inductora persiste, descienden aún más los niveles de LexA y las células presentan el sistema SOS totalmente inducido. La reparación de los sitios dañados mediada por las enzimas SOS y otros factores celulares determinan la disminución de los niveles de RecA activada y el consiguiente retorno a las condiciones fisiológicas normales de la célula.

1.4.3.2. Procesamiento mutagénico SOS

La mutagénesis provocada por irradiación ultravioleta y diversos agentes químicos no es un proceso pasivo, ya que depende de la intervención de sistemas celulares que procesan al ADN dañado en forma tal, que dan como resultado mutaciones. Este fenómeno, llamado procesamiento mutagénico SOS o reparación propensa a error, depende del gen *recA* y del operón *umuDC* (Walker, 1984;).

Las proteínas UmuD y UmuC han sido purificadas, pero el mecanismo bioquímico por el cual facilitan la introducción de mutaciones es aún poco claro. Los experimentos genéticos sugieren un rol en la elongación de la cadena de ADN opuesta a una lesión no codificante.

La proteína RecA facilita el clivaje de UmuD indispensable para que éste adquiera una forma activa para la mutagénesis (UmuD') (Nohmi y col., 1988; Shinagawa y col., 1988). Se ha propuesto también un tercer rol de RecA, esencial para el procesamiento mutagénico SOS, que consistiría en una participación directa en la replicación translesión (Dutreix y col., 1989; Sweasy y col., 1990).

Los genes *mucAB* de los plásmidos R son homólogos a los genes *umuDC*. El plásmido pKM101, un derivado pequeño del R-46, incrementa profusamente la mutagénesis tanto de *Escherichia coli*, como de *Salmonella typhimurium*.

1.4.4. Reparación recombinacional o postreplicativa

La recombinación postreplicativa u homóloga consiste en el intercambio entre secuencias de ADN que presentan homología. Este proceso, involucrado en el intercambio de material genético en procariotas, cumple un rol importante en la reparación del ADN dañado.

Las discontinuidades opuestas a lesiones del ADN sin reparar que se generan después del pasaje del complejo de replicación quedan sujetos a este tipo de reparación. Cuando el complejo de replicación pasa dejando una discontinuidad opuesta a una lesión no codificante, la hebra hermana puede aportar la información faltante (Figura 1-5). En el caso de que se produzcan lesiones en zonas próximas en ambas cadenas complementarias en una región no replicada, puede utilizarse la información homóloga de otro cromosoma generalmente presente en bacterias que están creciendo rápidamente (Figura 1-6). Este tipo de reparación no elimina los fotoproductos y puede considerarse como un mecanismo de dilución de las lesiones que, en principio, no introduce mutaciones (Kushner, 1987).

El paso crítico de este tipo de reparación es el apareamiento de secuencias cercanas al sitio de lesión con secuencias complementarias en una molécula de ADN no dañado. En este proceso interviene fundamentalmente la proteína RecA catalizando la sinapsis e intercambio de cadenas entre secuencias de ADN homólogas.

Se han descubierto al menos otros 16 genes que participan en eventos de recombinación: *recB*, *recC*, *recD*, *recE*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recN*, *recO*, *recQ*, *recR*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC*, *sbcB*, *sbcC*. Estos genes cumplirían diferentes funciones. Los mismos, han sido agrupados de acuerdo a su rol en la recombinación conjugacional en tres caminos metabólicos: RecBCD, RecE y RecF (Figura 1-7).

El camino más importante de recombinación homóloga es el denominado RecBCD, en el cual están involucrados, además del producto de estos genes, las proteínas RecA, SSB, ADN girasa, ADN polimerasa I y ADN ligasa.

En ausencia de RecBCD, el nivel residual de recombinación puede ser incrementado por mutaciones en los genes *sbcA* o *sbcB* y *sbcC*, los cuales actúan como supresores extragénicos. Las mutaciones en *sbcA* activan la expresión de *recE*, que codifica para la exonucleasa VII, y el correspondiente camino recombinacional

RecE. Las mutaciones en los genes *sbcB* y *sbcC* activan el camino recombinacional RecF.

Existe un alto grado de superposición para todos estos caminos; la proteína RecA es considerada indispensable para que se produzca cualquier tipo de recombinación homóloga, mientras que los productos de los demás genes intervienen en forma variable dependiendo del tipo de sustrato de ADN y algunos de ellos codifican para proteínas con funciones superponibles. En particular, la superposición funcional de los productos de los genes *recD*, *recJ* y *recN*, llevaron a Lloyd y Buckman (1991b) a proponer una clasificación de los genes de recombinación en tres grupos epistáticos que definen actividades que actúan presinápticamente o postsinápticamente para promover el intercambio genético catalizado por RecA.

En resumen, el tipo de sustrato de ADN (recombinación entre fragmentos de ADN y cromosoma, recombinación entre plásmidos, recombinación entre secuencias repetidas dentro de una misma molécula de ADN, etc), la presencia o ausencia de lesiones, así como el tipo de lesión y la naturaleza del elemento replicativo, tendrían importancia en la inducción de diferentes genes y en el reconocimiento y/o afinidad de las proteínas recombinacionales correspondientes.

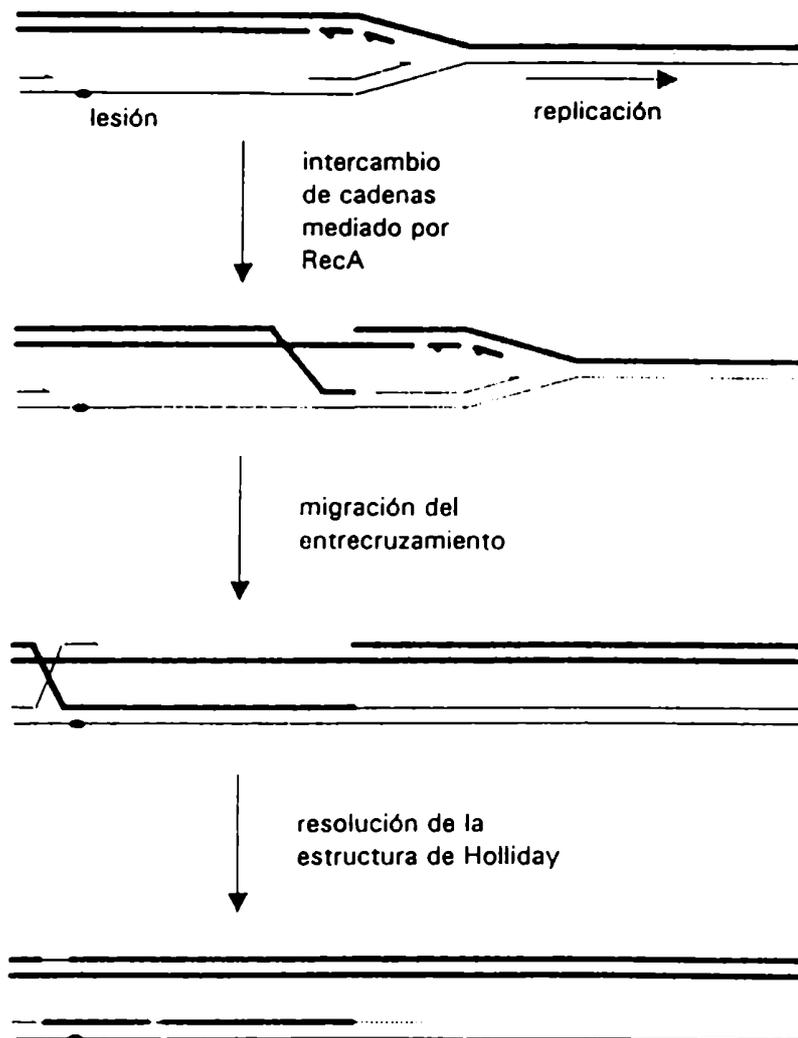


Figura 1-5 Modelo de reparación postreplicativa de discontinuidades del ADN opuestas a una lesión mediada por la proteína RecA (adaptado de Cox , 1991).

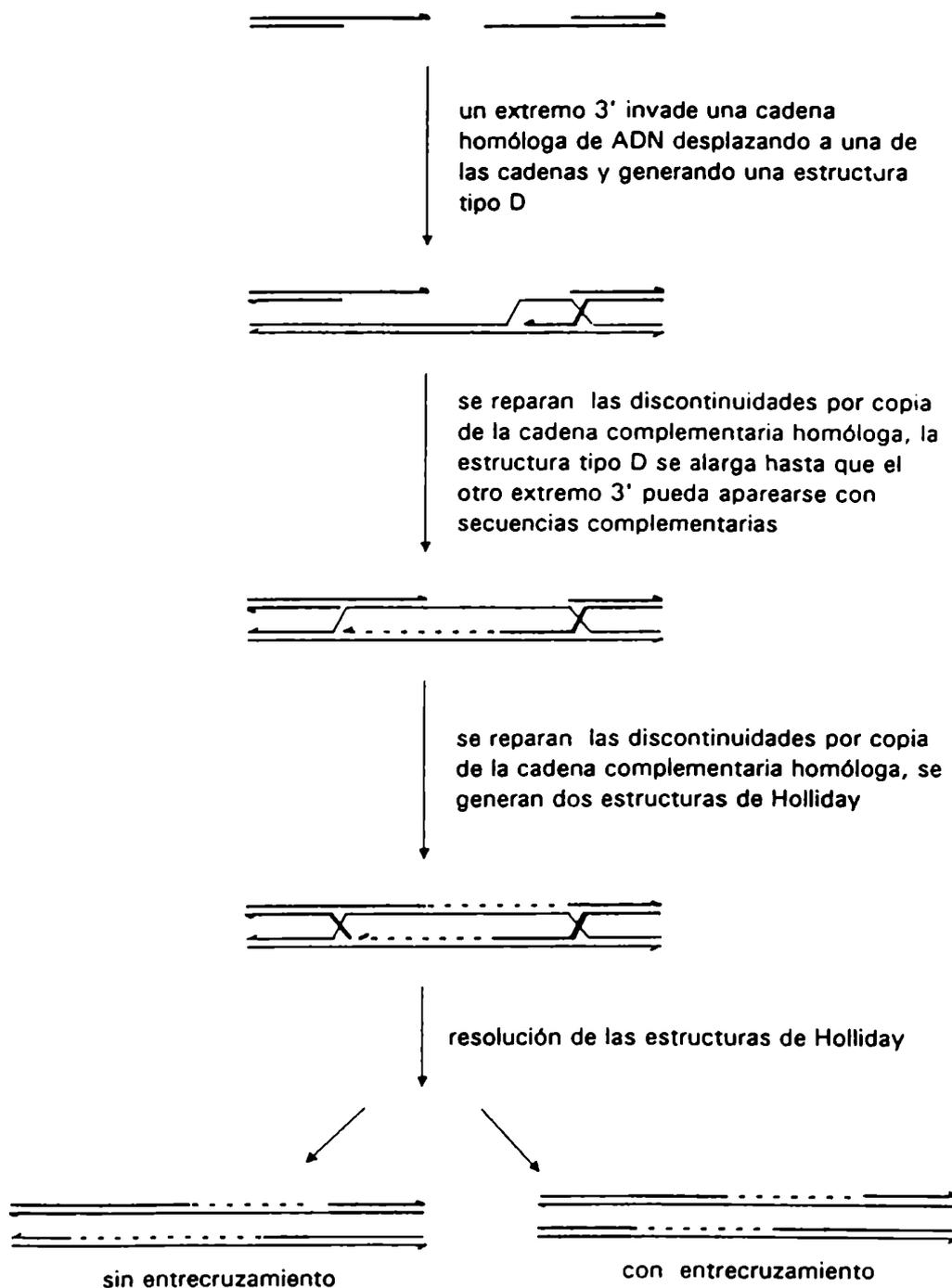


Figura 1-6 Modelo de reparación postreplicativa de roturas de doble cadena del ADN mediada por la proteína RecA (adaptado de Szostak y col., 1983).

RecBCD (cepa salvaje)	RecE (<i>recBC sbcA</i>)	RecF (<i>recBC sbcBC</i>)
<i>recA</i> ¹	<i>recA</i>	<i>recA</i>
<i>recB</i>	<i>recE</i>	
<i>recC</i>	<i>recF</i>	<i>recF</i>
<i>recD</i>	<i>recJ</i>	<i>recJ</i>
<i>recG</i>	<i>recO</i>	<i>recO</i>
	<i>recQ</i> ¹	<i>recQ</i> ¹
	<i>recR</i>	<i>recR</i>
	<i>recN</i> ^{1,2}	<i>recN</i> ¹
	<i>ruvA</i> ^{1,2}	<i>ruvA</i> ¹
	<i>ruvB</i> ^{1,2}	<i>ruvB</i> ¹
	<i>ruvC</i> ²	<i>ruvC</i>
	<i>recG</i>	<i>recG</i>

Figura 1-7 Clasificación de los genes de recombinación en los caminos RecBC, RecE y RecF de recombinación conjugacional según el modelo propuesto por Clark (1971). Los genes se agrupan según sean requeridos para la recombinación conjugacional en la cepa salvaje, o en mutantes *recBC sbcA* o *recBC sbcBC*. ¹Genes regulados por el sistema SOS cuya expresión se induce por la exposición a agentes que dañan al ADN. ²Estos genes tienen poco efecto en la recombinación en estas mutantes. Funciones de los genes de recombinación (West, 1992): *recA*, proteína RecA (ver texto); *recB* *recC* *recD*, subunidades de la enzima RecBCD que tiene actividad de exonucleasa de ADN monocatenario y bicatenario, ADN helicasa, endonucleasa sitio específica de secuencias Chi; *recE*, exonucleasa VII; *recF*, se une específicamente a ADN monocatenario; *recG*, migración de las estructuras de Holliday; *recJ*, exonucleasa de ADN monocatenario; *recN*, actividad bioquímica desconocida, participa en la reparación de roturas de doble cadena del ADN; *recO*, actividad bioquímica desconocida; *recQ*, ADN helicasa; *recR*, actividad bioquímica desconocida; *ruvAB*, migración de las estructuras de Holliday; *ruvC*, nucleasa que resuelve las estructuras de Holliday.

1.5. Otros mecanismos de recombinación genética

Existen otros tipos de recombinación que intervienen en la generación de rearrreglos genéticos que se diferencian de la recombinación homóloga o clásica por las enzimas involucradas y por el tipo de sustrato de ADN sobre el cual operan. Se describen a continuación los mecanismos de recombinación sitio específica y recombinación ilegítima.

1.5.1. Recombinación sitio específica

En la recombinación sitio específica están involucradas secuencias cortas específicas de aproximadamente 10 a 25-pb reconocidas por enzimas especializadas que catalizan la rotura y reunión del ADN. Son ejemplo de este tipo de recombinación: la transposición, la integración de fagos, ciertas inversiones y la resolución de algunos cointegrados (Kleckner, 1989; Ehrlich, 1989). En la mayoría de estos eventos intervienen además, proteínas de tipo histona del huésped (HIF, HU, Fis, etc.).

1.5.2. Recombinación ilegítima

Se considera que la recombinación ilegítima es aquella que no depende de extensa homología, ni de sitios específicos de unión de enzimas especializadas. Algunos investigadores proponen que surge como consecuencia de errores en las enzimas que rompen, unen y/o replican al material genético, como por ejemplo

topoisomerasas, girasas, polimerasas y ligasas (Ehrlich, 1989; Ikeda y col., 1980; Yi y col., 1988).

Algunos mecanismos recombinatorios independientes de *recA* podrían ser dependientes de la ADN girasa. Así lo indican los trabajos de Saing y col. (1988) y de Miura-Masuda e Ikeda (1990) quienes demostraron la participación de la ADN girasa en la generación de deleciones espontáneas en *Escherichia coli*. En este contexto es interesante mencionar que Yang y Ferro Luzzi Ames (1988) encontraron afinidad entre la ADN girasa y las secuencias rep, que son secuencias palindrómicas repetidas en cientos de copias en el genoma de *Escherichia coli*.

1.6. El transposón Tn10 como sistema modelo para el estudio de deleciones genéticas en procariontas

1.6.1. Estructura

El transposón Tn10 es un elemento genético de 9300-pb (Figura 1-8). Los extremos del transposón son secuencias repetidas invertidas (palindrómicas) de 1329-pb pertenecientes a las secuencias de inserción IS10-R (derecha) e IS10-L (izquierda). Entre las dos IS-10 hay material genético no repetitivo de aproximadamente 6700-pb, parte del cual codifica para la resistencia al antibiótico tetraciclina.

La IS10-R es una secuencia de inserción completamente funcional que puede transponerse como una unidad individual. La IS10-R codifica para la enzima transposasa, la cual actúa junto con proteínas de la bacteria huésped para promover la transposición de Tn10 e IS10 y también otros tipos de rearrreglos mecanísticamente relacionados a la transposición. La IS10-L no puede transponer independientemente debido a que codifica para una transposasa no funcional.

El Tn10 confiere, tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium*, resistencia inducible a altos niveles de tetraciclina. La resistencia está codificada en una región de 1900 pares de bases que contiene los genes *tetA* y *tetR*. Existen otros dos genes *tetC* y *tetD* que se inducen en presencia de tetraciclina pero que no son esenciales para otorgar resistencia, al menos cuando Tn10 está insertado en un plásmido multicopia. Se cree que cumplirían alguna función cuando Tn10 está presente en una sola copia o bajo condiciones particulares en la naturaleza (Kleckner, 1989).

Existen 2700-pb adyacentes a IS10-L cuya función no se conoce. Se presume que esta región codifica para funciones importantes en el medio ambiente natural

debido a que está altamente conservada en varios elementos del tipo de Tn10 que codifican para resistencia a tetraciclina.

El transposón Tn10 está flanqueado por repeticiones directas de 9-pb, originadas por la duplicación de una secuencia target del huésped durante la inserción. Esta secuencia target 5'-NGCTNAGCN-3', incluye una secuencia consenso de 6-pb que conforma una simetría invertida interrumpida.

1.6.2. Descubrimiento

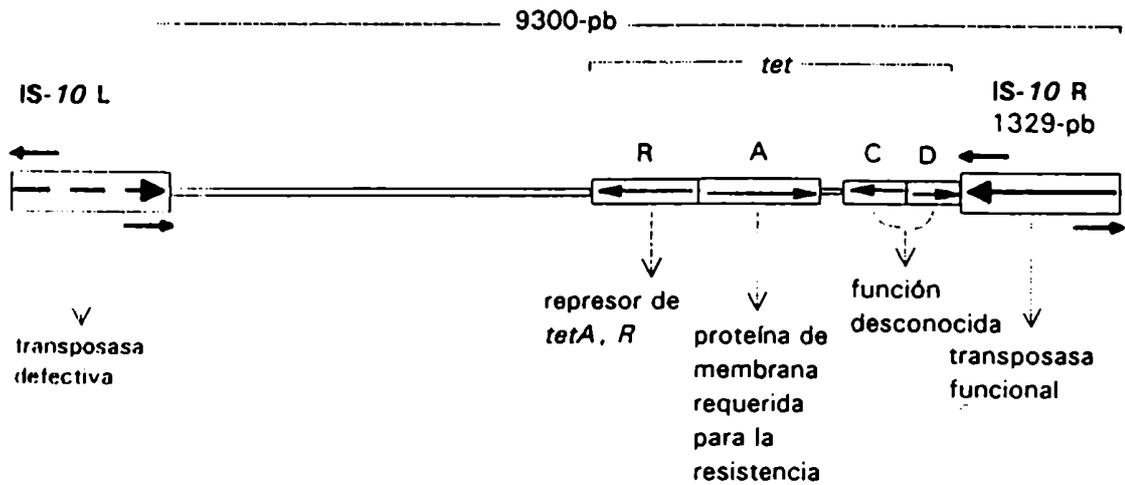
El transposón Tn10 fue originalmente encontrado en el plásmido conjugativo 222, también llamado NR1 o R100. Los análisis genéticos pronto revelaron la translocación de la resistencia a tetraciclina al fago P22, al cromosoma de *Salmonella typhimurium* y al cromosoma de *Escherichia coli* (Kleckner, 1989).

1.6.3. La transposición puede inactivar o activar genes

La inserción de Tn10 entre un gen estructural y su promotor, en un operón o en una región regulatoria elimina, en la mayoría de los casos la expresión génica.

Muchas inserciones de Tn10 en operones son fuertemente polares. Sin embargo, algunas veces las inserciones río arriba de un gen pueden provocar que la expresión de dicho gen quede bajo el control de Tn10 por estimulación de la transcripción a partir del promotor fuerte (p_{out}) de IS-10 R.

a) Tn10



b) mini-Tn10 Km

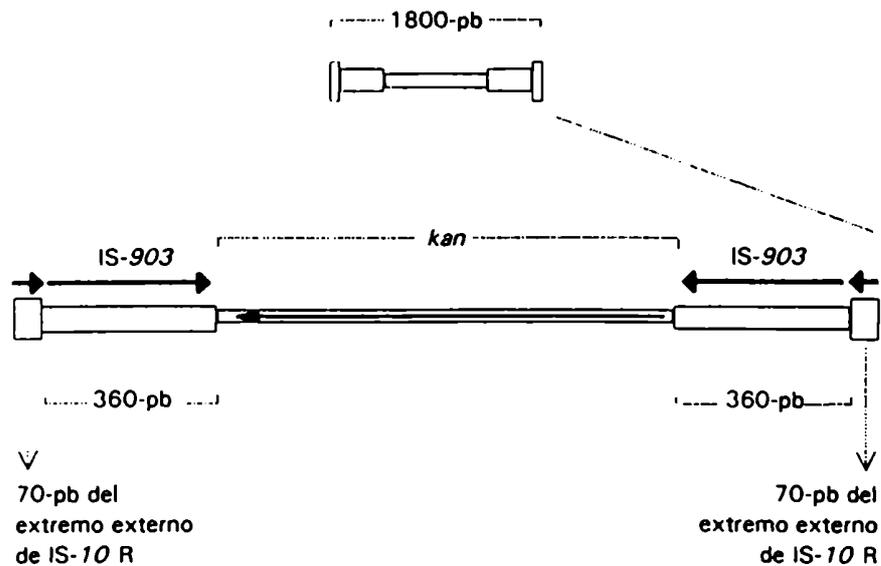


Figura 1-8 a) Transposón Tn10 . IS-10 L (izquierda) e IS-10 R (derecha) son secuencias repetidas invertidas que flanquean a los genes *tetR*, *tetA*, *tetC* y *tetD*. Las flechas cortas en los extremos de las secuencias IS-10 indican secuencias repetidas invertidas casi perfectas. Las flechas dentro de los genes *tet*, indican dirección de la transcripción. La flecha continua dentro de IS-10 R indica dirección de la transcripción de la transposasa, la flecha quebrada dentro de IS-10 L indica transcripción del gen de la transposasa defectiva de este elemento. b) Minitransposón mini-Tn10 Km. Los extremos son 70-pb de secuencias repetidas invertidas perfectas, correspondientes al extremo externo de IS-10 R, que flanquean un segmento de 1675-pb correspondiente al transposón Tn-903. Las flechas en los extremos de este segmento indican secuencias repetidas invertidas de 360-pb correspondientes al extremo interno de IS-903. La flecha dentro de este segmento indica la dirección de la transcripción del gen *kan*.

1.6.4. Rearreglos genéticos dependientes de la transposasa

1.6.4.1. Transposición

La transposición de *Tn10* es una reacción en la cual el transposón es eliminado del sitio dador e insertado en un nuevo sitio sin replicación significativa del elemento transponible. La frecuencia de transposición para la mayoría de las inserciones cromosomales es de 10^{-7} por elemento por generación. La frecuencia de transposición varía enormemente entre inserciones localizadas en distintos sitios del cromosoma.

1.6.4.2. Transposición inversa y deleción/ Inversión

La transposasa de *IS10-R* junto con proteínas del huésped pueden promover diversos tipos de rearrreglos del genoma además de la transposición "normal". Estos ocurren probablemente por el mismo mecanismo de la transposición; pero difieren en que en ellos interactúa un sitio target con los extremos internos de dos elementos *IS*, en lugar de los dos extremos de *Tn10*.

La transposición inversa es un evento intermolecular. La deleción de secuencias adyacentes promovidas por *Tn10* y la deleción / inversión son eventos intramoleculares que difieren entre sí por la orientación de la secuencia target relativa al transposón. La frecuencia de generación de deleciones adyacentes al sitio de inserción y de deleciones / inversiones es de 10^{-5} por elemento por generación. Esta frecuencia es relativamente constante para distintos sitios de inserción, presumiblemente porque están involucrados los extremos internos de las *IS* que tienen siempre igual contexto genético.

1.6.5. Rearreglos genéticos independientes de la transposasa

1.6.5.1. Escisión precisa de Tn10

Las inserciones de Tn10 pueden dar lugar a eventos que no están promovidos por la enzima transposasa y que por lo tanto no están relacionados con el proceso de transposición propiamente dicho.

La escisión precisa de Tn10 es un evento en el cual la secuencia de ADN en la cual está insertado este elemento, es restaurada a su forma original; es decir a la que tenía antes de la inserción del transposón (Figura 1-9). La escisión precisa de Tn10 se detecta genéticamente como la reversión de una mutación por inserción. Debido a que la inserción de Tn10 involucra la duplicación de 9 pares de bases del sitio de inserción, la escisión precisa de Tn10 involucra la eliminación de todas las secuencias del transposón junto con una copia de la secuencia repetida de 9 pares de bases. La frecuencia de escisión precisa de Tn10 desde el cromosoma bacteriano varía en cuatro o cinco ordenes de magnitud de un sitio de inserción a otro, pero usualmente es de 10^{-8} - 10^{-9} por elemento por generación.

1.6.5.2. Escisión casi precisa de Tn10

El transposón Tn10 contiene secuencias repetidas invertidas (palindrómicas) cortas que están centradas a 25-pb de sus extremos. Estas secuencias subterminales cortas presentes en ambos extremos constituyen repeticiones directas. La escisión casi precisa de Tn10 consiste en la eliminación de todas las secuencias del transposón entre dichas repeticiones cortas (Figura 1-9). Las secuencias de inserción IS10-R e IS10-L difieren en cuatro nucleótidos en el centro de las secuencias invertidas cortas, los derivados de un evento de escisión casi precisa pueden contener la información central de cualquiera de los dos extremos. La alta frecuencia de escisión casi precisa (10^{-6} por elemento por generación) reflejaría el hecho de que las secuencias repetidas

directas son de 24-pb en comparación a las de 9-pb involucradas en la escisión precisa. La frecuencia de escisión casi precisa de *Tn10* es similar para todas las inserciones examinadas; este evento sería menos sensible al contexto cromosómico debido a que en él, sólo se hallan involucradas secuencias pertenecientes al transposón.

1.6.5.3. Escisión precisa del remanente

Los derivados de escisión casi precisa pueden dar lugar a revertantes de escisión precisa mediante la eliminación del remanente de 50-pb (Figura 1-9). La frecuencia de este evento depende del sitio de inserción y es siempre 100 veces mayor que la frecuencia de escisión precisa de *Tn10* desde el mismo sitio.

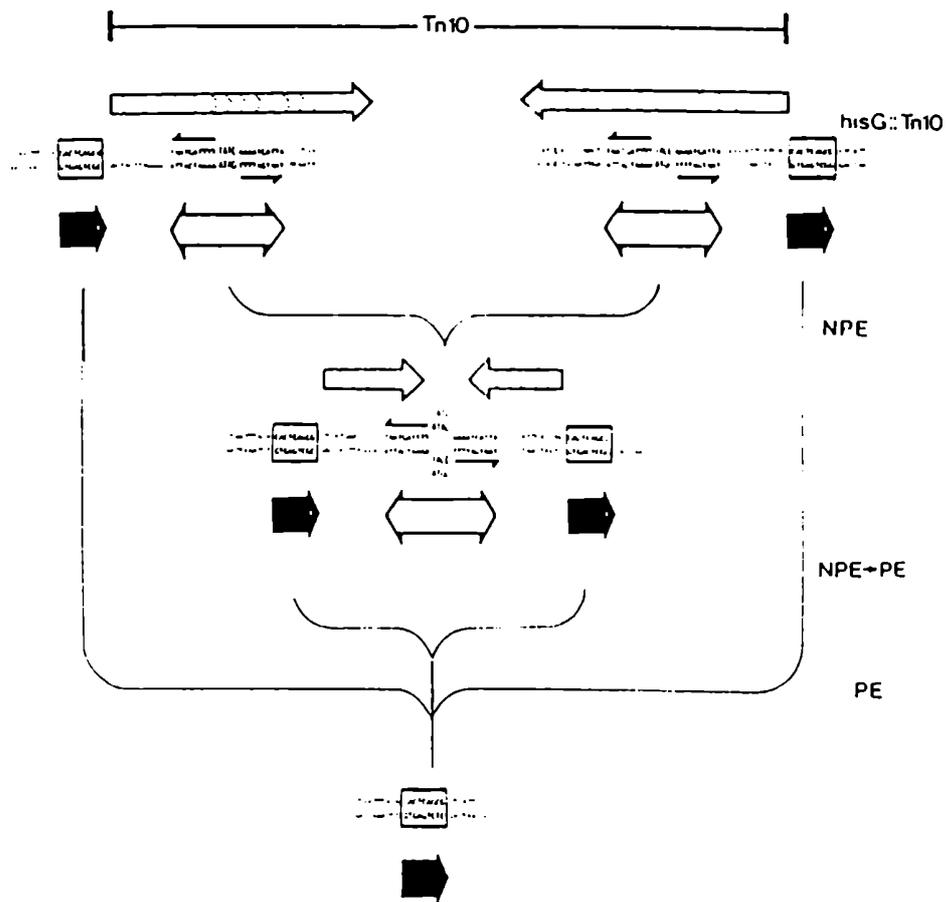


Figura 1-9 Tres eventos de escisión de Tn10 independientes de la transposasa (reproducido de Kleckner, 1989). Línea superior: secuencia de ADN de los dos extremos de una inserción de Tn10 en el gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. Las secuencias del transposón están flanqueadas por repeticiones directas de 9-pb de secuencias pertenecientes a *hisG*. Las flechas cortas cercanas a los extremos del transposón indican secuencias repetidas invertidas de 12-pb. Línea intermedia: escisión casi precisa (NPE) involucra la escisión de todas las secuencias de Tn10 entre las repeticiones invertidas de 12-pb de IS-10 L e IS-10 R más una copia de estas repeticiones. Debido a que los extremos del transposón son repeticiones invertidas de IS-10, las repeticiones invertidas cercanas a los extremos del transposón constituyen repeticiones directas; la escisión casi precisa de Tn10 puede describirse como la escisión entre estas secuencias repetidas directas. Línea inferior: la escisión de todas las secuencias correspondientes al Tn10 más una copia de la secuencia target de 9-pb restituye la secuencia original del gen *hisG*. Este evento, conocido como escisión precisa, puede ocurrir a partir de un Tn10 intacto en un solo paso (PE) o a partir de un derivado de escisión casi precisa (NPE → PE). En ambos casos este fenómeno puede ser descrito como la escisión entre dos secuencias repetidas directas de 9-pb.

1.6.5.4. Análisis genético y mecanismos propuestos

En principio la escisión precisa de Tn10 podría ocurrir en dos pasos sucesivos: escisión casi precisa de Tn10 seguida de escisión precisa del remanente de la escisión casi precisa. Sin embargo la frecuencia relativa de los tres eventos indica que la escisión precisa de Tn10 ocurre usualmente en un solo paso.

Estos tres eventos ocurren mediante un proceso independiente de la transposasa; las mutaciones puntuales o deleciones que anulan la expresión de la transposasa no alteran la frecuencia de escisión, asimismo, aquellas mutaciones que incrementan la expresión de esta enzima tampoco alteran la frecuencia de escisión.

Los tres eventos asociados a la escisión de Tn10 ocurren mediante un proceso independiente de la función de recombinación homóloga RecA (Foster, 1981).

Existen evidencias experimentales que avalan la idea de que los procesos de escisión precisa y casi precisa involucran estructuras intermediarias en las cuales los extremos del transposón interactúan en estado de simple cadena. Se observó que el acortamiento por deleción de los extremos repetidos invertidos de Tn10 disminuye la frecuencia de escisión. Esto demuestra la importancia de la presencia de las secuencias repetidas invertidas en los extremos del transposón.

Lundblad y Kleckner (1985) y Lundblad y col. (1984) aislaron mutaciones en *Escherichia coli* que incrementan la escisión precisa y casi precisa de Tn10. Estas mutaciones denominadas *tex* (de: transposon excision) se pueden agrupar en dos categorías: alelos especiales de los genes *recB* y *recC* o mutaciones nulas de genes involucrados en la reparación de apareamiento erróneo (mismatch). Los alelos estándar de *ssb* y *mutD* también incrementan la escisión. No se conocen los mecanismos moleculares responsables del aumento de la escisión de Tn10 en estas mutantes. Estas mutaciones podrían estimular un camino metabólico normal o crear uno nuevo. Algunas mutaciones (*texA344*, *uvrD*) dependen del gen *recA* para producir su efecto, sugiriendo que en estos casos se han creado nuevos caminos metabólicos

que dependen directamente de alguna función de la proteína RecA o de la inducción del sistema SOS de reparación. Para la mutación *texA344*, se probó que la inducción depende de una función de RecA distinta de la involucrada en la inducción del sistema SOS de reparación (Lundblad y Kleckner, 1985).

Hopkins y col. (1983) aislaron mutaciones en *Escherichia coli*, que llamaron *uup*, que estimulan la escisión de Tn10 y Tn5 y que no mapean en genes previamente conocidos.

Resultados obtenidos en este laboratorio (Lorenzo y col., 1990), mostraron que mutaciones nulas en genes del sistema de apareamiento erróneo (*mutU*, *mutH*, *mutS*) y una mutación nula en el gen de la polimerasa I (*polA*), incrementan la frecuencia de escisión precisa de Tn10 en *Salmonella typhimurium*.

La escisión precisa del remanente de la escisión casi precisa ocurriría por un camino metabólico distinto del involucrado en la escisión precisa y escisión casi precisa de Tn10. Ninguna de las mutaciones *tex* incrementó significativamente la frecuencia de este evento. Sin embargo, hay probablemente una relación mecánica entre los procesos de escisión precisa de Tn10 y escisión precisa del remanente de la escisión casi precisa, dado que la frecuencia de los mismos varía en forma coordinada de un sitio de inserción a otro (Lundblad y Kleckner, 1985). Es muy factible que la escisión precisa del remanente ocurra por corrimiento del aparato de replicación (ver modelos de deleciones genéticas), ya que el segmento a escindir es un palíndromo de 46-pb (Figura 1-9) capaz de asumir una estructura secundaria de alta estabilidad en cada cadena que se replica en forma discontinua (dirección 3' --> 5').

1.7. El derivado mini-Tn10 (Km) como sistema modelo para el estudio de deleciones genéticas en procariotas

1.7.1. Estructura

El mini-Tn10 (Km), también llamado mTn10 (Km), es un derivado construido *in vitro* a partir del transposón Tn10 (Kleckner, 1991). Es un elemento genético de 1.8-Kb que consiste en dos extremos repetidos invertidos perfectos de 70-pb, correspondientes al IS10-R, que flanquean un fragmento del transposón Tn903 (Figura 1-8). Este fragmento tiene en los extremos secuencias repetidas invertidas de 360-pb correspondientes al extremo interno de IS-903 y una secuencia central de 940-pb que codifica para resistencia al antibiótico kanamicina.

El mini-Tn10 (Km) insertado, al igual que el Tn10, está flanqueado por repeticiones directas de 9-pb originadas durante la inserción por la duplicación de la secuencia target del huésped.

1.7.2. Inserción

El mini-Tn10 (Km) no codifica para la enzima transposasa, pero es insertado en forma estable en distintos sitios del genoma por transposición a partir de construcciones genéticas especialmente diseñadas que aportan la transposasa en cis (Kleckner, 1991).

1.7.3. Escisión precisa

El mini-Tn10 (Km) puede escindir en forma precisa restaurando la secuencia original del sitio target. La frecuencia de escisión varía dependiendo del sitio de inserción. Se demostró que la escisión es fuertemente estimulada cuando moléculas conteniendo un mini-Tn10 (Km) son forzadas a replicarse a partir de un intermediario de cadena simple, como por ejemplo el replicón M13 (Brunier y col., 1988).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue el estudio de los factores ambientales y celulares que modulan la inducción de deleciones en procariotas. Se utilizó como sistema modelo la escisión precisa de los transposones Tn10 y mini-Tn10 en *Salmonella typhimurium* y en *Escherichia coli*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Medios de cultivo

LB (caldo de Luria): 5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 5 g de NaCl y agua destilada hasta un litro.

M9 (1 X): 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 0.5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl y agua destilada hasta un litro. Después de autoclavado se agregó 1 ml de MgSO₄ 1 M y 10 ml de CaCl₂ 0.01 M.

ME (1 X): 0.2 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de ácido cítrico, 10 g de K₂HPO₄ y 3.5 g de NaH(NH₄)PO₄·4H₂O y agua destilada hasta un litro.

EMM: medio mínimo ME suplementado con 1 % glucosa, 5 % de caldo nutritivo y los requerimientos necesarios.

SEM: medio mínimo ME suplementado con 0.4 % de glucosa, 2 % de caldo LB y triptofano (20 µg/ml).

CAEM: medio mínimo ME suplementado con 0.4 % de glucosa, 0.4 % de casaminoácidos y triptofano (0.2 µg/ml)

TM9: medio mínimo M9 suplementado con 0.4 % de glucosa, 1 µg/ml del aminoácido utilizado como traza y los requerimientos necesarios.

CAM9: medio mínimo M9 suplementado con 0.4 % de glucosa, 40 µg/ml de casaminoácidos y los requerimientos necesarios.

MacConkey base Difco: suplementado con 1 % de sorbitol o galactosa.

MacConkey base Difco 1/2: diluído a la mitad con agar 0.75 % y suplementado con 1 % de sorbitol o galactosa.

3.2. Químicos

Se utilizaron mitomicina C, cafeína, procaína, IPTG y X-gal provistos por Sigma Chemical Co.

3.3. Antibióticos

Se utilizaron tetraciclina (15 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$), estreptomicina (250 $\mu\text{g/ml}$) y ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) provistos por Sigma Chemical Co.

3.4. Cepas bacterianas, fagos y plásmidos

Las cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* se detallan en la Tabla 3-1a. Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* se detallan en la Tabla 3-1b.

La cepa híbrida *Escherichia coli* B/K12 fue obtenida en el laboratorio de E. Witkin por conjugación entre una cepa *Escherichia coli* B/r *recA441* y una cepa *Escherichia coli* K12 *uvrA155 trpE65 lon-11 sulA1* (Witkin y col., 1982). A partir de un único transconjugante original construyeron una familia de cepas derivadas con mutaciones en genes SOS (Sweasy y col., 1990). Este conjunto de cepas fue gentilmente enviado a este laboratorio vía E. Balbinder.

La cepa AB1157 es un derivado, luego de sucesivos pasos de mutagénesis, de la bacteria salvaje *Escherichia coli* cepa K12. La cepa AB1157, de uso muy difundido en los laboratorios, fue utilizada en el laboratorio de R. Lloyd para la obtención de mutaciones en genes de recombinación y de reparación del ADN.

Algunas de estas mutantes fueron gentilmente enviadas a este laboratorio por R. Lloyd.

Se utilizaron los fagos P22 (HT, int⁻), P1 (vir) y λ NK1316 (mini-Tn10 Km^r C1857 Pam80 nin5 b22 att^r hop). El fago λ NK1316 fue gentilmente enviado a este laboratorio por N. Kleckner.

El plásmido pKM101 es un derivado de R46, es transferible (F) y lleva los genes *mucAB*. El plásmido pTRecA102 es un derivado de pBR322 que lleva el gen *recA* de *Escherichia coli* bajo el control del promotor *tac* (Nastri y Knight, comunicación personal). El plásmido pTRecA102 fue gentilmente enviado a este laboratorio por H. Nastri.

3.5. Construcción de cepas bacterianas

3.5.1. Transducción

Se utilizó el fago P22 (HT, int⁻) para transducir genes en *Salmonella typhimurium* y se siguieron los protocolos de preparación de fago, titulación e infección de Davis y col. (1980).

Se utilizó el fago P1 para transducir genes en *Escherichia coli* y se siguieron los protocolos de preparación de fago, titulación e infección de Silhavy y col. (1984). Para la transducción de inserciones de los transposones Tn5 (resistencia a kanamicina), Tn3 (resistencia a ampicilina) y mini-Tn10 (resistencia a kanamicina), luego de la adsorción del fago, las bacterias se incubaron en LB durante 1 a 3 horas a los efectos de permitir la expresión de la resistencia previo a la siembra en medio selectivo. En los casos de transducción de inserciones del transposón Tn10, se realizó la selección de bacterias tetraciclina resistentes inmediatamente después de la

adsorción del fago.

3.5.2. Conjugación

La transferencia del plásmido pKM101 se realizó por conjugación en medio líquido según los protocolos de Miller (1972).

3.5.3. Transposición

Se generaron inserciones al azar en el cromosoma de *Escherichia coli* por infección con el fago λ NK1316 portador del derivado 103 (mini-Tn10 *kan* / *Ptac*-ATC transposasa). Se siguieron los protocolos de preparación de fago, titulación e infección descritos por Kleckner y col., 1991. Se realizaron 10 reacciones de infección independientes empleando como aceptora a la cepa *Escherichia coli* C115 (*gal*⁺ *su*). La selección de los clones transpuestos se efectuó en placas de MacConkey galactosa conteniendo kanamicina. Se obtuvieron entre 500-900 colonias kanamicina resistentes por placa. Se tomaron, de entre ellas, 3 colonias blancas correspondientes a inserciones en *gal* (*gal*⁻) generadas en reacciones independientes y se reaislaron en MacConkey galactosa kanamicina.

3.5.4. Transformación

Se obtuvo DNA del plásmido pTRec102 por el método de extracción de Birnboim y Doly (1979). Se prepararon células competentes y se transformaron con el plásmido pTRec102 siguiendo los protocolos de Maniatis y col. (1982).

3.5.5. Selección de bacterias tetraciclina sensibles

Para obtener derivados tetraciclina sensibles a partir de bacterias con inserciones de *Tn10* se realizó el procedimiento de Bochner y col. (1980) con las modificaciones propuestas por Maloy y Nunn (1981). Con este procedimiento se seleccionan bacterias tetraciclina sensibles en las que el transposón se escindió en forma precisa o generando deleciones y/o inversiones en las secuencias adyacentes.

3.5.6. Obtención de derivadas *recA*

Las cepas *recA* son recombinasa deficientes por lo tanto no pueden ser usadas como aceptoras para introducir *Tn10* por recombinación homóloga. Para obtener cepas *recA* portadoras de *Tn10* en *Salmonella typhimurium* y en *Escherichia coli* (Tabla 3-1a y Tabla 3-1b), se debieron construir varias cepas intermediarias:

- a) Por transducción con fago P22 o P1 se obtuvieron derivadas *recA⁺ srl⁻:Tn10*.
- b) Por el método de Bochner se seleccionaron las mutantes *Tc^S srl⁻ recA⁺*.
- c) Se introdujo a estas mutantes el transposón *Tn10* por transducción con fago P22 o P1, obteniéndose así cepas *srl⁻ recA⁺* con *Tn10* inserto en algún gen de interés.
- d) Estas cepas se usaron como aceptoras de fago P22 o P1 crecido en cepas *recA⁻ srl⁺*. El gen *recA* cotransduce con *srl* con una frecuencia del 40-90%.
- e) Se seleccionaron las transductantes *srl⁺* y se analizó su sensibilidad a irradiación ultravioleta. Un gran porcentaje de las colonias *srl⁺* presentaron las características de las cepas *recA*: alta sensibilidad a irradiación ultravioleta y deficiencia en la inducción de la mutabilidad.

3.6. Protocolo experimental

Cada cepa fue aislada en placas de LB conteniendo el antibiótico apropiado. Se tomaron entre 4 a 10 colonias aisladas, se inocularon individualmente en medio LB líquido y se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C o en baño de agua a 37°C con agitación. Estos cultivos fueron usados directamente o diluidos en medio fresco y vueltos a incubar con agitación. Se sembraron alcuotas de los mismos en placas de medio mínimo semi-enriquecido (EMM, SEM, CAEM, TM9, CAEM9) o de MacConkey base con el azúcar apropiado. En estas condiciones todos los revertantes que se analizan surgen, esencialmente, durante el crecimiento bacteriano en la placa. Así, cada cultivo provee una evaluación independiente de la frecuencia de reversión de cada cepa que no está distorsionada por revertantes preexistentes. Todas las frecuencias de reversión de un experimento dado fueron obtenidas tratando a todas las cepas en paralelo el mismo día.

Antes de cada experimento se controló la sensibilidad a cristal violeta, mitomicina C o irradiación ultravioleta de las mutantes en genes de reparación del ADN.

Los resultados que se muestran son el promedio de, al menos, tres experimentos sembrados por duplicado o triplicado. Sólo se consideraron válidos aquellos experimentos en los cuales todas las repeticiones dieron en el mismo sentido.

3.7. Detección de la escisión precisa

La escisión precisa se detectó por reversión de la mutación por inserción de Tn10 o mini-Tn10, analizando la reversión a prototrofia o capacidad de fermentación

de un azúcar del marcador correspondiente a la inserción en estudio. En la Lámina 1 se muestran fotografías de placas de MacConkey galactosa con revertantes Gal⁺ generadas por la escisión precisa desde *gal::Tn 10* en una cepa de *Escherichia coli* K12. En este trabajo se utilizan indistintamente los términos escisión precisa o escisión para referirse a la eliminación completa del transposón y a la restauración del genotipo original.

3.8. Detección de la mutabilidad puntual

Se detectó por reversión a prototrofia del marcador en estudio.

3.9. Experimentos con la mutante *uvrD* y cepas derivadas

Alícuotas de 0,1 ml de cultivos crecidos durante toda la noche con agitación a 37°C, se sembraron en placas de MacConkey sorbitol o EMM y las mismas se incubaron durante 48-72 hs. a 37°C.

3.9.1. Tratamiento con cafeína

Se sembraron alícuotas de 0,1 ml de cultivos crecidos durante toda la noche con agitación a 37°C en placas de MacConkey sorbitol o EMM conteniendo 1 mg/ml de cafeína.

3.9.2. Tratamiento con procaína

Se sembraron alícuotas de 0,1 ml de cultivos crecidos durante toda la noche con agitación a 37°C en placas de MacConkey sorbitol o EMM conteniendo 2 ó 4 mg/ml de procaína.

3.10. Tratamiento con mitomicina C

Alícuotas de 0,1 ml de cultivos crecidos durante toda la noche a 37°C con agitación, se sembraron en placas de MacConkey sorbitol, MacConkey 1/2 galactosa o EMM conteniendo mitomicina y las mismas se incubaron durante 48-72 hs. a 37 ° C. En algunos experimentos, se sembraron diluciones (10^{-6} - 10^{-7}) de dichos cultivos.

3.11. Irradiación con luz ultravioleta

Se utilizó una lámpara germicida General Electric de 15 watts. Las dosis de irradiación ultravioleta se determinaron con un método biológico basado en la sobrevivencia del fago T2 (Latarget y col., 1953) o con un dosímetro UVX. Se realizaron dos protocolos distintos de irradiación, en ambos casos luego de la irradiación se trabajó bajo luz amarilla para prevenir la fotoreactivación y las placas se incubaron en oscuridad a 37°C durante 2 ó 3 días.

3.11.1. Irradiación en medio líquido

Cultivos bacterianos crecidos en LB durante toda la noche fueron diluidos 1/20 en medio de cultivo fresco, incubados con agitación a 37°C hasta alcanzar

una D. O. $660 \mu\text{m} = 0.7$, centrifugados y resuspendidos en igual volumen de solución salina. Muestras de 5 ml de esta suspensión fueron colocadas en cajas de Petri de 9.5 cm de diámetro y expuestas durante distintos lapsos de tiempo a irradiación ultravioleta. A continuación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en $1/5$ del volumen original. Se sembraron alcuotas de 0,1 -0,2 ml de esta suspensión en las placas apropiadas (EMM, MacConkey sorbitol o MacConkey $1/2$ sorbitol). Para la estimación de la sobrevivencia a la irradiación ultravioleta se realizaron diluciones de esta suspensión de forma tal de contar 100-200 colonias en las placas controles no irradiadas y se sembraron en las placas apropiadas (EMM o MacConkey sorbitol) .

3.11.2. Irradiación en medio sólido

Cultivos bacterianos crecidos en LB durante toda la noche fueron diluidos $1/20$ en medio de cultivo fresco, incubados con agitación a 37°C hasta alcanzar una D. O. $660 \mu\text{m} = 0.8$ o D. O. $660 \mu\text{m} = 1.2$, centrifugados y resuspendidos en $1/5$ ó $1/10$ del volumen original en solución salina. Se sembró 0.1 ml de esta suspensión en las placas apropiadas (SEM, CAEM, TM9, CAEM9, MacConkey galactosa o MacConkey $1/2$ galactosa) y las mismas fueron expuestas a irradiación ultravioleta durante distintos lapsos de tiempo. Para la estimación de la sobrevivencia se sembraron diluciones de la suspensión de células de manera tal de contar 100-200 colonias en las placas controles no irradiadas, se utilizaron placas del mismo medio que el utilizado para el análisis de reversión o suplementado con el aminoácido faltante.

3.12. Experimentos con la mutante *recA730*, *lexA::Tn5* y cepas derivadas

Alícuotas de 0,1 ml de cultivos, crecidos durante toda la noche a 37°C en estufa, se sembraron en placas de MacConkey galactosa o SEM y las mismas se incubaron durante 48-72 hs. a 37 °C.

3.13. Cálculo de las frecuencias de mutación

Para calcular el número de revertantes inducidas por 10^8 sobrevivientes al promedio de revertantes por dosis se le restó el número promedio de revertantes espontáneas y se corrigió con respecto a la fracción de sobrevivientes.

Tabla 3-1a Cepas de *Salmonella typhimurium*

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
SB109	<i>ilvC401 metE338 rpsL ara-9</i>	P.Hartman, vía D. Antón
TT218	<i>metE862::Tn10</i>	J.Roth, vía E. Balbinder
SGSC508	<i>trp2451::Tn10</i>	J.Roth, vía E. Balbinder
TT521	<i>srl202::Tn10 recA</i>	J.Roth, vía E. Balbinder
GW1808	<i>hisG46 uvrD421::Tn5</i>	G.Walker
TA100	<i>hisG46/ pKM101</i>	B. Ames
TA1950	<i>hisG46 ΔuvrB</i>	B. Ames
NF144	como SB109, pero <i>metE</i> ⁺	este laboratorio
NF167	<i>trpE50 hisC340 leu500</i>	P.Margolin
NF168	como NF167, pero <i>supX82 (= topA)</i>	P.Margolin
NF182	como NF144, pero <i>srl202::Tn10</i>	este laboratorio
NF195	como NF182, pero <i>uvrD421::Tn5</i>	P22, GW1808 x NF182
NF213	como NF144, pero <i>metE862::Tn10</i>	este laboratorio
NF216	como NF213, pero <i>uvrD421::Tn5</i>	P22, GW1808 x NF213
NF227	como NF213, pero <i>ΔuvrB</i>	P22, TA1950 x NF213
NF228	como NF144, pero <i>srl202::Tn10 recA</i>	este laboratorio
NF232	como NF167, pero <i>metE862::Tn10</i>	P22, TT218 x NF167
NF233	como NF168, pero <i>metE862::Tn10</i>	P22, TT218 x NF168
NF234	como, NF227, pero <i>uvrD421::Tn5</i>	P22, GW1808 x NF227
NF237	como NF144, pero <i>trp2451::Tn10</i>	P22, SGSC508 x NF144
NF250	como NF195 <i>srl</i> ⁺ , pero <i>recA srl202::Tn10</i>	P22, NF228 x NF195 <i>srl</i> ⁺
NF272	como NF144, pero <i>metE862::Tn10 srl</i>	P22, TT218 x NF182 TCs*

Tabla 3-1a (continuación)

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
NF285	como NF172, pero <i>recA</i> ⁻	P22, TT521 <i>srl</i> ⁺ x NF272
NF293	como NF 167, pero <i>trp2451::Tn10</i>	P22, SGSC508 x NF167
NF294	como NF 168, pero <i>trp2451::Tn10</i>	P22, SGSC508 x NF168

Tabla 3-1b Cepas de *Escherichia coli*

Cepas	Genotipo relevante	Procedencia o procedimiento realizado
SC30RP	<i>uvrA155 lon-11 sulA1 trp65 srl::Tn10</i>	E.Witkin
SC30	como SC30RP, pero <i>recA730 srl</i> ⁺	E.Witkin
EW301	como SC30, pero <i>lexA71::Tn5</i>	E.Witkin
JS271	como EW301, pero <i>recA727</i>	E.Witkin
EST2590	<i>umuC122::Tn5 fadR261::Tn10</i>	P.Peterson
EST1096	<i>lexA3(ind⁻) zjb::Tn10</i>	P.Peterson
JM109	<i>recA1</i>	J.Messing
WPS2	como SC30RP, pero <i>uvrA</i> ⁺ <i>srl::Tn10</i>	E.Witkin
EB813	como SC30, pero <i>umuC122::Tn5</i>	E. Balbinder
BW7261	<i>leu63::Tn10</i>	B. Bachmann
NK6732	<i>leu82::Tn10</i>	N.Kleckner
NK5148	<i>thr34::Tn10</i>	N.Kleckner
3030	<i>gal76::Tn10</i>	B.Bachmann
EB301	como SC30RP, pero <i>srl</i> ⁺ TCs	Este laboratorio

Tabla 3-1b (continuación)

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
NF307	como EB301, pero <i>umuC122::Tn5</i>	P1, EST2590 x EB301 y TCs*
NF317	como EB301, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x EB301
NF318	como NF307 pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF307
NF319	como EB821, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x EB821
NF320	como NF339, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF339
NF325	como SC30, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x SC30
NF326	como EB813, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x EB813
NF327	como EB699, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x EB699
NF328	como EB815, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x EB815
NF339	como EB301, pero <i>lexA71::Tn5</i>	P1, EW301 x EB301
NF363	como EB301, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x EB301
NF364	como NF307, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x EB307
NF366	como SC30, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x SC30
NF373	como EB301, pero <i>lexA3(ind⁻)</i>	P1, EST1096 x EB301 y TCs*
NF374	como SC30, pero <i>lexA3(ind⁻)</i>	P1, EST1096 x SC30 y TCs*
NF375	como NF373, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF373
NF376	como NF374, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF374
NF378	como SC30RP, pero <i>srf</i>	TCs*
NF379	como NF378, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF378
NF380	como NF379, pero <i>recA1</i>	P1, JM109 x NF379
NF398	como EB301, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x EB301
NF399	como NF307, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030x EB307

Tabla 3-1b (continuación)

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
NF401	como NF339, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030x NF339
NF402	como SC30, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x SC30
NF419	como WPS2, pero <i>srl⁻</i>	TCs*
NF420	como NF419, pero <i>lexA3(ind⁻)</i>	P1, EST1096 x NF419 y TCs*
NF422	como NF419, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF419
NF423	como NF420, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x NF420
NF426a	como EB221, pero <i>recA⁺ srl::Tn10</i>	P1, WPS2 x EB221, selección TC ^r <i>alaS⁺ recA⁺</i>
NF426b	como NF426a, pero <i>srl⁺ gal76::Tn10</i>	TCs*, P1, 3030 x NF426a
NF427	como JS271, pero <i>leu63::Tn10</i>	P1, BW7261 x JS271
NF428	como JS271, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x JS271
AB1157	<i>thi-1 his-4 Δ(gpt-proA)62 argE3 thr-1 leuB6 ara14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31</i>	R. Lloyd
SP254	como AB1157, pero <i>recN262</i>	R. Lloyd
N2731	como AB1157, pero <i>recG258</i>	R. Lloyd
CS139	como AB1157, pero <i>ruvB52</i>	R. Lloyd
N2096	como AB1157, pero <i>ruvA60</i>	R. Lloyd
EB930	como AB1157, pero <i>recB21recC22 sbcB15</i>	E. Witkin
C115	HfrH <i>thi-1</i> (3000)	B. Bachman
3610	<i>recF::Tn3</i>	E. Balbinder
EST1096	<i>lexA3(ind⁻)zjb::Tn10</i>	P. Peterson
NF456	como AB1157, pero <i>gal⁺</i>	revertante espontánea

Tabla 3-1b (continuación)

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
NF457	como CS139 , pero <i>gal</i> ⁺	revertante espontánea
NF458	como N2096 , pero <i>gal</i> ⁺	revertante espontánea
NF459	como N2731 , pero <i>gal</i> ⁺	revertante espontánea
NF460	como SP254 , pero <i>gal</i> ⁺	revertante espontánea
NF471	como NF456 , pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF456
NF472	como NF457, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF457
NF473	como NF458, pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF458
NF474	como NF460 , pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF460
NF475	como NF459 , pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF459
NF598a	como C115, pero <i>gal1::mini-Tn10</i>	λNK1316 x C115
NF598b	como C115, pero <i>gal3::mini-Tn10</i>	λNK1316 x C115
NF598c	como C115, pero <i>gal5::mini-Tn10</i>	λNK1316 x C115
NF599	como NF598a, pero <i>lexA3(ind⁻) zjb::Tn10</i>	P1, EST1096 x NF598a
NF633	como EB930, pero <i>gal</i> ⁺	revertante espontánea
NF634	como NF633 , pero <i>gal76::Tn10</i>	P1, 3030 x NF633
NF635	como NF456, pero <i>gal1::mini-Tn10</i>	P1, NF598a x NF456
NF636	como NF457, pero <i>gal1::mini-Tn10</i>	P1, NF598a x NF457
NF637	como NF460, pero <i>gal1::mini-Tn10</i>	P1, NF598a x NF460
NF638	como NF471 , pero <i>recF::Tn3</i>	P1, 3610 x NF471
NF639	como NF474 , pero <i>recF::Tn3</i>	P1, 3610 x NF474
NF640	como AB1157 , pero <i>thr</i> ⁺	revertante espontánea
NF641	como CS139, pero <i>thr</i> ⁺	revertante espontánea
NF642	como N2096, pero <i>thr</i> ⁺	revertante espontánea

Tabla 3-1b (continuación)

cepa	genotipo relevante	procedencia o procedimiento realizado
NF643	como N2731 , pero <i>thr</i> ⁺	revertante espontánea
NF644	como SP254 , pero <i>thr</i> ⁺	revertante espontánea
NF645	como AB1157, pero <i>leu</i> ⁺	revertante espontánea
NF646	como CS139, pero <i>leu</i> ⁺	revertante espontánea
NF647	como N2096, pero <i>leu</i> ⁺	revertante espontánea
NF648	como N2731, pero <i>leu</i> ⁺	revertante espontánea
NF649	como SP254, pero <i>leu</i> ⁺	revertante espontánea
NF651	como NF640, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x NF640
NF652	como NF641, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x NF641
NF653	como NF642, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x NF642
NF654	como NF644, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x NF644
NF655	como NF643, pero <i>thr34::Tn10</i>	P1, NK5148 x NF643
NF661	como NF645, pero <i>leu82::Tn10</i>	P1, NK6732 x NF645
NF664	como NF649, pero <i>leu82::Tn10</i>	P1, NK6732 x NF649
NF665	como NF648, pero <i>leu82::Tn10</i>	P1, NK6732 x NF648

TCs*: derivadas tetraciclina sensibles obtenidas por el procedimiento de Bochner y col. (1980), modificado por Maloy y Nunn (1981).

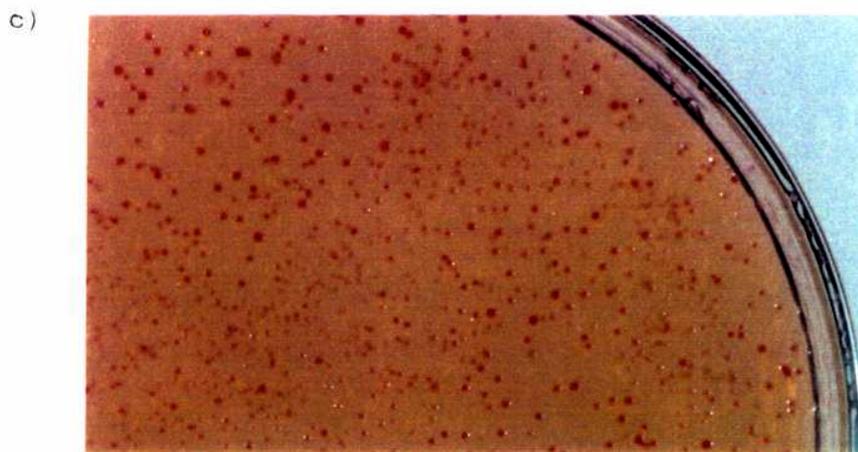
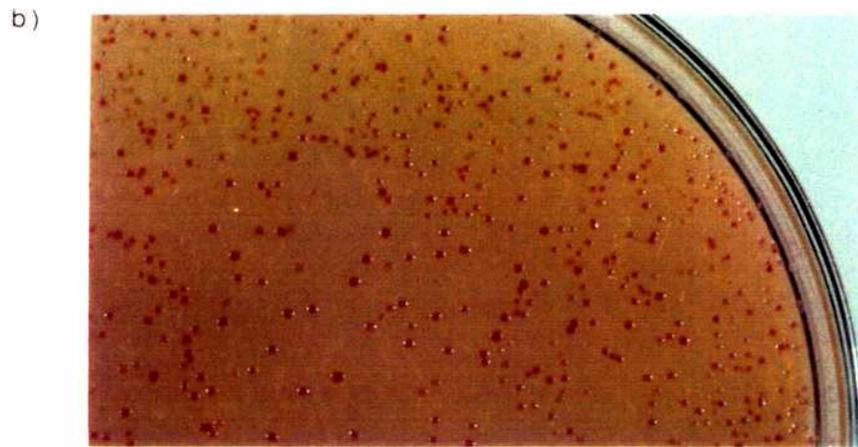


Lámina 1 Placas de MacConkey galactosa con revertantes Gal⁺ generadas por la escisión precisa desde *gal::Tn10* en una cepa de *Escherichia coli* K12: a) escisión espontánea, b) escisión inducida por 5 J/m² de irradiación ultravioleta, c) escisión inducida por 10 J/m² de irradiación ultravioleta.

4. RESULTADOS

4.1. Estudios sobre la modulación de la escisión precisa de Tn10 en *Salmonella typhimurium*

4.1.1. Escisión precisa de Tn10 inducida por deficiencia en la helicasa II

El gen *uvrD* (= *mutU*) codifica para la helicasa II, enzima involucrada en la reparación por escisión de dímeros y la reparación por apareamiento erróneo (mismatch). La expresión de *uvrD* está controlada por el sistema SOS de reparación. Estudios realizados en *Escherichia coli* (Lundblad y Kleckner, 1985) demostraron que la deficiencia en helicasa II provoca un incremento en las frecuencias de escisión precisa de Tn10 y que este incremento depende de un gen *recA* funcionalmente activo. Estudios realizados en este laboratorio (Lorenzo y col., 1990), demostraron que la deficiencia en helicasa II también provoca un incremento en las frecuencias de escisión precisa de Tn10 en *Salmonella typhimurium*.

4.1.1.1. Efecto de la mutación *recA*

Con el fin de estudiar el efecto de la mutación *recA* sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 en cepas *uvrD* (*uvrD*:Tn5) de *Salmonella typhimurium* se construyó una cepa *uvrD recA srl*:Tn10 (Tabla 3-1a., cepa NF250). Se analizó la frecuencia de escisión precisa de Tn10 y de mutación puntual (*ilv* a *ilv*⁺) en cepas *uvrD*⁺ *recA*⁺, *uvrD*⁻ *recA*⁺, *uvrD*⁻ *recA*⁻. Se observó que la mutación *recA* anula el efecto inductor de la mutación *uvrD* sobre la escisión de Tn10 pero que no afecta la frecuencia de la mutación puntual analizada (Tabla 4-1).

Estos resultados indicaron que al igual que en *Escherichia coli*, el

incremento en la frecuencia de escisión observada en mutantes *uvrD* de *Salmonella typhimurium* depende de un gen *recA* funcionalmente activo.

Tabla 4-1. Escisión precisa de Tn 10 inducida por deficiencia en la helicasa II
Efecto de la mutación *recA*

cepa	genotipo relevante	escisión precisa <i>srl202::Tn 10</i>		mutación puntual <i>ilvC401</i>	
		R/p \pm DS	FR	R/p \pm DS	FR
NF182	<i>uvrD</i> ⁺ <i>recA</i> ⁺	0,6 \pm 0,5	1,0	7,0 \pm 1,2	1,0
NF195	<i>uvrD</i> ⁻ <i>recA</i> ⁺	33,0 \pm 5,8	55,0	200,0 \pm 20	29,0
NF250	<i>uvrD</i> ⁻ <i>recA</i> ⁻	0,1 \pm 0,1	<0,1	171,0 \pm 30	24,0
NF228	<i>uvrD</i> ⁺ <i>recA</i> ⁻	0,3 \pm 0,2	0,5	0,7 \pm 0,2	0,1

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Abreviaturas: R/p, promedio de revertantes por placa; DS, desviación estándar del promedio; FR, frecuencia relativa.

4.1.1.2. Efecto del tratamiento con cafeína

La cafeína es una droga de efectos pleiotrópicos a la que se le han atribuido propiedades mutagénicas o antimutagénicas dependiendo del sistema estudiado y las condiciones empleadas (MacPhee y Hafner, 1988). La exposición de células de *Escherichia coli* a concentraciones de cafeína 10-100 mM inhibe la fotorreactivación y la reparación por escisión mediada por el complejo proteico UvrABC (Selby y col., 1990).

Se analizó el efecto del tratamiento con 1mg/ml de cafeína sobre la

frecuencia de escisión de Tn10 en mutantes *uvrD*. Se observó una disminución del 70 % en la frecuencia de escisión de Tn10 inserto en *srl* o en *met* y de la mutación puntual estudiada, *ilv* a *ilv*⁺ (Tabla 4-2). Para estudiar la participación del sistema UvrABC en este efecto antimutagénico de la cafeína, se construyó una cepa *uvrD*::Tn5 Δ *uvrB* (Tabla 3-1a., cepa NF234). Esta doble mutante mostró frecuencias de escisión similares a las de la cepa *uvrD*::Tn5 (Tabla 4-2). El tratamiento de esta cepa con cafeína no modificó las altas frecuencias de escisión, pero si la tasa de mutación puntual (Tabla 4-2).

Estos resultados sugieren que el efecto antimutagénico de la cafeína sobre la escisión de Tn10 inducida por deficiencia en el helicasa II está mediado por una proteína UvrB funcionalmente activa.

Tabla 4-2 Escisión precisa de Tn10 inducida por deficiencia en la helicasa II Tratamiento con cafeína.

cepa	genotipo relevante	cafeína mg/ml	escisión precisa <i>metE338</i> ::Tn10		mutación puntual <i>ilvC401</i>	
			R/p \pm DS	FR	R/p \pm DS	FR
NF216	<i>uvrD</i> ⁻ <i>uvrB</i> ⁺	0	58 \pm 5	1,0	878 \pm 24	1,0
		1	19 \pm 3	0,3	318 \pm 22	0,4
NF234	<i>uvrD</i> ⁻ <i>uvrB</i> ⁻	0	86 \pm 12	1,0	888 \pm 30	1,0
		1	93 \pm 12	1,0	255 \pm 29	0,3

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. El tratamiento con 1 mg/ml de cafeína no afectó la sobrevivencia de ninguna de las dos cepas. Abreviaturas: idem Tabla 4-1.

4.1.1.3. Efecto del tratamiento con procaína

La procaína es conocida como inhibidora de procesos de reparación del ADN (Todo y col., 1983; MacPhee y Hafner, 1988).

El tratamiento con 4 mg/ml de procaína provocó una disminución del 90% en la frecuencia de reversión puntual de *ilv⁻* a *ilv⁺* no se observaron diferencias significativas en las frecuencias de escisión de Tn10 en la cepa *uvrD* o en la doble mutante *uvrD uvrB* (Tabla 4-3).

Tabla 4-3 Escisión precisa de Tn10 inducida por deficiencia en la holicasa II Tratamiento con procaína

cepa	genotipo relevante	procaína mg/ml	escisión precisa <i>metE338::Tn10</i>		mutación puntual <i>ilvC401</i>	
			R/p ± DS	FR	R/p ± DS	FR
NF216	<i>uvrD⁻ uvrB⁺</i>	0	63 ± 4	1,0	828 ± 12	1,0
		2	62 ± 1	1,0	285 ± 5	0,3
		4	48 ± 5	0,8	82 ± 6	0,1
NF234	<i>uvrD⁻ uvrB⁻</i>	0	86 ± 6	1,0	940 ± 10	1,0
		2	74 ± 1	0,9	380 ± 15	0,4
		4	70 ± 16	0,8	120 ± 10	0,1

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. El tratamiento con 2 ó 4 mg/ml de procaína no afectó la sobrevivencia de ninguna de las dos cepas. Abreviaturas: idem Tabla 4-1.

4.1.2. Escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C

La mitomicina C es una sustancia genotóxica que genera uniones covalentes entre las cadenas complementarias de ADN impidiendo la separación de las mismas. Tiene efecto mutagénico y es un potente inductor del sistema SOS de reparación (Sassanfar y Roberts, 1991).

Se estudió el efecto de la mitomicina C sobre la frecuencia de escisión de Tn10 en *Salmonella typhimurium*. Se observó un aumento de hasta 5 veces en la frecuencia de escisión desde *met* o *srl* en las condiciones de ensayo utilizadas (Tabla 4-4).

4.1.2.1. Efecto de la mutación *recA*

Con el fin de estudiar el rol de la proteína RecA en la escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C, se construyó una derivada *recA* con Tn10 inserto en *srl* (Tabla 3-1a., cepa NF228).

Las mutantes *recA* son más sensibles a los efectos letales de la mitomicina C que la cepa salvaje, por ello se trabajó con concentraciones de mitomicina C 10 veces más bajas que las utilizadas con la cepa salvaje. El tratamiento con dosis de mitomicina C de 50-750 ng/ml provocó una mortalidad del 50 al 75 %. En estas condiciones, no se observó incremento en las frecuencias de escisión precisa de Tn10 desde *srl* (Tabla 4-4).

Tabla 4-4 Escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C

Efecto de la mutación *recA*

cepa	genotipo relevante	MMC $\mu\text{g/ml}$	S %	escisión precisa <i>srl202::Tn10</i>		escisión precisa <i>metE338::Tn10</i>	
				R/p \pm DS	RI	R/p \pm DS	RI
NF182 ó	<i>recA</i> ⁺	0	100	1,0 \pm 0,3		18 \pm 0,9	
NF213		0,5	80	5,0 \pm 0,8	2,8	35 \pm 3,3	10,1
		1	60	2,0 \pm 0,4	0,9	62 \pm 2,5	34,9
NF228	<i>recA</i> ⁻	0	100	0,8 \pm 0,2		nd	
		0,05	74	0,0 \pm 0	< 0,1		
		0,2	50	0,0 \pm 0	< 0,1		
		0,5	15	0,0 \pm 0	< 0,1		

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa NF182 para estudiar la escisión desde *srl* y la cepa NF213 para estudiar la escisión desde *met*. Abreviaturas: MMC, mitomicina C; S, sobrevivencia; R/P, promedio de revertantes/placa; DS, desviación estándar del promedio; RI, revertantes inducidas/ 10⁸ sobrevivientes; nd, no determinado.

4.1.3. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

La irradiación ultravioleta de longitud de onda alrededor de los 260 nm es fuertemente absorbida por las bases del ADN, y una consecuencia es la fusión fotoquímica de dos bases adyacentes de pirimidinas, generando una estructura no apareable y por ende no codificante. La irradiación ultravioleta es un potente inductor del sistema SOS de reparación.

Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 desde *met*, *trp* o *srl* y se analizó como control la reversión

puntual de *ilv*⁻ a *ilv*⁺.

Se observó un aumento de hasta 40 veces en la frecuencia de escisión de Tn10; la magnitud de este incremento varió dependiendo del sitio de inserción (Fig. 4-1).

4.1.3.1. Destino del transposón

Se aislaron 50 revertantes *met*⁺ producidos por escisión precisa de Tn10 desde *met*:Tn10 luego de irradiar las bacterias con luz ultravioleta. El 94% de las mismas resultaron ser sensibles a tetraciclina. Esto confirma que la escisión de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta lleva a la pérdida del transposón.

4.1.3.2. Efecto de la mutación *recA*

Para estudiar el rol de la proteína RecA en la inducción de la escisión por luz ultravioleta, se irradiaron cepas *recA* con inserciones de Tn10 en *srl* o en *met* (Tabla 3-1a., cepas NF228 y NF285). Las mutantes *recA* son más sensibles a los efectos letales de la irradiación ultravioleta que la cepa salvaje, por ello se trabajó con dosis de irradiación ultravioleta 10 veces más bajas que las utilizadas con la cepa salvaje. El tratamiento con dosis de 0,5 a 2 J/m² provocó una mortalidad del 40 al 4 %. En estas condiciones, no se observó incremento en las frecuencias de escisión precisa de Tn10 desde *met* o *srl* (Tabla 4-5).

Estos resultados indican que, al igual que la mutación puntual, el incremento en la frecuencia de escisión de Tn10 inducido por irradiación ultravioleta es dependiente de *recA*.

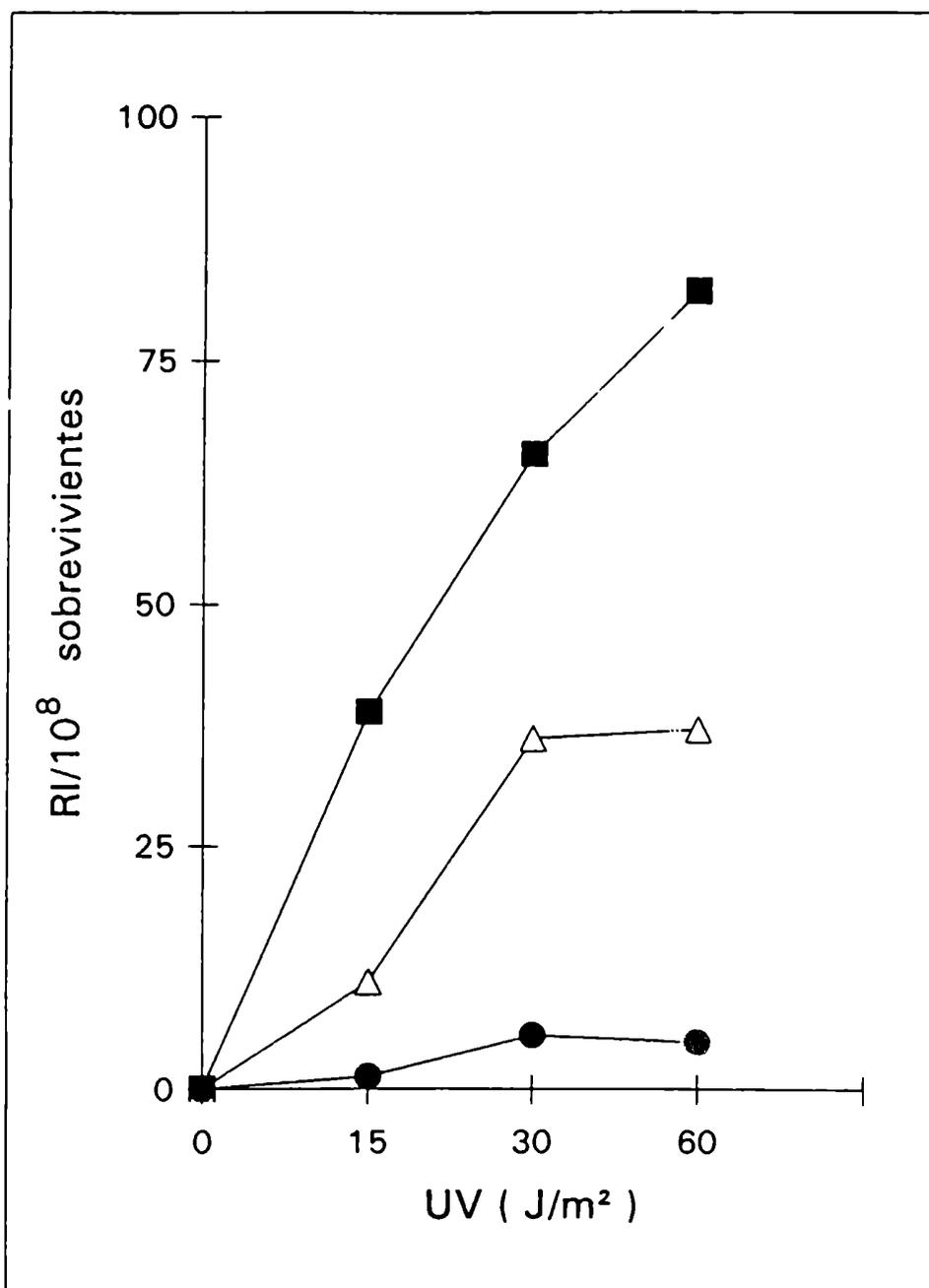


Figura 4-1 Efecto de la irradiación ultravioleta sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 desde distintos sitios del cromosoma. Las bacterias fueron irradiadas en medio líquido según se describe en Materiales y Métodos. Abreviaturas: RI, revertantes inducidas; UV, dosis de irradiación ultravioleta.

Símbolos:

■ NF213 (*metE862::Tn10*)

△ NF237 (*trp2451::Tn10*)

● NF182 (*slr202::Tn10*)

Tabla 4-5 Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa sr/202::Tn10		escisión precisa metE338::Tn10		mutación puntual ilvC401	
				R/p ± DS	RI	R/p ± DS	RI	R/p ± DS	RI
NF228 ó	recA ⁻	0	100	0,8 ± 0,3		7,0 ± 2,0		2,2 ± 0,6	
		0,5	40	nd		4,6 ± 1,4	< 0,1	1,0 ± 0,2	< 0,1
NF285		1	15	0,3 ± 0,1	< 0,1	1,0 ± 0,6	< 0,1	1,1 ± 0,4	< 0,1
		2	4	0,1 ± 0,1	< 0,1	nd		0,2 ± 0,1	< 0,1

Las bacterias fueron irradiadas en medio líquido, según se describe en Materiales y Métodos. Se utilizó la cepa NF228 para estudiar la escisión desde *sr/* y la cepa NF285 para estudiar la escisión desde *met*. Abreviaturas: UV, dosis de irradiación ultravioleta; S, sobrevivencia; R/P, promedio de revertantes/placa; DS, desviación estándar del promedio; RI, revertantes inducidas/ 10⁸ sobrevivientes; nd, no determinado.

4.1.3.3. Efecto de la mutación *uvrB*

Se estudió el efecto de una delección en el gen *uvrB* sobre la frecuencia de escisión precisa desde *met::Tn10* luego de irradiación ultravioleta.

La mutante $\Delta uv r B$, al ser irradiada con dosis de 2 a 5 J/m², mostró una inducción de la escisión precisa, y de la mutación puntual, 100 a 200 veces mayor que la de la cepa salvaje (Fig. 4- 2).

Estos resultados indican que el incremento en la escisión precisa de *Tn10* luego de irradiación ultravioleta no es *uvrB* dependiente y que su frecuencia, al igual que la de la mutación puntual se correlaciona con la cantidad de dímeros de pirimidinas provocados por el daño al ADN.

4.1.3.4. Efecto del plásmido pKM101

El plásmido pKM101 (*mucAB*⁺) aumenta la mutabilidad puntual y la resistencia a la irradiación ultravioleta. Con el fin de estudiar el efecto de este plásmido sobre la inducción de la escisión precisa de *Tn10* por irradiación ultravioleta, se prepararon cepas *metE338::Tn10* o *trp2451::Tn10* portadoras del mismo. Se comparó la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta en cepas portadoras y no portadoras. El plásmido pKM101 redujo el efecto inductor de la irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa desde *metE338::Tn10* y tuvo poco efecto sobre la escisión precisa desde *trp2451::Tn10* (Fig. 4-3).

Estos resultados indican que los procesos de inducción de la mutación puntual e inducción de la escisión de *Tn10* estarían modulados por mecanismos distintos. Asimismo sugieren que la presencia de pKM101 puede afectar en mayor o en menor medida la frecuencia de escisión dependiendo del sitio de inserción de *Tn10*.

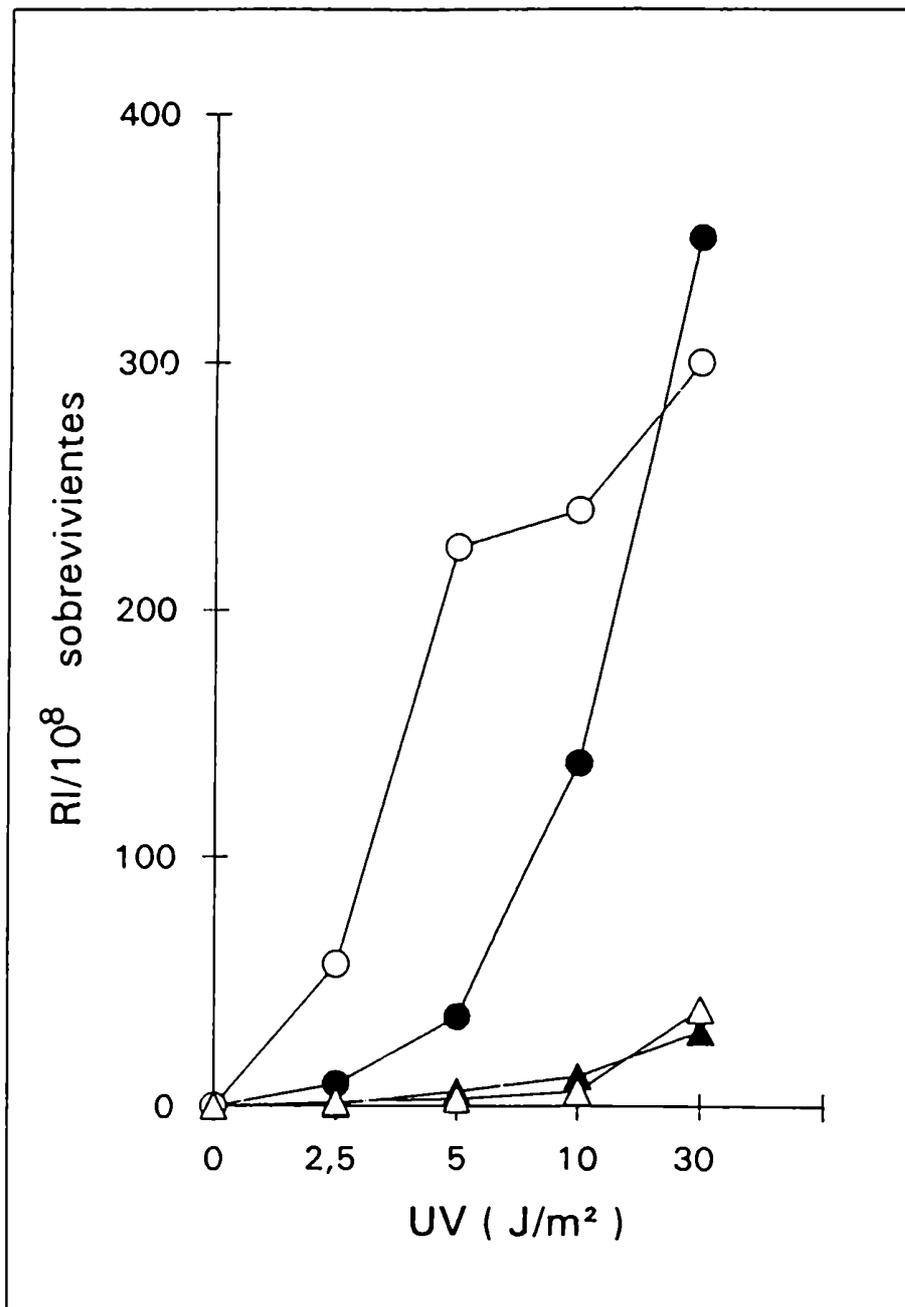


Figura 4-2 Efecto de la mutación $\Delta uvrB$ sobre la escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta. Condiciones experimentales y abreviaturas: idem Fig. 1.

Símbolos:

- ▲ escisión precisa desde *metE862::Tn10* en NF213 (*uvrB*⁺)
- escisión precisa desde *metE862::Tn10* en NF227 ($\Delta uvrB$)
- △ mutación puntual *ilvC401* en NF213 (*uvrB*⁺)
- mutación puntual *ilvC401* en NF227 ($\Delta uvrB$)

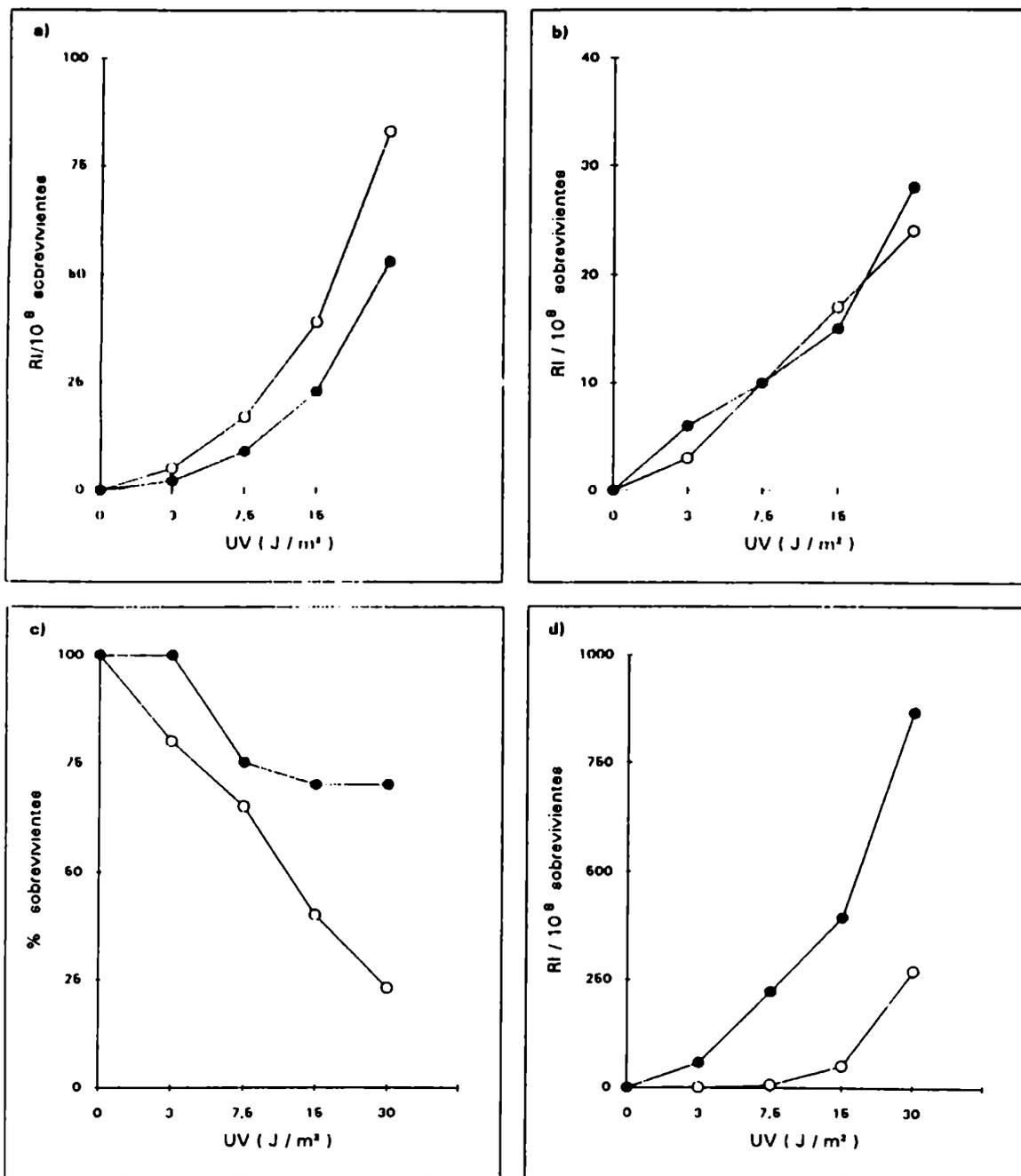


Figura 4-3 Efecto del plásmido pKM101 en la escisión precisa de *Tn10* inducida por irradiación ultravioleta.

a) Escisión precisa desde *metE862::Tn10* en NF213 y en NF213/pKM101.

b) Escisión precisa desde *trp2451::Tn10* en NF237 y en NF237/pKM101.

c) Supervivencia a irradiación ultravioleta de NF213 y de NF213/pKM101.

d) Mutación puntual *ilvC401* a *ilvC+* en NF213 y en NF213/pKM101.

Condiciones experimentales y abreviaturas: idem Fig. 4-1.

Símbolos:

○ - pKM101

● + pKM101

4.1.3.5. Efecto de la mutación *topA*

La mutación *topA* (deficiencia en topoisomerasa I) afecta la expresión de varios genes (Pruss y Drlica, 1989). Las mutantes *topA*, son muy sensibles al efecto letal de la irradiación ultravioleta pero no mutables por irradiación ultravioleta para el caso de la mutación puntual (Oberbye y col., 1981).

Para estudiar el efecto de una mutación *topA* sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta, se introdujeron inserciones de Tn10 en *met* o en *trp* en cepas *topA*⁻ e isogénicas *topA*⁺ (Tabla 3-1a., cepas NF232, NF233, NF293 y NF294).

Se analizó la frecuencia de escisión de Tn10 luego de irradiación ultravioleta en estas cepas. En las mutantes *topA*, la irradiación con dosis entre 4 a 7.5 J/m² produjo un incremento en las frecuencias de escisión igual o mayor al observado en la cepa control *topA*⁺. Este resultado contrasta con la deficiencia en la inducción de la mutabilidad puntual característico de las cepas *topA* (Tabla 4-6).

4.1.3.6. Efecto del plásmido pKM101 en las mutantes *topA*

El plásmido pKM101 restituye la mutabilidad puntual por UV de las mutantes *topA* (Oberbye y col., 1981).

Se construyeron mutantes *topA met::Tn10* portadoras del plásmido y se estudió la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta. Se observó una disminución de la inducción con respecto a las cepas no portadoras (Fig. 4-4).

Los resultados con las mutantes *topA* con y sin el pKM101 indican que los procesos de inducción de la mutación puntual e inducción de la escisión de Tn10 estarían controlados por mecanismos distintos.

Tabla 4-6 Escisión precisa de Tn 10 inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de la mutación *topA*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación puntual	
				<i>metE338::Tn 10</i>		<i>trpE50</i>	
				R/p ± DS	RI	R/p ± DS	RI
NF232	<i>topA</i> ⁺	0	100	15 ± 5		19 ± 0,6	
		4	71	30 ± 3	7	21 ± 2,6	1
		7,5	70	40 ± 8	12	32 ± 4	6
		15	61	52 ± 7	20	75 ± 6	30
NF233	<i>topA</i> ⁻	0	100	4 ± 1		21 ± 3	
		4	32	15 ± 3	12	21 ± 2,8	<1
		7,5	7	12 ± 3	40	15 ± 1,4	<1
		15	nd	nd		nd	

Las bacterias fueron irradiadas en medio líquido según se describe en Materiales y Métodos. Abreviaturas: idem Tabla 4-5.

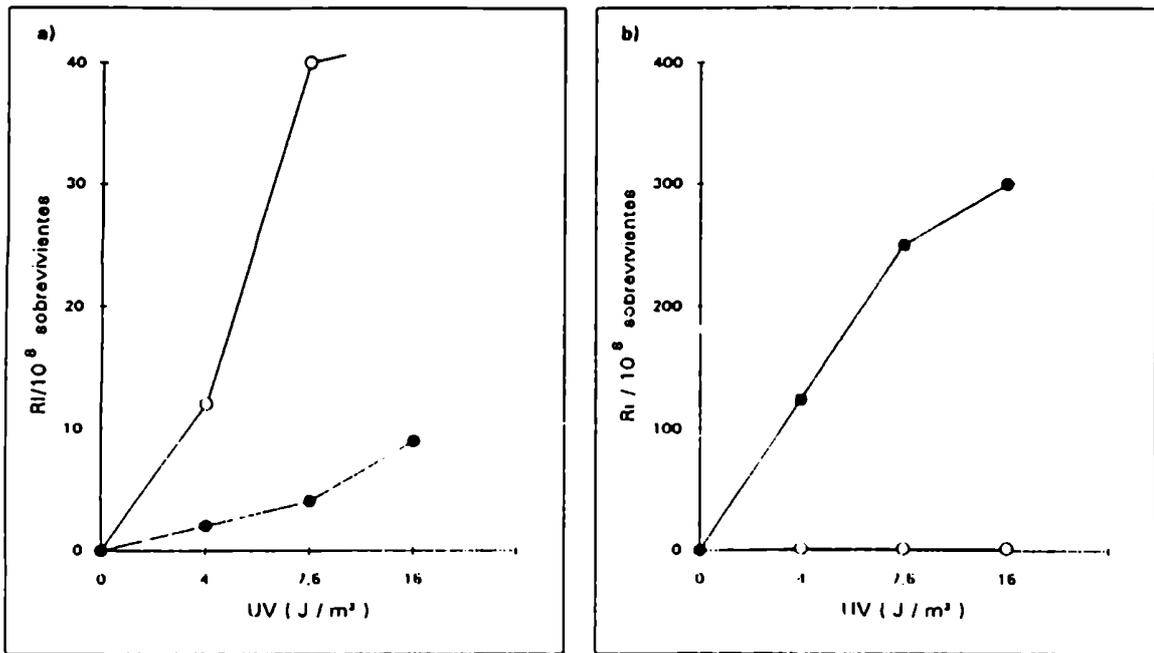


Figura 4-4 Efecto del plásmido pKM101 en la escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta en mutantes *topA*.

a) Escisión precisa desde *metE862::Tn10* en NF233 y en NF233 / pKM101.

b) Mutación puntual *trpE50* a *trp⁺* en NF233 y en NF233 / pKM101.

Condiciones experimentales y abreviaturas: ídem Fig. 4-1.

Símbolos:

○ *topA*

● *topA / mucAB⁺*

4.2. Estudios sobre la modulación de la inducción de la escisión precisa de Tn10 en *Escherichia coli* B/K12

Con el objeto de dilucidar el rol de distintos genes del sistema SOS de reparación (*recA*, *lexA*, *umuC*) en la inducción de la escisión precisa de Tn10, se continuaron los estudios en *Escherichia coli*. En esta bacteria se han aislado y caracterizado numerosas mutaciones en genes pertenecientes a este multioperón (Walker, 1984).

4.2.1. Escisión precisa de Tn10 en mutantes SOS constitutivas

La respuesta SOS puede ser activada por mutaciones en los genes regulatorios *recA* y *lexA* (Walker, 1984). Las mutantes que expresan el sistema SOS de reparación en forma constitutiva son viables sólo si el gen *sulA* (*sfiA*) está mutado de forma tal de inactivar su producto, el cual es un inhibidor de la división celular. Las mutantes SOS constitutivas son ampliamente usadas para el estudio de la respuesta SOS ya que evitan el uso de agentes externos que causen lesiones en el ADN (Dimpfl y Echols, 1989; Sweasy y col., 1990).

4.2.1.1. Efecto de la mutación *recA730*

El alelo mutante *recA730* provoca la expresión constitutiva de la respuesta SOS debido a que la proteína RecA existe en la forma activada (RecA*) en ausencia de daño al ADN (Witkin y col., 1982; Kirchner y col., 1992). La cepa híbrida *Escherichia coli* B/r-K12 portadora del mutación *recA730* fue obtenida en el laboratorio de E. Witkin por conjugación entre una cepa *Escherichia coli* B/r *recA441*

y *Escherichia coli* K12 y selección de un transconjugante que expresaba constitutivamente la respuesta SOS a 30°C. Para mapear el locus realizaron una transducción con fago P1 crecido en una cepa *recA⁺ srlC::Tn10 alaS* y demostraron que su mutación mapeaba en el gen *recA* pues cotranducía 60-90 % con *srlC* y 94% con *alaS* (Witkin y col., 1982). Luego consideraron a esta cepa como control isogénico *recA⁺* y construyeron una familia de cepas derivadas.

En las cepas portadoras de la mutación *recA730* la frecuencia espontánea de mutación puntual incrementa hasta 50 veces. Con el fin de estudiar el efecto de la mutación *recA730* sobre la frecuencia espontánea de escisión precisa de *Tn10*, se introdujeron inserciones de *Tn10* en este juego de cepas (Tabla 3-1b., cepas NF317, NF325, NF363, NF366, NF398 y NF402). Se analizaron las frecuencias de escisión precisa de *Tn10* de 20 cultivos independientes de cada cepa. En experimentos preliminares se observó una diferencia de hasta 10 veces en la frecuencia de escisión precisa de *Tn10* desde *leu*, *thr* o *gal* entre las cepas *recA730* y las cepas *recA⁺*. Estas diferencias fueron luego atribuibles a la deficiencia en alanina sintetasa de las cepas *recA⁺*, ya que derivadas *alaS⁺ recA⁺* (Tabla 3-1b., cepas NF426a y NF426b) no mostraron diferencias significativas (utilizando el test de χ^2 , $\chi^2_{0,95}$) en las frecuencias de escisión precisa de *Tn10* con las cepas *recA730*. La deficiencia en alanina sintetasa, que retarda el crecimiento a 37°C, no afectó la frecuencia de la mutación puntual de *trp⁻* a *trp⁺*.

4.2.1.2. Efecto de la mutación *lexA* defectiva

La mutante *lexA::Tn5* expresa los genes SOS constitutivamente debido a la ausencia del represor LexA (Walker , 1984). Con el fin de estudiar el efecto de una mutación *lexA* defectiva sobre la frecuencia espontánea de escisión precisa de *Tn10*, se introdujo *lexA::Tn5* en cepas *leu::Tn10* y *gal::Tn10* (Tabla 1b., cepas NF320 y NF401). Se analizaron las frecuencias de escisión precisa de *Tn10* de 20

cultivos independientes de cada cepa. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias espontáneas de escisión entre las cepas *lexA* y *lexA::Tn5* (utilizando el test de χ^2 , $\chi^2_{0,95}$).

4.2.2. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 desde *leu*, *thr* o *gal*. Se observó un incremento de hasta 30 veces en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 (Tabla 4-8 y Fig. 4-6).

4.2.2.1. Destino del transposón

Se aislaron 84 revertantes *leu*⁺ inducidas por irradiación ultravioleta de la cepa NF317 (*leu::Tn10*). Todas resultaron ser sensibles a tetraciclina. Esto confirma que la escisión de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta lleva a la pérdida del transposón.

4.2.2.2. Efecto de la mutación *recA1*

La proteína mutante RecA1 es deficiente para todas las funciones conocidas de RecA (Dutreix y col., 1989).

Con el fin de estudiar el rol de la proteína RecA en la inducción de la escisión por luz ultravioleta, se construyó una cepa *recA1 leu::Tn10* (Tabla 3-1b., cepa NF380). Las mutantes *recA* son más sensibles a los efectos letales de la irradiación ultravioleta que las cepas *recA*⁺, por ello se trabajó con dosis de UV 10 veces más bajas que las utilizadas con la cepa control. El tratamiento con dosis entre 0,25 a 0,5 J/m² provocó una mortalidad del 80 al 96 %. En estas condiciones, no se observó incremento en las frecuencias de escisión precisa de Tn10

desde *leu* ni de la mutación puntual desde *trp* (Tabla 4-7).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en *Salmonella typhimurium* y sugieren que la inducción de la escisión precisa de Tn10 es *recA* dependiente, coincidiendo con lo que ocurre en la inducción de la mutagénesis puntual.

Tabla 4-7 Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de la mutación *recA*

cepa	genotipo. relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación puntual	
				<i>leu63::Tn10</i>		<i>trp65</i>	
				R/p ± DS	RI	R/p ± DS	RI
NF380	<i>recA</i> ⁻	0	100	0,3 ± 0,2		5,7 ± 0,5	
		0,25	20	0,2 ± 0,1	<0,1	2,0 ± 0,6	<0,1
		0,5	4	0,2 ± 0,1	<0,1	1,0 ± 0,3	<0,1

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido según se describe en Materiales y Métodos. Abreviaturas: idemTabla 4- 5.

4.2.2.3. Efecto de la mutación *lexA3* (Ind⁻)

La mutación *lexA3*(ind⁻) codifica para una proteína LexA no clivable por RecA, las cepas portadoras de esta mutación presentan los genes del regulón SOS permanentemente reprimidos (Little y col., 1980). A partir de fago P1 preparado sobre una cepa *lexA3* (ind⁻) *zjb::Tn10* se construyeron cepas portadoras de la mutación en distintos contextos genéticos:

a) Se construyó una cepa *recA*⁺ *lexA3*(ind⁻) (Tabla 3-1b., cepa NF375). Al irradiarla con dosis de 1 a 5 J/m² se obtuvo entre el 59 al 5 % de supervivencia. En estas condiciones no se observó inducción de la escisión de Tn10 (Tabla 4-8).

b) Se construyó una cepa *recA730* *lexA3*(ind⁻) (Tabla 3-1b., cepa NF376). Al

irradiarla con dosis de 1 a 5 J/m² se obtuvo entre el 25 al 1 % de supervivencia. En estas condiciones no se observó inducción de la escisión de Tn10 (Tabla 4-8).

En la Tabla 4-8 se muestran las frecuencias de escisión de Tn10 luego de irradiación ultravioleta de las cepas *lexA*⁺ y de una cepa *lexA::Tn5* (sistema SOS permanentemente desreprimido) usadas como controles de inducción.

Estos resultados demuestran que es necesaria la desrepresión de alguno de los genes controlados por LexA (regulón SOS) para incrementar la frecuencia escisión de Tn10 luego de irradiación ultravioleta.

4.2.2.4. Efecto del plásmido pTRecA102

Para determinar si cantidades aumentadas de proteína RecA en condiciones de represión de los demás genes del sistema SOS son suficientes para inducir la escisión, se realizaron experimentos con el plásmido pTRecA102. Este plásmido lleva clonado el gen *recA* fusionado al promotor *tac* el cual es regulable por IPTG. Se introdujo este plásmido por transformación en cepas *recA1* y *lexA3(ind⁻)*. La presencia del plásmido restauró la inducibilidad de la escisión en la cepa *recA1* (RecA defectiva), sin embargo no modificó las frecuencias de escisión de la cepa *lexA3(ind⁻)* (LexA no clivable) (Tabla 4-9).

Estos resultados indican que se requiere la expresión de uno o varios genes SOS distintos de *recA* para que se produzca la inducción de la escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta.

4.2.2.5. Efecto de la mutación *recA730*

Se estudió el efecto de la mutación *recA730* sobre la inducción de la escisión de Tn10 por irradiación ultravioleta. Se observó un incremento de 3 a 10 veces al irradiar con dosis de 1 a 5 J/m² (Tabla 4-8 y Fig. 4-7).

4.2.2.6. Efecto de la mutación *lexA*::Tn5

Se estudió el efecto de la mutación *lexA*::Tn5 sobre la inducción de la escisión de Tn10 por irradiación ultravioleta. Se observó un incremento de 4 a 7 veces al irradiar con dosis de 1 a 5 J/m² (Tabla 4-8).

Tabla 4-8 Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de mutaciones en *lexA*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación	
				<i>leu63::Tn10</i>		puntual <i>trp65</i>	
				R/p	RI	R/p	RI
NF317	<i>recA⁺ lexA⁺</i>	0,0	100	0,3	–	7	–
		1,0	84	4,0	3,0	60	43
		2,5	76	7,0	6,0	360	320
		5,0	39	9,0	15,0	440	600
NF375	<i>recA⁺ lexA3(ind⁻)</i>	0,0	100	0,8	–	2	–
		1,0	59	1,1	<1	3	<1
		2,5	27	0,5	<1	1	<1
		5,0	5	0,5	<1	nd	
NF320	<i>recA⁺ lexA::Tn5</i>	0,0	100	1,0	–	25	–
		1,0	81	4,0	3,0	300	289
		2,5	78	5,0	4,0	400	408
		5,0	40	7,5	14,0	480	968
NF325	<i>recA730 lexA⁺</i>	0,0	100	1,5	–	180	
		1,0	100	4,0	2,3	nd	
		2,5	90	10,0	9,0	400	234
		5,0	83	16,0	17,0	480	344
NF376	<i>recA730 lexA3(ind⁻)</i>	0,0	100	0,8	–	6	–
		1,0	25	0,5	<1	4	<1
		2,5	5	0,6	<1	2	<1
		5,0	1	0,0	<1	0	<1

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 10 al 16 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idemTabla 4- 5.

Tabla 4-9 Escisión precisa de Tn 10 inducida por irradiación ultravioleta
Efecto del plásmido pTRecA102 en mutantes *recA1* y *lexA3(ind⁻)*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación puntual	
				<i>leu63::Tn10</i>		<i>trp65</i>	
				R/p	RI	R/p	RI
NF380/ pTRecA102	<i>recA1 lexA⁺/</i>	0	100	1		7	
	<i>ptac-recA⁺</i>	2,5	65	8	3,5	260	130
		5	24	10	12,5	350	476
NF375/ pTRecA102	<i>recA⁺ lexA3/</i>	0	100	0,5		1,0	
	<i>ptac-recA⁺</i>	1	56	0,0	<1	0,5	<1
		2,5	34	0,3	<1	1,0	<1
		5	2	0,3	<1	0,0	<1

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron placas conteniendo 1mM de IPTG. La desviación estándar osciló entre el 5 al 10 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idemTabla 4-5.

4.2.2.7. Efecto del alelo *recA727*

La proteína mutante RecA727 presenta dos aminoácidos cambiados con respecto a la proteína salvaje. Las mutantes *recA727* no son mutables por irradiación ultravioleta, son más sensibles a irradiación ultravioleta que las cepas *recA⁺* y presentan capacidad recombinatoria normal. Se introdujeron inserciones de Tn 10 en *leu* o en *gal* en una cepa *recA727 lexA::Tn5* (Tabla 3-1b., cepas NF427, NF428). Se estudió la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta en las mismas. Se observó un incremento de entre 5 a 10 veces en las frecuencias de escisión (Fig. 4-5).

Estos resultados demuestran que al menos una de las funciones de RecA indispensables para la inducción de la mutación puntual no *está* involucrada en la inducción de la escisión precisa de Tn 10.

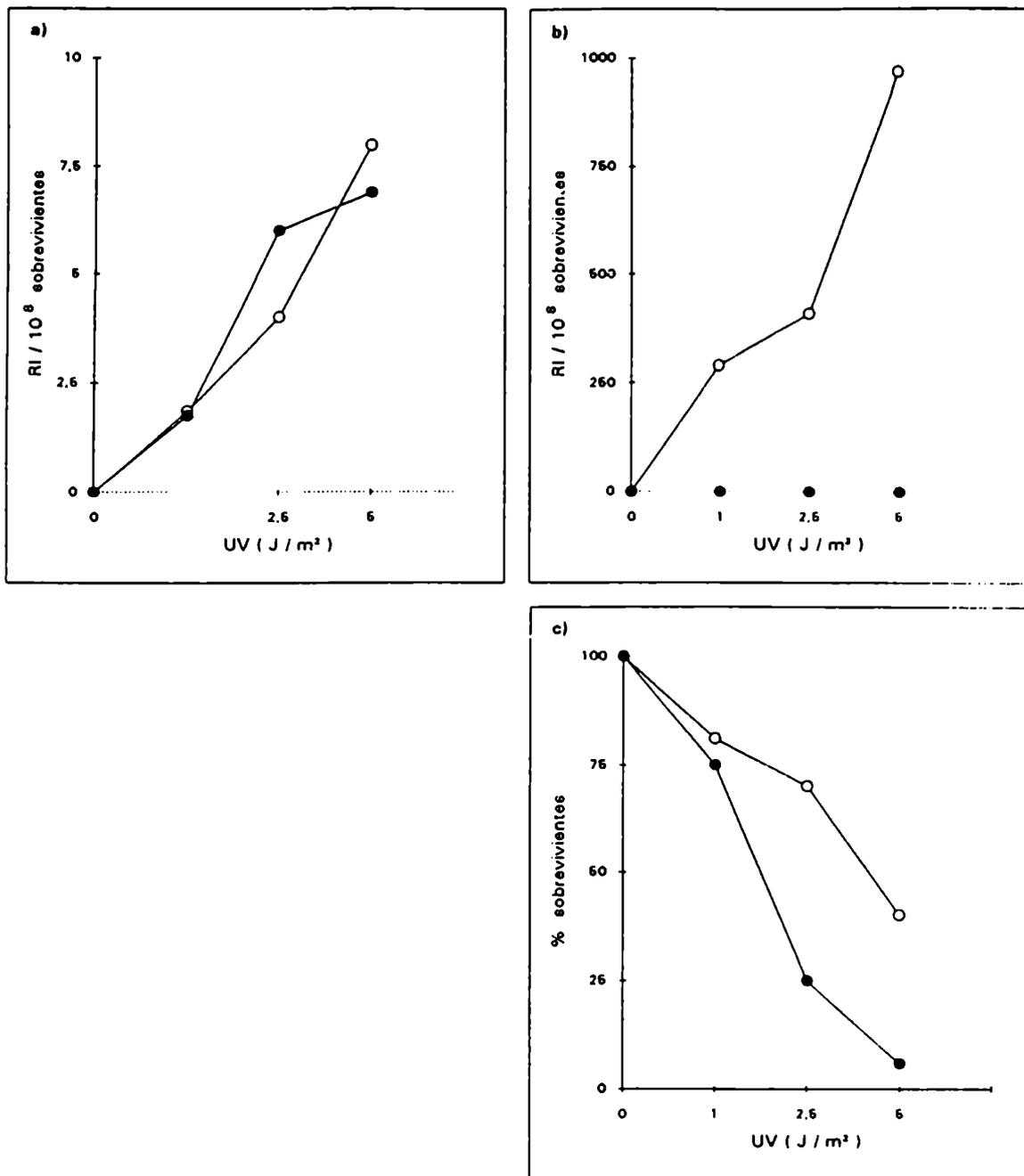


Figura 4-5 Efecto de la mutación *recA727* en la escisión precisa de *Tn10* inducida por irradiación ultravioleta.

a) Escisión precisa desde *leu63::Tn10* en NF320 y en NF427.

b) Mutación puntual *trp65* a *trp+* en NF320 y en NF427.

c) Sobrevivencia a irradiación ultravioleta de NF320 y de NF427.

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido según se describe en Materiales y Métodos. Abreviaturas: ídem fig. 4-1.

Símbolos:

○ *recA+*

● *recA727*

4.2.2.8. Efecto de la mutación *umuC*:Tn5

La mutagénesis provocada por la inducción del sistema SOS de reparación se debe a la replicación propensa a error (error prone) la cual se expresa en *Escherichia coli* luego del tratamiento con irradiación ultravioleta o con agentes químicos que bloquean la replicación del ADN. Los genes *umuD* y *umuC* son esenciales para la generación de mutaciones inducidas por daño (Kushner, 1987; Shinagawa y col., 1988). Las mutantes *umuC* no son mutables por irradiación ultravioleta para el caso de la mutación puntual. Se introdujeron inserciones de Tn10 en *leu*, *thr* o *gal* en una cepa *umuC*:Tn5 o *umuC*:Tn5 *recA730* (Tabla 3-1b., cepas NF318, NF364, NF399 y NF326). Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 en estas cepas. Se observó un incremento de hasta 8 veces al irradiar con dosis entre 2,5 a 7,5 J/m² (Tabla 4-10, Fig. 4- 6 y Fig. 4- 7).

Estos resultados demuestran que, al contrario de la mutación puntual, la escisión de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta es *umuC* independiente.

4.2.2.9. Efecto del plásmido pKM101

El plásmido pKM101 codifica para los genes *mucAB* homólogos de los genes cromosomales *umuDC*. El plásmido pKM101 restituye la mutabilidad puntual de las cepas *umuC*. Se prepararon cepas derivadas portadoras del plásmido. Se comparó la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta en cepas portadoras y no portadoras. La presencia del pKM101 redujo el efecto inductor de la luz ultravioleta tanto en las cepas *umuC*⁺ como en las *umuC*⁻ (Tabla 4-10, Fig. 4- 6 y Fig. 4- 7)

Estos resultados sugieren un efecto modulador negativo de los genes codificados por este plásmido sobre la inducción de la escisión de Tn10 correspondiente a las dosis de irradiación ultravioleta utilizadas.

Tabla 4-10 Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta
Efecto de la mutación *umuC* y del plásmido pKM101

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	- pKM101			+ pKM101				
			S		S		S			
			escisión precisa leu63::Tn10 R/p	escisión precisa leu63::Tn10 RI	mutación puntual <i>trp65</i> R/p	mutación puntual <i>trp65</i> RI	escisión precisa leu63::Tn10 R/p	escisión precisa leu63::Tn10 RI	mutación puntual <i>trp65</i> R/p	mutación puntual <i>trp65</i> RI
NF317	<i>umuC</i> ⁺	0	100	0,6	-	11	100	0,5	-	23
		2,5	63	8,3	9	nd	92	2,7	2,8	nd
		5,0	56	10,0	12	440	536	4,0	5,0	1320
NF318	<i>umuC</i> ⁻	0	100	1,3	-	13	100	1,3	-	38
		2,5	53	8,7	6	nd	74	4,0	1,6	nd
		5,0	14	11,0	27	4	<1	6,0	2,9	1520

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 10 al 18 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idemTabla 4-5.

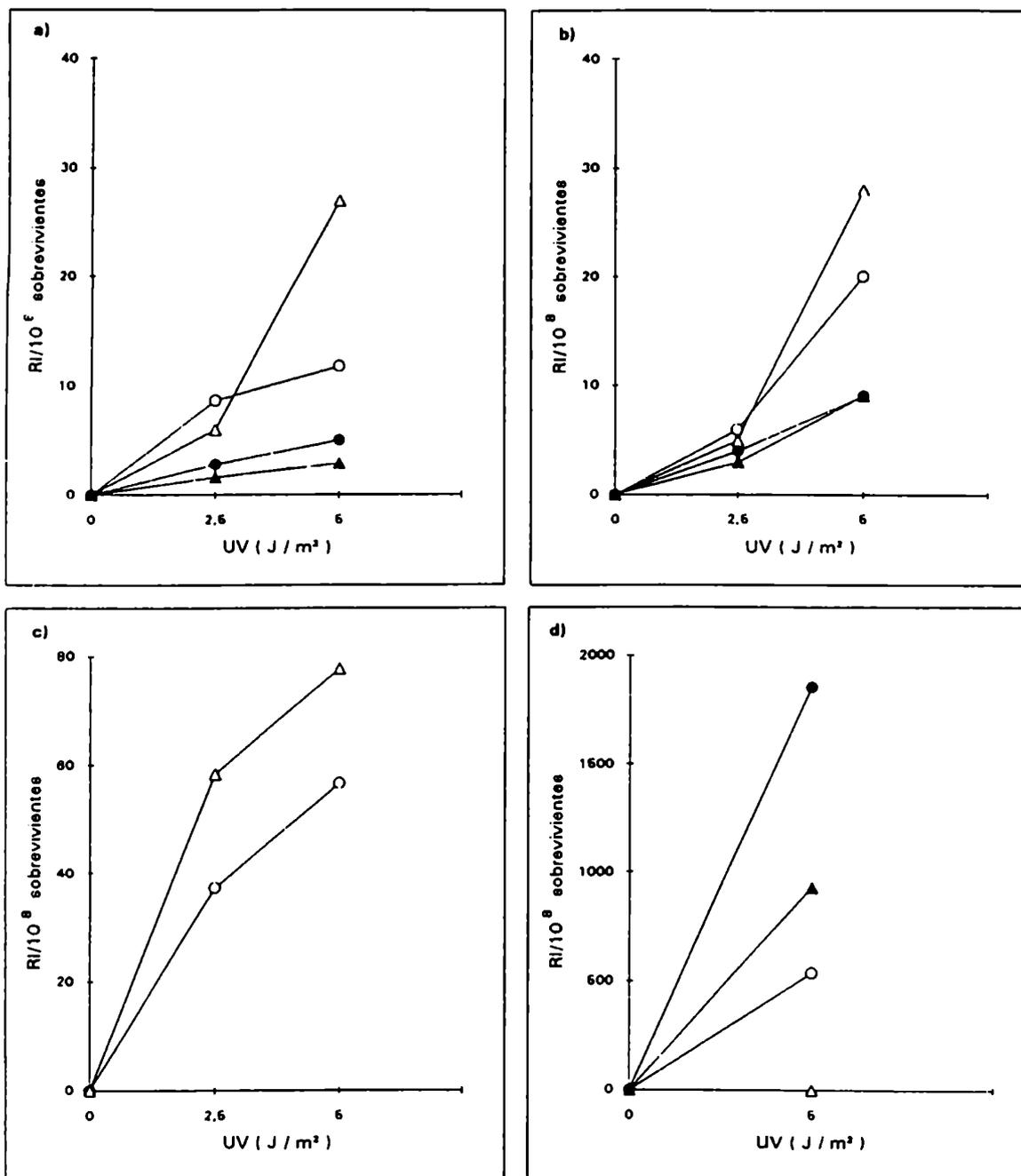


Figura 4-6 Efecto de la mutación *umuC* y del plásmido pKM101 en la escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta.

a) Escisión precisa desde *leu63*::Tn10 en NF317, NF318, NF317/ pKM101 y NF318/ pKM101. b) Escisión precisa desde *thr34*::Tn10 en NF363, NF364, NF363/pKM101 y NF364/pKM101. c) Escisión precisa desde *gal76*::Tn10 en NF398 y NF399. d) Mutación puntual *trp65* a *trp*⁺ en NF317, NF318, NF317/ pKM101 y NF318/ pKM101. Condiciones experimentales y abreviaturas: idem Fig. 4-5.

Símbolos:

○ *umuC*⁺ ● *umuC*⁺ / *mucAB*⁺
 △ *umuC* ▲ *umuC* / *mucAB*⁺

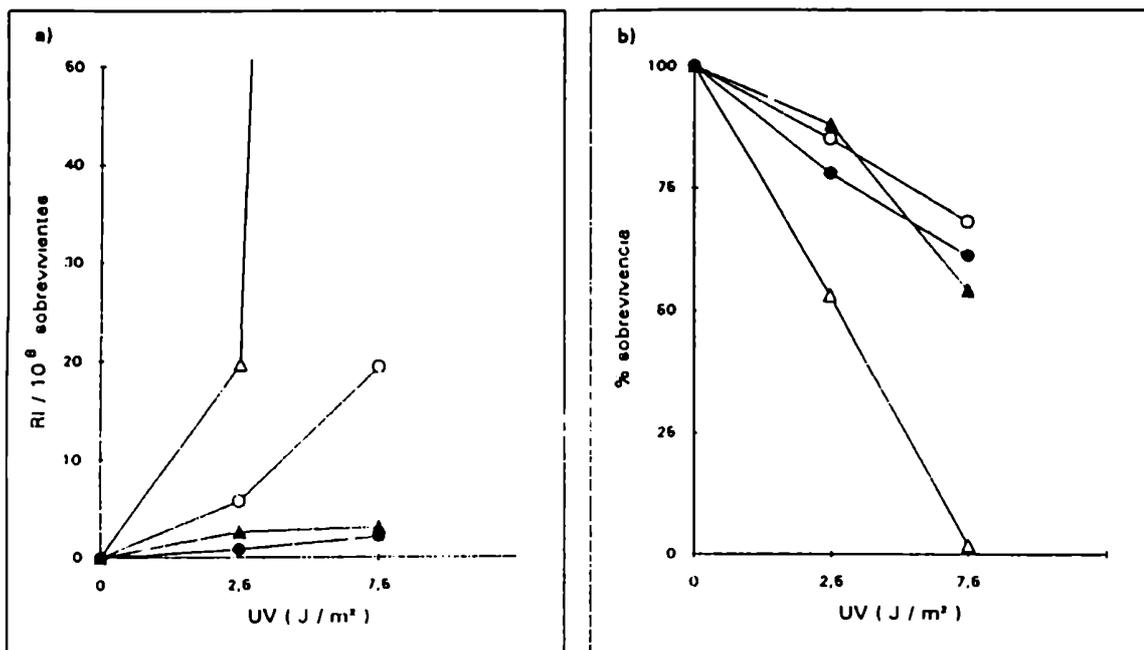


Figura 4-7. Efecto de la mutación *umuC* y del plásmido pKM101 en la escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta en la mutante *recA730*

a) Escisión precisa desde *leu63::Tn10* en NF325, NF326, NF325/pKM101 y NF326/pKM101.

b) Sobrevivencia a irradiación ultravioleta de NF325, NF326, NF325/pKM101 y NF326/pKM101.

Condiciones experimentales y abreviaturas: ídem Fig. 4-5.

Símbolos:

○ *recA730*

● *recA730 / mucAB*⁺

△ *recA730 umuC*⁻

▲ *recA730 umuC*⁻ / *mucAB*⁺

4.3. Estudios sobre la inducción de la escisión precisa de Tn10 en mutantes de recombinación de *Escherichia coli* K12

Con el objeto de dilucidar el rol de genes involucrados en la recombinación y reparación del ADN en la inducción de la escisión precisa de Tn10, se continuaron los estudios en *Escherichia coli* K12 cepa AB1157. En esta cepa se han aislado y caracterizado numerosas mutaciones en genes de recombinación y reparación del ADN (Lloyd y col., 1983; Lloyd y col., 1988; Lloyd y Buckman, 1991a; Shurvinton y col., 1984).

4.3.1. Escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

Se introdujeron inserciones de Tn10 en *gal*, *thr* o *leu* en derivadas de AB1157 *gal*⁺, *thr*⁺ o *leu*⁺ (Tabla 3-1b., cepas NF471, NF651 y NF661). Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 en estas cepas y se analizó como control la reversión puntual de *argE3* a *arg*⁺. Se observó un incremento de 10 a 40 veces en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 desde *gal*, *thr* o *leu* (Tablas 4-11, 4-12 y 4-13).

4.3.1.1. Efecto de la mutación *recN262*

El gen *recN* participa en la recombinación y su expresión está regulada por el sistema SOS de reparación. La mutación *recN* provoca una deficiencia parcial en la reparación postreplicativa de las roturas doble cadena del ADN (Picksley y col., 1984).

Se introdujeron inserciones de Tn10 en *gal*, *leu* o *thr* en cepas *recN262*

(Tabla 1b., cepas NF474, NF654, NF664). Se estudió la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta. Se observó una disminución del 70 al 90 % en la inducción con respecto a la cepa control *recN*⁺, al irradiar con dosis entre 2,5 a 10 J/m² (Tablas 4-11, 4-12 y 4-13 y Fig. 4-8).

Estos resultados indican que gran parte del incremento en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 inducido por irradiación ultravioleta depende de la expresión de un gen *recN* funcionalmente activo.

En la Lámina 2 se muestra una fotografía de un ensayo cualitativo de escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta en la cepa *recN262 gal76::Tn10*.

4.3.1.2. Efecto de las mutaciones *ruvA60* y *ruvB52*

Los genes *ruvA* y *ruvB* constituyen un operón regulado por el sistema SOS. Las cepas de *Escherichia coli* con mutaciones en el locus *ruv* son sensibles a varios agentes que dañan el ADN (irradiación ultravioleta, radiación ionizante, mutágenos químicos). Se demostró recientemente que los genes *ruv* están involucrados en la resolución de las estructuras de Holliday y que cumplen algún rol en la inducción de mutaciones puntuales por irradiación ultravioleta y por radiación X.

Se introdujo el transposón Tn10 inserto en *gal* o en *thr* en cepas *ruvB52* y *ruvA60* (Tabla 1b, cepas NF472, NF473, NF652 y NF653). Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta. Se observó una disminución del 89 % en la frecuencia de escisión espontánea con respecto a la cepa parental *gal::Tn10* (Tabla 4-11) y se observó sólo un ligero incremento en las frecuencias de escisión de Tn10 desde *gal* o *thr* luego de irradiación ultravioleta (Tablas 4-11 y 4-12).

Estos resultados sugieren un rol de los genes *ruv* en la escisión de Tn10 tanto espontánea como inducida por irradiación ultravioleta.

En la Lámina 2 se muestra una fotografía de un ensayo cualitativo de escisión

precisa de Tn 10 inducida por irradiación ultravioleta en la cepa *ruvA60 gal76::Tn 10*.

4.3.1.3. Efecto de la mutación *recG::Tn5*

El gen *recG* está involucrado en la reparación y la recombinación del ADN, sus funciones se superponen a las de las proteínas RuvAB en la recombinación mediada por el camino RecBCD pero no por el camino RecF. Se demostró recientemente que RecG, al igual que RuvAB, promueve *in vitro* la resolución de las estructuras de Holliday por migración del entrecruzamiento. Las mutantes *recG* inducen normalmente la respuesta SOS luego de daño al ADN y presentan el sistema SOS parcialmente desreprimido en ausencia de daño.

Se introdujo *gal::Tn10* o *thr::Tn10* en una cepa *recG::Tn5* (Tabla 3-1b., cepas NF475 y NF655). Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta. Se observó un aumento de dos veces en la frecuencia de escisión espontánea con respecto a la cepa parental *gal::Tn10* luego de incubaciones de más de 5 días a 37°C. La frecuencia de escisión inducida por irradiación ultravioleta fue similar a la de la cepa parental para las inserciones en *gal* o en *thr* (Tablas 4-11 y 4-12).

4.3.1.4. Efecto de la mutación *recF::Tn3*

RecF es una proteína involucrada en la reparación y la recombinación del ADN. Las mutaciones en el gen *recF* causan un retraso en la inducción de la respuesta SOS y deficiencias en la reparación recombinacional (Sassanfar y Roberts, 1991a).

Se introdujo la mutación *recF::Tn3* por transducción con fago P1 y selección de bacterias ampicilina resistentes a la cepa NF471 (AB1157 *gal::Tn10*) (Tabla 1b., cepa NF638). Estas transductantes mostraron mayor sensibilidad a irradiación ultravioleta y mitomicina C que la cepa parental *recF+*.

Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta. La frecuencia de escisión espontánea fue similar a la de la cepa parental. La frecuencia de escisión inducida fue mayor a la del control *recF*⁺ para dosis de 1 J/m², similar a la del control para dosis de 2,5 J/m² y menor que la del control para dosis iguales o superiores a 5 J/m² (Tabla 4-11 y Fig. 4-8).

Se introdujo la mutación *recF::Tn3* por transducción con fago P1 y selección de bacterias ampicilina resistentes a la cepa NF474 (*recN262 gat::Tn10*) (Tabla 1b., cepa NF639).

Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta en las dobles mutantes *recN recF*. La frecuencia de escisión espontánea fue similar a la de la cepa parental. La frecuencia de escisión inducida fue menor a la de la cepa *recN*⁺ *recF*⁻ para dosis de 1 J/m² y similar para dosis superiores a 2,5 J/m² (Tabla 4-11 y Fig. 4-8).

4.3.1.5. Efecto de las mutaciones *recB21C22 sbcB15*

La proteína RecBCD es una enzima multifuncional con actividad nucleasa (exonucleasa V) y ADN helicasa. Las mutantes *recB* o *recC* son deficientes en la recombinación conjugacional o transduccional, sensibles a irradiación ultravioleta y radiaciones ionizantes, y presentan viabilidad celular reducida. Las mutaciones en *sbcB* y *sbcC* suprimen este fenotipo. El gen *sbcB* codifica para la exonucleasa I que degrada ADN simple cadena en dirección 3' a 5', el gen *sbcC* codificaría para otra nucleasa. Las mutantes *recBC sbcB* presentan deficiencias en la inducción del sistema SOS luego de irradiación ultravioleta.

Se introdujo *gat::Tn10* a una cepa *recB21C22 sbcB15* (Tabla 1b., cepa NF634). Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta. La frecuencia de escisión espontánea fue similar a la de la cepa parental *recB*⁺ *recC*⁺ *sbcB*⁺. La frecuencia de escisión inducida presentó una

reducción del 40 al 90 % para dosis de irradiación ultravioleta entre 1 a 10 J/m²
(Tabla 4-11).

Tabla 4- 11 Escisión precisa desde *gal76::Tn10* inducida por irradiación ultravioleta
Efecto de mutaciones en *recN*, *recF*, *recBC*, *ruvA*, *ruvB* y *recG*.

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación puntual	
				<i>gal76::Tn10</i>		<i>argE3</i>	
				R/p	RI	R/p	RI
NF471	wt	0,0	100	18	–	8	–
		1,0	96	115	36	7	0
		2,5	94	328	118	20	5
		5,0	92	603	227	49	16
		10,0	90	800	310	149	56
NF474	<i>recN262</i>	0,0	100	18	–	11	–
		1,0	100	59	14	10	0
		2,5	91	82	24	26	6
		5,0	91	149	50	49	14
		10,0	87	184	63	151	55
NF638	<i>recF::Tn3</i>	0,0	100	19	–	25	
		1,0	88	415	167	37	5
		2,5	80	181	75	52	12
		5,0	68	87	37	70	27
		10,0	39	61	40	75	62
NF639	<i>recF::Tn3 recN262</i>	0,0	100	22		16	
		1,0	65	227	103	23	3
		2,5	54	113	54	32	12
		5,0	41	58	31	65	37
NF634	<i>recBC2122 sbcB15</i>	0,0	100	13		5	
		1,0	100	17	2	nd	
		2,5	100	33	10	nd	
		5,0	62	71	47	51	37
		10,0	47	153	149	88	88

Tabla 4-11 (continuación)

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa		mutación puntual	
				<i>gal76::Tn10</i>		<i>argE3</i>	
				R/p	RI	R/p	RI
NF472	<i>ruvB52</i>	0,0	100	4		3	
		2,5	79	8	3	nd	
		5,0	47	10	8	4	1
		10,0	12	7	16	6	15
NF473	<i>ruvA60</i>	0,0	100	2		2	
		1,0	nd	3		2	< 1
		2,5	13	3,6	7	3	4
		5,0	6	4,6	25	3	10
NF475	<i>recG258</i>	0,0	100	20	-	9	
		2,5	82	310	176	nd	
		5,0	64	437	325	nd	
		10,0	42	590	679	56	56

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 11 al 18 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idem Tabla 4-5; wt, cepa control *recN⁺ recF⁺ recBC⁺ sbcB⁺ ruvAB⁺ recG⁺*.

Tabla 4-12 Escisión precisa desde *thr34::Tn10* inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de mutaciones en *recN*, *ruvB* y *recG*,

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa <i>thr34::Tn10</i>	
				R/p	RI
NF651	wt	0	100	0,5	
		2,5	96	3,8	1,0
		5	98	7,3	1,9
		10	92	9,2	2,6
		20	81	10,0	3,2
NF654	<i>recN262</i>	0	100	0,2	
		2,5	91	1,0	0,2
		5	87	1,8	0,5
		10	84	1,9	0,5
		20	80	1,5	0,4
NF652	<i>ruvB52</i>	0	100	0,0	
		2,5	75	0,5	0,3
		5	47	0,0	< 0,1
		10	22	0,0	< 0,1
		20	8	0,0	< 0,1
NF655	<i>recG258</i>	0	100	2,3	
		2,5	82	5,5	1,3
		5	56	6,0	2,2
		10	42	7,0	3,7
		20	20	6,0	6,2

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 6 al 20 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idem Tabla 4-5; wt, cepa control *recN*⁺ *ruvAB*⁺ *recG*⁺.

Tabla 4-13 Escisión precisa desde *leu82::Tn10* inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de la mutación *recN*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa <i>leu82::Tn10</i>	
				R/p	RI
NF661	<i>recN</i> ⁺	0	100	1,3	
		2,5	100	6,0	2,4
		5	90	13,0	6,6
		10	85	14,0	7,6
		20	75	10,0	6,0
NF664	<i>recN262</i>	0	100	1,9	
		2,5	100	0,3	< 0,1
		5	90	0,7	< 0,1
		10	69	2,0	0,1
		20	30	2,0	0,1

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 10 al 16 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idem Tabla 4-5.

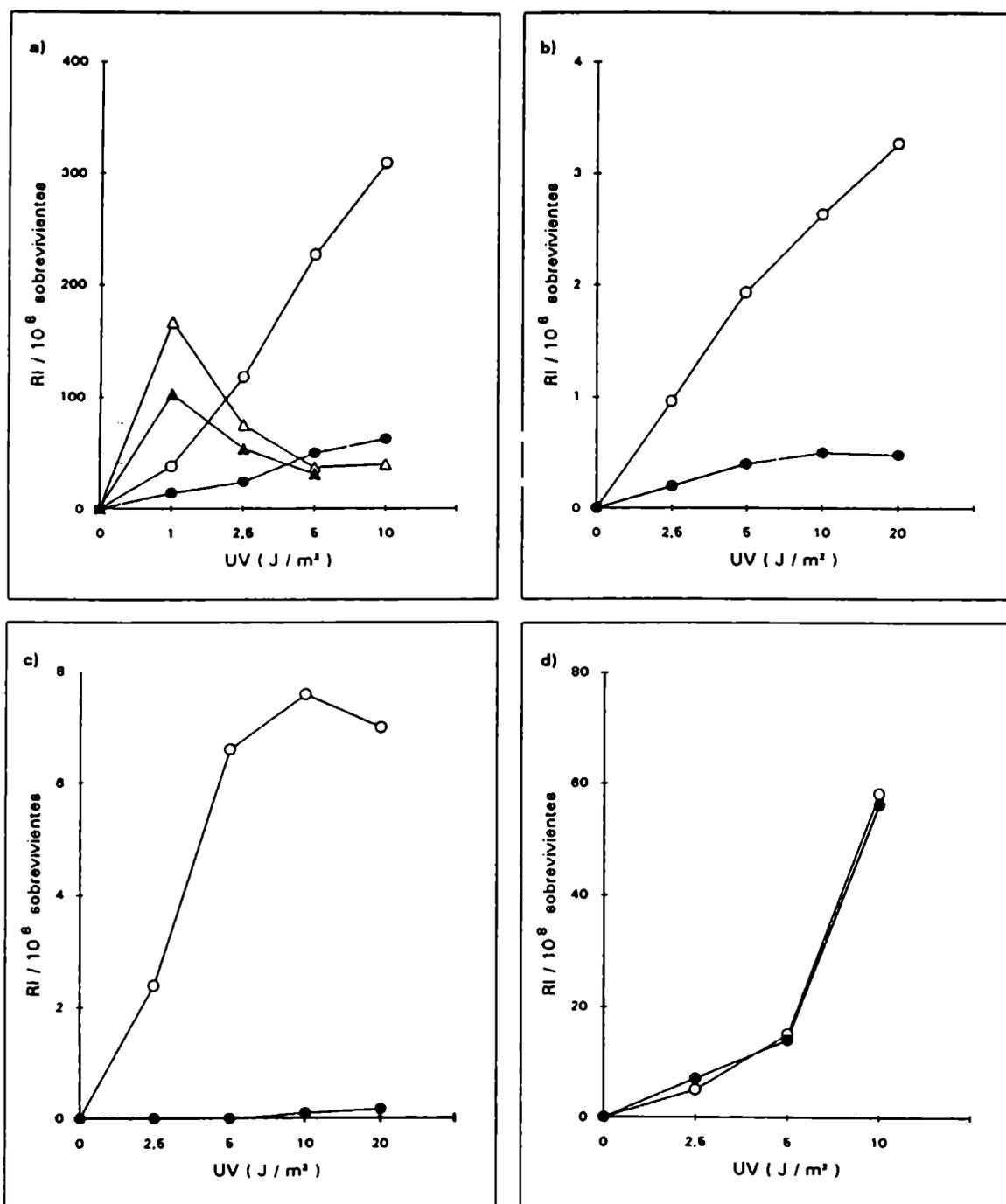


Figura 4-8 Efecto de la mutación *recN262* y de la mutación *recF::Tn3* en la escisión precisa de *Tn10* inducida por irradiación ultravioleta.

a) Escisión precisa desde *gal76::Tn10*. b) Escisión precisa desde *thr34::Tn10*. c) Escisión precisa desde *leu82::Tn10*. d) Mutación puntual *argE3* a *arg*⁺.

Condiciones experimentales y abreviaturas: idem Fig. 4-5.

Símbolos:

○ *recN*⁺ ● *recN*⁻
 △ *recF*⁻ ▲ *recF*⁻ *recN*⁻

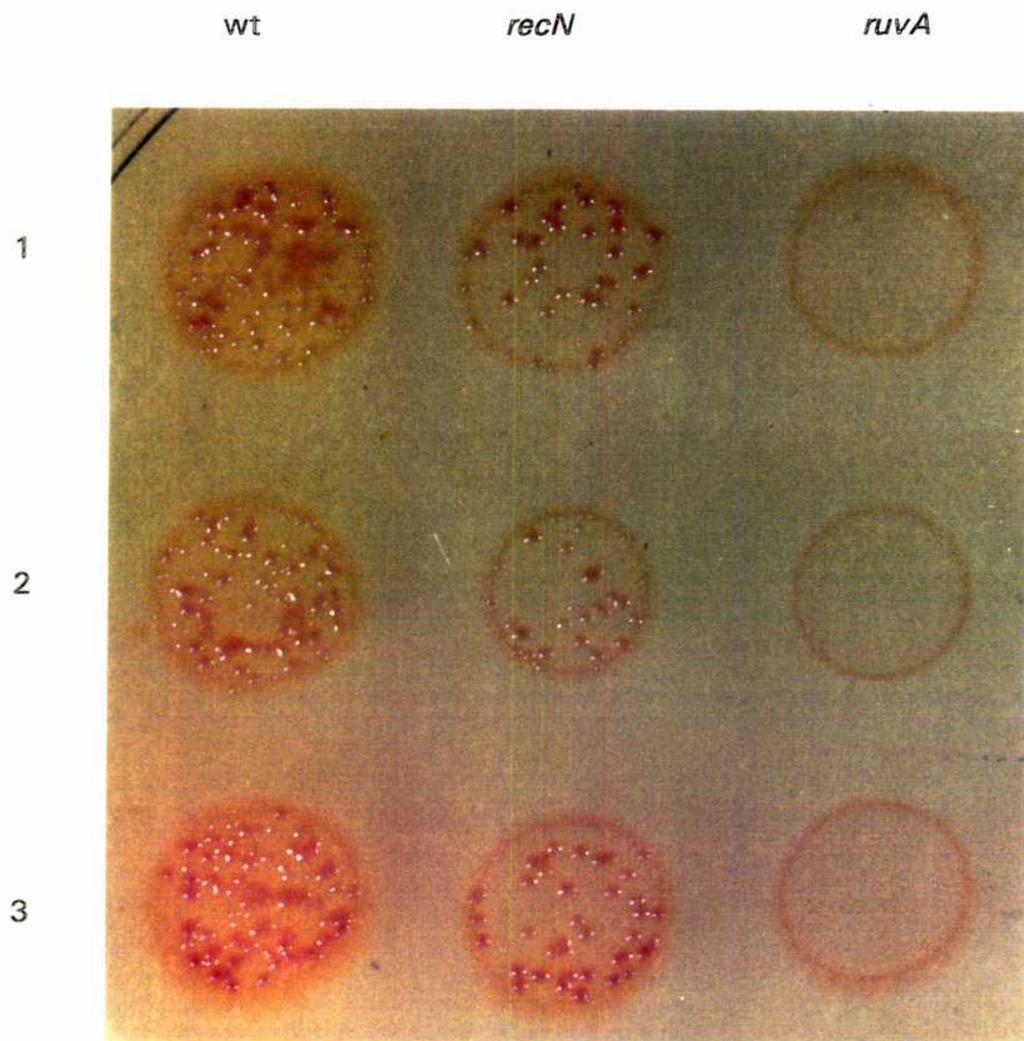


Lámina 2 Placa de MacConkey 1/2 galactosa con revertantes Gal⁺ en un ensayo cualitativo de escisión precisa desde *gal76::Tn10* en cepas de *Escherichia coli* K12 con mutaciones en genes de reparación del ADN expuestas a 5 J/m² de irradiación ultravioleta. Se sembraron alícuotas de 15 μ l de tres cultivos independientes de cada cepa (líneas 1, 2, 3).

wt: cepa salvaje *recN*⁺ *ruvA*⁺

4.4. Estudios sobre la inducción de la escisión precisa de mini-Tn 10 (Km) en *Escherichia coli* K12

4.4.1. Construcción de cepas portadoras de mini-Tn 10 (Km)

El mini-Tn 10 (Km) es un elemento genético de 1,8-Kb con extremos repetidos invertidos de 70-pb, correspondientes al extremo externo de IS-10 R, que no codifica para la enzima transposasa. Este derivado del transposón Tn 10 lleva un fragmento de 1675-pb del transposón Tn903 que consiste en secuencias repetidas invertidas de 360-pb correspondientes al extremo interno de IS-903 y en un gen que codifica para resistencia a kanamicina (Fig. 1-8).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos sobre el comportamiento de la escisión del transposón Tn 10 luego de irradiación ultravioleta o tratamiento con mitomicina C, con el de un elemento genético similar pero de menor tamaño, se construyeron derivadas de la cepa C115 portadoras de mini-Tn 10 (Km) (ver Transposición en Materiales y Métodos). Se obtuvieron tres inserciones de origen independiente de mini-Tn 10 (Km) en *gal* (*gal1*, *gal3*, *gal5*) (Tabla 3-1b., cepas NF598a, NF598b y NF598c).

4.4.2. Escisión precisa de mini-Tn 10 (Km) inducida por mitomicina C

Se analizaron las frecuencias de escisión espontánea y luego de tratamiento con mitomicina C de las tres derivadas de C115 con inserciones de mini-Tn 10 (Km) en *gal* y de una derivada de C115 con una inserción de Tn 10 en *gal*. Las placas sembradas con 10^6 - 10^7 células fueron difíciles de analizar debido a la alta frecuencia

de escisión de mini-Tn10 (Km) y de Tn10 observada en esta cepa; se optó entonces por analizar colonias aisladas. Se sembraron aproximadamente 250 colonias aisladas en placas de MacConkey galactosa y MacConkey galactosa con 50 ng/ml de mitomicina C, luego de 48 hs. de incubación a 37°C, se determinó el número de clones portadores de al menos una revertante Gal⁺. Se calculó la frecuencia de escisión precisa como la cantidad de colonias con al menos una revertante Gal⁺ con respecto a la cantidad de colonias totales. El tratamiento con 50 ng/ml de mitomicina C no afectó la sobrevivencia.

Se observó un efecto inductor de la mitomicina C sobre la frecuencia de escisión precisa de todas las inserciones, la magnitud del incremento varió dependiendo de la inserción (Fig. 4-9). La inserción *gal1* fue la que presentó la menor frecuencia de escisión espontánea y el mayor factor de incremento por tratamiento con mitomicina C por lo cual se la utilizó para experimentos posteriores.

4.4.2.1. Efecto de la mutación *lexA3* (Ind)

Se construyeron cepas C115 *lexA3* (ind⁻) portadoras de *gal1::mini-Tn10* (Km) (Tabla 3-1b., cepa NF599). La frecuencia de escisión espontánea fue similar a la de la cepa *lexA*⁺ y no se observó inducción de la escisión luego de tratamiento con mitomicina C (Fig. 4-10).

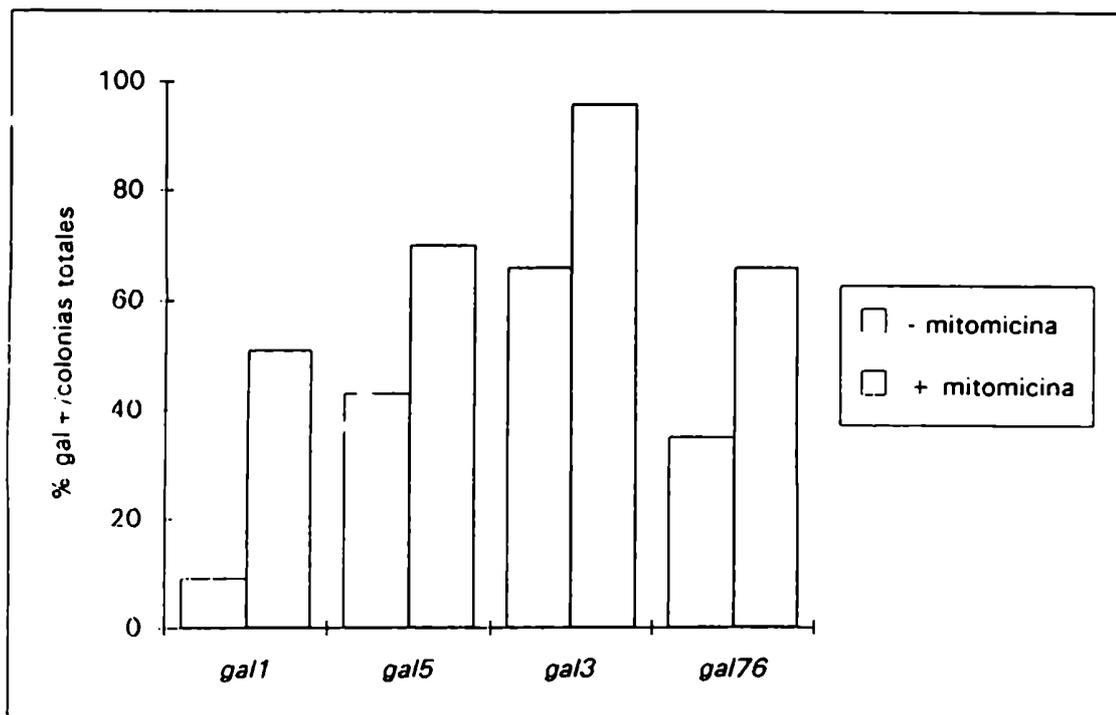


Figura 4-9 Efecto de la mitomicina C sobre la escisión precisa de *mini-Tn10*. Cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche en estufa a 37°C fueron diluidos y sembrados en placas de MacConkey galactosa o MacConkey galactosa conteniendo 50 ng/ml de mitomicina C. Se obtuvieron 200-250 colonias aisladas por placa, la mitomicina C no afectó la supervivencia. Se calculó el % Gal+ /colonias totales contando la cantidad de colonias con al menos 1 papila Gal+ con respecto a la cantidad de colonias totales. *gal1*, *gal2* y *gal3* son 3 inserciones de origen independiente de *mini-Tn10* en C115; *gal76* es una inserción de *Tn10* en C115.

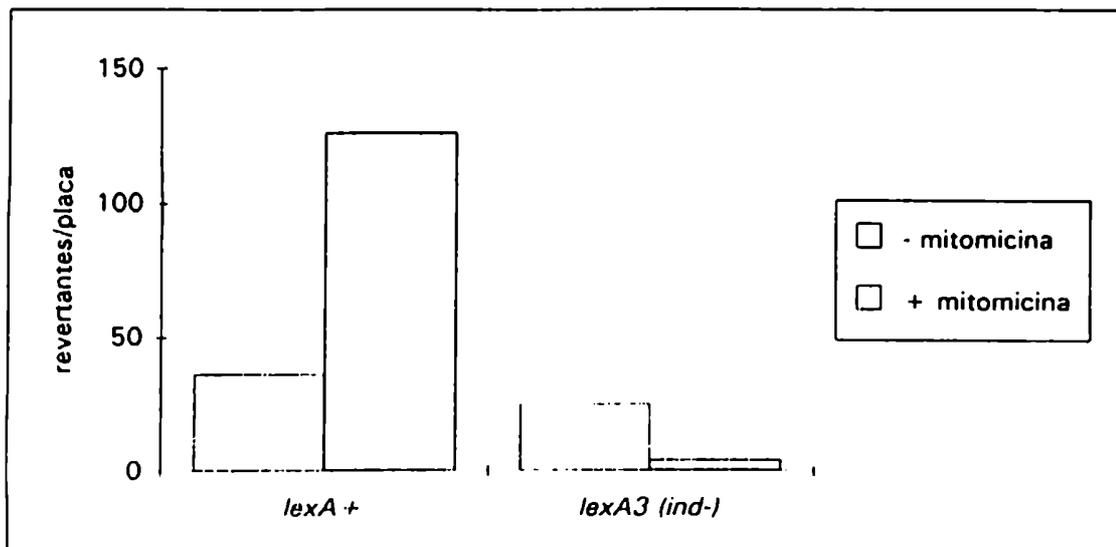


Figura 4-10 Efecto de la mutación *lexA3 (ind-)* sobre la escisión precisa de mini-Tn10 inducida por mitomicina C. Cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche se sembraron en placas de MacConkey galactosa o Mac Conkey galactosa conteniendo 50 ng/ml de mitomicina C. Luego de 3 días de incubación a 37°C se contaron la cantidad de revertantes por placa.

4.4.3. Escisión precisa de mini-Tn10 (Km) inducida por irradiación ultravioleta

Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta en la frecuencia de escisión precisa de mini-Tn10 (Km). Se observó un incremento de hasta 10 veces en la frecuencia de escisión precisa de mini-Tn10(Km) desde *gal1* (Tabla 4-14).

4.4.3.1. Destino del minitransposón

Se aislaron 90 revertantes *gal*⁺ inducidas por irradiación ultravioleta de la cepa NF598a [*gal1::mini-Tn10(Km)*]. Todas resultaron ser sensibles a kanamicina. Esto confirma que la escisión de mini-Tn10(Km) inducida por irradiación ultravioleta lleva a la pérdida del minitransposón.

4.4.3.2. Efecto de la mutación *lexA3* (ind⁻)

Se estudió el efecto de la mutación *lexA3* (ind⁻) sobre la frecuencia de escisión precisa de mini-Tn10(Km) inducida por irradiación ultravioleta.

La frecuencia de escisión espontánea fue similar a las de la cepa *lexA*⁺ y no se observó inducción de la escisión por irradiación ultravioleta (Tabla 4-14).

Estos resultados indican que la delección genética que involucra al mini-Tn10, al igual que la escisión precisa de Tn10, es inducible por agentes que dañan al ADN y que esta inducción depende de la expresión del sistema SOS.

Tabla 4-14 Escisión precisa de mini-Tn10 inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de la mutación *lexA3(ind⁻)*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa <i>gal1::mini-Tn10</i>	
				R/p ± DS	RI
NF598a	<i>lexA⁺</i>	0	100	73 ± 11	
		2,5	100	142 ± 12	45
		5	100	232 ± 21	59
NF599	<i>lexA3(ind⁻)</i>	0	100	66 ± 8	
		2,5	33	34 ± 4	< 1
		5	10	19 ± 3	< 1

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. Abreviaturas: idemTabla 4-5.

4.4.3.3. Efecto de la mutación *recN262*

Se introdujo la inserción *gal1::mini-Tn10* en una mutante *recN262* (Tabla1b., cepa NF637). Se estudió la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta. Se observó una disminución del 50 al 80 % en la inducción con respecto a la cepa control *recN⁺*, al irradiar con dosis entre 2,5 a 10 J/m² (Tabla 4-15).

Estos resultados indican que la inducción de la escisión precisa de mini-Tn10 por irradiación ultravioleta depende, en gran parte, de la expresión de una proteína RecN funcionalmente activa.

4.4.3.4. Efecto de la mutación *ruvB52*

Se introdujo la inserción *gal1::mini-Tn10* en una mutante *ruvB52* (Tabla 3-1 b., cepa NF636). Se estudió la frecuencia de escisión espontánea e inducida por irradiación ultravioleta. Se observó una disminución del 70 % en la frecuencia de escisión espontánea con respecto a la cepa parental (Tabla 4-15) y se observó sólo un ligero incremento en las frecuencias de escisión del mini-Tn10 luego de irradiación ultravioleta (Tabla 4-15).

Estos resultados indican que los genes *ruv* juegan un rol en la escisión, tanto espontánea como inducida, de este minitransposón.

Tabla 4-15 Escisión precisa de mini-Tn 10 inducida por irradiación ultravioleta

Efecto de mutaciones en *recN* y *ruvB*

cepa	genotipo relevante	UV J/m ²	S %	escisión precisa <i>gal1::mini-Tn 10</i>		mutación puntual <i>argE3</i>	
				R/p	RI	R/p	RI
NF635	wt	0,0	100	45		8	-
		2,5	92	155	43	21	5
		5,0	94	287	107	50	17
		10,0	96	438	171	129	45
		20	81	379	172	nd	
NF637	<i>recN262</i>	0,0	100	39		11	-
		2,5	84	93	21	23	5
		5,0	91	148	40	46	13
		10,0	87	178	53	161	58
		20	87	128	34	nd	
NF636	<i>ruvB52</i>	0,0	100	14		nd	
		2,5	79	13	0		
		5,0	47	16	2		
		10,0	12	15	3		

Las bacterias fueron irradiadas en medio sólido, según se describe en Materiales y Métodos. La desviación estándar osciló entre el 8 al 18 % del promedio de revertantes/placa. Abreviaturas: idem Tabla 4-5; wt, cepa control *recN*⁺ *ruvAB*⁺.

5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La escisión precisa del transposón Tn10 se tomó como sistema modelo para el estudio de la generación de deleciones que ocurren entre secuencias cortas de ADN duplicadas (repeticiones directas) que limitan a secuencias palindrómicas (repeticiones inversas). Este tipo de estructura genera frecuentemente deleciones en bacterias (Farabough y col., 1978, Albertini y col., 1982, Glickman y Ripley, 1984) y en organismos superiores (Efstratiadis y col., 1980, Nalbantoglu y col., 1986).

El transposón Tn10 duplica 9-pb del sitio donde se inserta; su escisión precisa elimina todas las secuencias pertenecientes al transposón y una de las repeticiones de 9-pb. La frecuencia de escisión precisa de Tn10 varía drásticamente con el sitio de inserción entre 10^{-6} a 10^{-8} por elemento por generación (Foster y col., 1981).

En este trabajo se observó que la frecuencia de escisión precisa de Tn10, desde distintos sitios del genoma de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli*, incrementa hasta 50 veces por la acción de dos agentes que dañan al material genético, tales como la mitomicina C y la irradiación ultravioleta. La magnitud de este incremento varía dependiendo del sitio de inserción, la cantidad de daño del ADN y las condiciones experimentales utilizadas. La variabilidad entre distintos sitios de inserción podría deberse a diferencias en la estructura primaria y/o secundaria del ADN circundante. Hafner y MacPhee (1989) y Andreeva y col., (1990) también observaron el efecto inductor de la irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa de Tn10 en *Salmonella typhimurium*, Brunner y col., (1986) observaron el mismo fenómeno en *Escherichia coli*.

La escisión precisa de Tn10 inducida por daño al material genético no estuvo asociada a transposición a otros sitios del genoma ya que el 94-100 % de las revertantes analizadas resultaron ser sensibles al marcador de resistencia al antibiótico portado por el transposón.

Los experimentos realizados con *Salmonella typhimurium* mostraron que:

- a) La mutación *recA* anula el efecto inductor de la irradiación ultravioleta y del tratamiento con mitomicina C sobre la frecuencia de escisión precisa de Tn10 (Tablas 4-4 y 4-5). La mutación *recA* también anula el efecto inductor de la mutación *uvrD* (deficiencia en helicasa II) (Tabla 4-1).
- b) La mutación *uvrB* incrementa el efecto inductor de dosis bajas de irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa de Tn10 (Fig. 4-2).
- c) A diferencia de lo que ocurre con la mutación puntual, el plásmido pKM101 reduce o no modifica significativamente, dependiendo del sitio de inserción, el efecto inductor de la irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa de Tn10 (Fig. 4-3).
- d) La mutación *topA*, que anula la inducción de la mutación puntual por irradiación ultravioleta, no afecta la inducción de la escisión precisa de Tn10 (Tabla 4-6). El plásmido pKM101, que restaura la inducibilidad de la mutación puntual en estas cepas, disminuye el efecto inductor de la irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa desde *metE862::Tn10* (Fig. 4-4).

Estos resultados indicaron que si bien, al igual que la inducción de la mutación puntual, la inducción de la escisión precisa de Tn10 es *recA* dependiente, no se comporta como aquella con referencia a la presencia del plásmido pKM101 (*mucAB*⁺) o frente a la mutación *topA*. Resultó por ende importante poder dilucidar si RecA estaba involucrada en el proceso en estudio, en forma directa o en forma indirecta a través de su rol regulatorio en la inducción del sistema SOS. Debido a la mayor disponibilidad de mutantes en genes del sistema SOS de reparación de *Escherichia coli*, se prosiguieron los estudios en esta especie.

Los experimentos realizados con la mutante *recA1*, confirmaron el requerimiento de un gen *recA* funcionalmente activo para que se incremente la frecuencia de escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta (Tabla 4-7).

RecA es una proteína que cumple diversas funciones tales como la iniciación de la recombinación homóloga, la regulación del sistema SOS y el procesamiento mutagénico SOS. Se estudió la posible asociación entre la inducción de la escisión precisa de Tn10 y la inducción del sistema SOS de reparación. Los experimentos realizados con la mutante *lexA3* (*ind*-), defectiva para la inducción del sistema SOS, mostraron que en esta cepa no se induce la escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta (Tabla 4-8). Ello llevó a concluir que el proceso en análisis depende de la expresión de al menos un gen del sistema SOS. Los experimentos realizados con el plásmido pRecA102 (*ptac-recA*⁺) en la mutante *lexA3* (*ind*-) indicaron que cantidades aumentadas de proteína RecA no son suficientes para que se produzca la inducción de la escisión precisa de Tn10 en condiciones de represión de los demás genes SOS (Tabla 4-9).

La respuesta SOS puede ser activada por mutaciones en los genes regulatorios *recA* y *lexA*. El alelo mutante *recA730* provoca la expresión constitutiva de la respuesta SOS debido a que la proteína RecA existe en la forma activada (RecA*) en ausencia de daño al ADN (Witkin y col., 1982; Kirchner y col., 1992). Las mutantes *recA730* expresan una actividad mutadora espontánea que incrementa la frecuencia de mutación puntual. La mutación *recA730* no modificó significativamente la frecuencia espontánea de escisión precisa de Tn10 en las condiciones de ensayo utilizadas (cepas *recA*⁺ *alaS*⁺ vs. *recA730* *alaS*⁺, ver 4.2.1 Escisión precisa de Tn10 en mutantes SOS constitutivas). Estos resultados indicarían que la actividad mutadora espontánea no afecta a la escisión precisa de Tn10 y que la inducción de la respuesta SOS por la mutación *recA730*, en ausencia de daño al material genético, no es suficiente para inducir este tipo de delección. Sin embargo no se puede excluir la posibilidad de que el análisis por métodos más sensibles que el aquí utilizado, como por ejemplo ensayos de fluctuación en medio líquido o sólido, muestren diferencias significativas entre las cepas *recA*⁺ y las *recA730*.

Estos resultados obtenidos con la mutante *recA730* coinciden con los de Balbinder (1993) quien no encontró diferencias significativas en la frecuencia de generación de deleciones en plásmidos en cepas *recA⁺* o *recA730* y con los de Miller y Low (1984) quienes observaron que la inducción de la respuesta SOS por la mutación *recA441* a 42°C no incrementaba la frecuencia de generación de deleciones en el gen *lacI* de *Escherichia coli*.

En la cepa *recA730*, la escisión precisa de Tn10 es estimulada hasta 10 veces por irradiación ultravioleta (Tabla 4-8 y Fig. 4-7). Esto indica que la irradiación ultravioleta está suministrando algún evento importante además de la inducción del sistema SOS que es requerido para la inducción de la escisión.

Kuan y colaboradores (1991) reportaron un incremento importante en la frecuencia de escisión del transposón Tn5 acompañada de transposición en cepas con alelos *recA* proteasa constitutiva (RecA*). Estos autores no encontraron aumentos significativos en la escisión o transposición de Tn5 luego de irradiación ultravioleta o tratamiento con mitomicina C.

Existen diferencias funcionales entre los transposones Tn5 y Tn10 que explicarían la disparidad de los resultados obtenidos. La expresión del gen de la transposasa de Tn5 (*tnp*), está regulada por la proteína LexA (Kuan y col 1991). La proteína RecA proteasa-constitutiva incrementa la escisión y la transposición de Tn5, estos dos eventos ocurren en forma conjunta sin destrucción de la molécula de ADN dadora (Kuan y col., 1991). La escisión precisa de Tn10 inducida por daño al material genético no está asociada a su transposición a otros sitios del genoma. Los resultados obtenidos con un derivado de Tn10 que no codifica para transposasa (mini-Tn10, ver más adelante), confirman la independencia entre los fenómenos de transposición y escisión inducida en el sistema estudiado.

Un componente muy importante de la respuesta SOS es la inducción de mutaciones puntuales mediada por las proteínas RecA activada (RecA*), UmuD

activada (UmuD*) y UmuC. La mutagénesis SOS, también llamada procesamiento SOS, es consecuencia de la replicación translesión mediada por un complejo nucleoproteico denominado "mutasoma". El mismo se localizaría próximo a la lesión y estaría formado por RecA, UmuC-UmuD' y la polimerasa III (Woodgate y Sedgwick, 1992).

Los experimentos realizados con mutantes *umuC* nulas mostraron que la inducción de la escisión precisa de Tn10 es independiente del gen *umuC* y que por lo tanto no es consecuencia del procesamiento mutagénico SOS (Tabla 4-10, Fig. 4-6 y Fig. 4-7). Se observó asimismo que la presencia del plásmido pKM101 reduce el efecto inductor de la irradiación ultravioleta. Estos resultados concuerdan con los observados por Andreeva y col., (1990) en híbridos *umuC*⁺ de *Escherichia coli-Salmonella typhimurium*. Para explicar el efecto del plásmido pKM101, se podría especular que la misma función de las proteínas MucAB responsable del aumento de la supervivencia y de la mutabilidad luego de la irradiación ultravioleta, modula negativamente la inducción de la escisión. Una más eficiente replicación translesión mediada por MucAB disminuiría la formación y/o estabilidad de posibles estructuras intermediarias involucradas en la escisión precisa de Tn10.

Numerosas evidencias experimentales indican que la función de la proteína RecA involucrada en el procesamiento SOS (mutasoma) es distinta de la función de proteasa de LexA y UmuD y distinta de la función recombinasa (Dutreix y col., 1989; Sweasy y col., 1990). Existen varios alelos de la proteína RecA, obtenidos mediante mutagénesis química e ingeniería genética, deficientes en algunas de estas funciones. Las cepas que codifican para el alelo *recA727* estimulan normalmente el clivaje de LexA, son no mutables por irradiación ultravioleta y presentan capacidad recombinatoria normal (Sweasy y col., 1990). La introducción del alelo *recA727* no modificó la inducción de la escisión precisa de Tn10 por irradiación ultravioleta

(Fig.4-5). Esto indica que la función de *recA* involucrada en la inducción de mutaciones puntuales no está involucrada en la inducción de la escisión de Tn10.

Con el objeto de identificar el o los genes SOS involucrados en la inducción de la escisión precisa de Tn10, se estudió el efecto de mutaciones en genes de este sistema que afectan la recombinación y reparación del ADN (*recN*, *ruvA* y *ruvB*).

La mutación *recN262* redujo el efecto inductor de la irradiación ultravioleta sobre la escisión precisa de Tn10 desde distintos sitios del genoma (Tablas 4-11, 4-12, 4-13 y Fig. 4-8). Si bien la magnitud de esta reducción varió dependiendo del sitio de inserción, la dosis de irradiación ultravioleta y las condiciones experimentales utilizadas, en todos los casos las frecuencias fueron 60-90 % menores que las de los controles *recN*⁺. Estos resultados indican que gran parte del incremento de la escisión precisa de Tn10 inducida por irradiación ultravioleta depende del producto del gen *recN*. La mutación *recN262* no inhibió en forma absoluta la inducción de la escisión; esto podría deberse a que la mutación *recN* no es nula y conserva parte de las funciones de la proteína salvaje, a que hay otras proteínas cuyas funciones se superponen en forma parcial a las de RecN (Lloyd y Buckman, 1991b), o bien a que la inducción en las frecuencias de escisión sea el producto de la sumatoria de varios mecanismos independientes.

La mutación *recN262* provoca una deficiencia parcial en la reparación postreplicativa de roturas de cadena doble del ADN (Picksley y col., 1984) y no afecta o afecta muy poco la sensibilidad a la irradiación ultravioleta en *Escherichia coli* (Lloyd y col., 1983). Los resultados obtenidos por Bonura y Smith (1975) demostraron que la reparación enzimática de ADN dañado por irradiación ultravioleta induce la generación de roturas de cadena doble. Estos autores midieron la velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa de ADN irradiado con luz ultravioleta y reportaron que en cepas de *Escherichia coli* K12 irradiadas con 100 J/m² se generan entre 20-30 roturas de doble cadena por genoma. Suponiendo que la estructura primaria o secundaria del

transposón aumente la probabilidad de que se generen roturas de cadena doble, se podría especular que la reparación de dichas roturas provoque la inducción de la escisión precisa de Tn10. La estructura de horquilla generada por la interacción intracadena de los extremos repetidos invertidos del transposón podría provocar desalineamientos durante la reparación facilitando la escisión.

Sargentini y Smith (1992) propusieron un modelo derivado de los modelos de reparación de roturas de doble cadena del ADN y de los modelos de recombinación, para explicar la inducción de deleciones por irradiación gamma; según este modelo las deleciones se producirían por el desalineamiento de cadenas, estimulado por secuencias repetidas invertidas y directas, durante el proceso de recombinación. Un modelo similar sería apropiado para explicar gran parte de la inducción de la escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta. Se puede especular que RecN participa en un proceso de reparación recombinacional que provoca el aumento en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 y que por ello la mutante *recN262* presenta menor inducción de la escisión. No se puede excluir algún otro rol de *recN* en la inducción de la escisión precisa de Tn10.

Las mutaciones *ruvA60* y *ruvB52* disminuyeron la frecuencia, espontánea e inducida por irradiación ultravioleta, de la escisión precisa de Tn10 (Tablas 4-11 y 4-12).

El locus *ruv* codifica para tres genes designados *ruvA*, *ruvB* y *ruvC*; las mutaciones en cualquiera de estos tres genes provocan un fenotipo similar lo cual sugiere que actúan en forma concertada. Los genes *ruvA* y *ruvB* forman parte de un operón cuya expresión está regulada por el sistema SOS (Shurvinton y col., 1984). Las proteínas RuvA y RuvB cumplen un rol en la reparación recombinacional o postreplicativa del ADN dañado e intervienen en la recombinación genética. Estudios recientes realizados *in vitro*, demostraron que las proteínas RuvA y RuvB actúan en las últimas etapas de la recombinación catalizando la migración de las estructuras de

Holliday que resultan del intercambio de cadenas mediado por RecA. El gen *ruvC* forma parte de un operón adyacente al *ruvAB* y su expresión no está regulada por el sistema SOS. La proteína RuvC es una endonucleasa que resuelve *in vitro* las estructuras de Holliday por clivaje simétrico de las cadenas de ADN en el punto de entrecruzamiento (West y Connolly, 1992; West, 1992;). Es interesante mencionar que se realizaron estudios *in vitro* que demostraron que RuvA y RuvB participan en la renaturalización de estructuras cruciformes en ADN plasmídico superenrollado y que RuvC cliva específicamente este tipo de estructuras (Shiba y col., 1991; Taylor, 1992).

Las proteínas Ruv podrían estar involucradas en el proceso de resolución de presuntos intermediarios que se generan durante la escisión precisa, tanto espontánea como inducida, de este transposón.

La disminución en la inducción de la escisión precisa de Tn10 por irradiación ultravioleta observado en las mutantes *ruvA60* y *ruvB52*, podría deberse a la intervención de las proteínas Ruv en la reparación recombinacional del ADN. No se pueden excluir otras explicaciones. Si bien el sistema SOS de reparación se induce normalmente en las mutantes *ruv* (Sargentini y Smith, 1989), la deficiencia generalizada en la inducción de mutaciones puntuales (Sargentini y Smith, 1989; y este trabajo) y de escisión de Tn10 de las cepas con mutaciones en los genes *ruvA* y *ruvB*, podría indicar que las mismas están afectando algún otro proceso común a ambos fenómenos.

La mutación *recG::Tn5* disminuyó la sobrevivencia a irradiación ultravioleta con respecto a la cepa parental, pero no afectó la inducción de la escisión precisa de Tn10, ni la inducción de la mutación puntual (Tablas 4-11 y 4-12).

La proteína RecG cumple funciones de recombinación y de reparación de daños del ADN (Lloyd y Buckman., 1991a). Estudios *in vivo* demostraron una superposición funcional, en la recombinación homóloga (dependiente de *recBCD*), entre la proteína RecG y los productos de los tres genes *ruv*. Estudios *in vitro* demostraron que RecG,

al igual que RuvAB, promueve la migración del entrecruzamiento de las estructuras de Holliday (Lloyd y Sharples, 1993; Mandal y col, 1993). Las proteínas RecG y RuvAB codifican funciones superponibles pero no completamente intercambiables. RecG puede sustituir a RuvAB en la recombinación conjugativa pero no en la plasmídica (Taylor, 1992). La expresión de RuvAB está regulada por el sistema SOS, por lo que se postula que estas proteínas cumplirían un rol más importante durante la reparación recombinacional que la proteína RecG (Lloyd y Sharples, 1993; Mandal y col, 1993)

Los resultados obtenidos con las mutantes *recG* indicarían que la proteína RecG no está involucrada en la inducción de la escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta, aunque no puede descartarse la posibilidad de que las proteínas RuvAB enmascaren parcialmente su función.

La escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C disminuyó en las mutantes *recN262*, *ruvA60*, *ruvB52* y *recG::Tn5* (resultados del laboratorio). Esto indica que RecG tendría alguna participación en la escisión precisa de Tn10 inducida por mitomicina C.

Wang y Smith realizaron estudios sobre la reparación postreplicativa de ADN dañado por irradiación ultravioleta que indicaron que los procesos dependientes de RecF utilizarían una región de ADN de cadena simple para promover la recombinación; éstos dependerían además de los productos de los genes *recA* y *recJ*. En cambio, los procesos dependientes de RecBC utilizarían ADN de cadena doble con extremos romos o casi romos y dependerían además de los productos de los genes *recA* y *recN* (Wang y Smith, 1983; Wang y Smith, 1988). Con el objeto de dilucidar cual de estos dos procesos contribuye a la inducción de la escisión precisa de Tn10 luego de irradiación ultravioleta, se analizó la frecuencia de escisión en mutantes *recF* y *recBC*.

En la mutante *recF::Tn3* la frecuencia de escisión inducida fue 4 veces mayor a la de la cepa parental *recF⁺* para dosis hasta 1 J/m², similar para dosis de 2,5 J/m² y menor para dosis iguales o superiores a 5 J/m² (Tabla 4-11 y Fig. 4-8).

La mutación *recN262* disminuyó la inducción de la escisión precisa de Tn 10 de las mutantes *recF*. Sin embargo, la frecuencia de escisión de la doble mutante *recF recN* fue mayor que la de la cepa *recF*⁺ al ser irradiada con dosis de 1 J/m² (Tabla 4-11 y Fig. 4-8).

La proteína RecF cumple funciones en las primeras etapas de inducción de la respuesta SOS y en la reparación recombinacional (Sassanfar y Roberts, 1991a; Wang y Smith, 1988). La proteína RecF podría estar involucrada en la generación de ADN monocatenario necesario para que RecA se active y promueva el clivaje de LexA o en la estimulación de una óptima unión de RecA al ADN monocatenario. Es posible que la proteína RecF cumpla un rol similar, facilitando la unión de la proteína RecA, en las reacciones de reparación recombinacional de discontinuidades del ADN opuestas a lesiones no codificantes (Wang y Smith, 1988).

Los resultados obtenidos con la mutante *recF* sugieren que en condiciones de baja irradiación, RecF inhibe alguna función o la formación de una estructura inductora de la escisión, o bien que, en su ausencia, se activan una o más proteínas o se favorece la formación de estructuras, con marcado efecto inductor sobre dicha escisión. Los resultados obtenidos con la doble mutante *recF recN* indican que sólo parte de este aumento es debido a alguna función de *recN*. La disminución en la frecuencia de escisión con dosis de irradiación mayores a 2,5 J/m², sugeriría que en estas condiciones RecF cumple alguna función vinculada a la inducción de la escisión precisa de Tn 10. No pueden descartarse otras hipótesis.

Las mutaciones *recBC sbcB* disminuyeron la inducción de la escisión precisa de Tn 10 luego de irradiación ultravioleta (Tabla 4-11).

La proteína RecBCD es una enzima multifuncional con actividad nucleasa (exonucleasa V) y ADN helicasa. Las mutantes *recB* o *recC* son deficientes en la recombinación conjugacional o transduccional, sensibles a irradiación ultravioleta y presentan viabilidad celular reducida. Las mutaciones *sbcB* y *sbcC* suprimen este

fenotipo. El gen *sbcB* codifica para la exonucleasa I que degrada ADN simple cadena en dirección 3' a 5', el gen *sbcC* codificaría para otra nucleasa. Las mutantes *recBC sbcB* presentan deficiencias en la inducción del sistema SOS luego de irradiación ultravioleta (Simic y col., 1991).

La disminución en la inducción de la escisión precisa de *Tn10* observada en las mutantes *recBC sbcB* podría deberse a la deficiencia en la inducción del sistema SOS de reparación característico de las mutantes *recBC*, a un rol directo de *recB* en el proceso en estudio, o a la modificación de las nucleasas codificadas por *sbcB sbcC*. La hipótesis de un rol directo de *recB* sería compatible con la intervención de *recN* en la inducción de la escisión teniendo en cuenta los estudios realizados por Wang y Smith (1988) que indican que los procesos de reparación recombinacional dependientes de *recBC* también involucran a *recN*.

El mini-*Tn10* (Km) es un elemento genético de 1.8-Kb con extremos repetidos invertidos de 70-pb derivado del transposón *Tn10*. El mini-*Tn10* (Km) puede insertarse en distintos sitios del genoma duplicando una secuencia target de 9 pb, utilizando transposasa provista en cis en vectores especialmente diseñados (Kleckner, 1991).

La escisión de mini-*Tn10*, al igual que la de *Tn10*, incrementó por irradiación ultravioleta o por tratamiento con mitomicina C y se demostró que esta inducción depende de la expresión de al menos un gen del sistema SOS de reparación (Fig. 4-9, Fig. 4-10 y Tabla 4-14)

La mutación *recN862* disminuyó en un 50-80 % la frecuencia de escisión de mini-*Tn10* inducida por irradiación ultravioleta (Tabla 4-15).

La mutación *ruvB52* disminuyó la frecuencia espontánea e inducida de escisión de mini-*Tn10* en forma similar a la que afectó a la escisión precisa de *Tn10* (Tabla 4-15).

Estos resultados demuestran que los mecanismos involucrados en la inducción por irradiación ultravioleta de una deleción de 9.3 Kb con extremos repetidos

invertidos de 1,5-Kb que representan un 13 % del tamaño total del transposón, serían similares a los involucrados en la inducción de una deleción de 1.8-Kb con extremos repetidos invertidos de 430-pb que representan el 47 % del tamaño total del segmento a escindir.

La escisión precisa de *Tn10* y de *mini-Tn10* ocurre por la eliminación de segmentos de ADN flanqueados por secuencias repetidas directas de 9-pb; la longitud de los segmentos intervinientes es distinta para cada elemento, y es probable que la estructura secundaria también lo sea. El hecho de que ambos eventos respondan en forma similar a la radiación ultravioleta y a mutaciones en los genes *recN* y *ruv* indica que están controlados por el mismo tipo de mecanismos. Es posible que en la inducción por irradiación ultravioleta de las deleciones que involucran a *Tn10* y a *mini-Tn10* sean importantes las repeticiones directas de 9-pb que flanquean a las repeticiones inversas o palindrómicas.

Numerosos investigadores señalaron que las secuencias cortas repetidas directas y las secuencias palindrómicas cumplen un rol fundamental en los procesos de generación espontánea de deleciones (Albertini y col., 1982; Ehrlich, 1989; Balbinder y col., 1989). Los resultados de este trabajo indican que éstas también jugarían un rol importante en la inducción de deleciones por irradiación ultravioleta.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo demuestran que el incremento en la frecuencia de escisión de *Tn10* y de *mini-Tn10* luego de irradiación ultravioleta depende de la expresión del sistema SOS y en particular de genes involucrados en la reparación recombinacional o postreplicativa, tales como *recN* y *ruv*. En el caso de *Tn10* también se observó disminución de la inducción en mutantes *recBC sbcB* y cambios en la cinética de inducción en mutantes *recF*. Ninguna de estas mutaciones anuló completamente la inducción de la escisión, lo cual sugiere que varios mecanismos diferentes intervendrían en el proceso en estudio y/o que existe un cierto grado de redundancia en las actividades de los genes involucrados.

La respuesta SOS favorece la supervivencia de una población bacteriana sometida a condiciones de "stress" intensificando la capacidad de reparar el ADN e incrementando la variabilidad genética. El aumento en la frecuencia de escisión de Tn10 y de mini-Tn10 asociado a la inducción del sistema SOS puede interpretarse desde dos puntos de vista, no necesariamente excluyentes. La reparación postreplicativa forma parte de un mecanismo inducido de supervivencia celular y el incremento en la frecuencia de escisión se debe errores de un camino metabólico normalmente no mutagénico, o, el aumento en la recombinación forma parte de un mecanismo de supervivencia poblacional que favorece la variabilidad genética incrementando la probabilidad de que surja una variante mejor adaptada a las condiciones ambientales existentes. La segunda interpretación concordaría con la hipótesis de variación genética (Echols, 1981) que propone que la respuesta SOS, además de incrementar la supervivencia y la mutagénesis puntual, produciría rearrreglos genéticos capaces de provocar cambios fenotípicos profundos, tales como deleciones, duplicaciones y translocaciones.

Estudios futuros deberán dilucidar las funciones de los genes *recN*, *ruvABC*, *recF* y *recBC*, así como las interacciones de los productos de estos genes entre sí y con su sustrato, con referencia al proceso de inducción de la escisión precisa de Tn10, y tal vez al de otros tipos de deleciones genéticas que ocurren entre secuencias repetidas directas que limitan a secuencias palindrómicas. Ello permitirá una mejor comprensión de los mecanismos y estructuras involucrados en el fenómeno en estudio.

6. RESUMEN

La escisión precisa del transposón Tn10 se tomó como sistema modelo para el estudio de la generación de deleciones que ocurren entre secuencias cortas de ADN duplicadas que limitan a secuencias palindrómicas. Este tipo de estructura genera frecuentemente deleciones en bacterias y en organismos superiores.

El transposón Tn10 es un elemento genético de 9,3-Kb con extremos repetidos invertidos de 1,5-Kb que duplica secuencias de 9-pb de la molécula aceptora durante su inserción en el genoma. La escisión precisa de Tn10 es un evento independiente de la transposición, que se produce por la eliminación de todas las secuencias del transposón junto con una copia de la secuencia repetida de 9-pb. La frecuencia de escisión precisa de Tn10 varía drásticamente con el sitio de inserción entre 10^{-6} a 10^{-8} por elemento por generación.

En este trabajo se observó que la frecuencia de escisión precisa de Tn10, desde distintos sitios del genoma de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli* incrementa hasta 50 veces por la acción de la mitomicina C y la irradiación ultravioleta.

Con el objeto de dilucidar los mecanismos involucrados en la inducción de este fenómeno, se analizó la frecuencia de escisión precisa de Tn10, luego de irradiación ultravioleta o tratamiento con mitomicina C, en bacterias con mutaciones en genes de reparación del ADN.

Los experimentos realizados con *Salmonella typhimurium* indicaron que el incremento en la frecuencia de escisión precisa de Tn10 luego de la irradiación ultravioleta es independiente de la reparación por escisión de dímeros (sistema UvrABC) y dependiente de alguna función de la proteína RecA, ya que no se evidencia en mutantes *recA*. Los experimentos realizados con la mutante *topA* y con el plásmido pKM101 sugirieron que la inducción de la escisión precisa de Tn10 ocurre por mecanismos distintos a los involucrados en la inducción de mutaciones puntuales.

Se continuaron los estudios en cepas de *Escherichia coli* con mutaciones en genes del sistema SOS. Los resultados obtenidos con la mutante *lexA3* (ind^-), que es defectiva en la inducción del sistema SOS, demostraron que es necesaria la expresión de algún gen de este sistema para que se incremente la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta. Experimentos realizados en mutantes *lexA3* (ind^-) portadoras de un plásmido *ptac-recA* (gen *recA* regulable por IPTG) indicaron que cantidades aumentadas de proteína RecA no son suficientes para que se produzca la inducción en condiciones de represión de los demás genes SOS.

Con el fin de identificar el o los genes SOS responsables del aumento en la frecuencia de escisión luego de irradiación ultravioleta, se analizó la inducción en cepas defectivas en el procesamiento mutagénico SOS y en cepas defectivas en la reparación recombinacional.

Los experimentos realizados con mutantes *umuC* nulas, *recA727* y el plásmido pKM101 demostraron que los mecanismos involucrados en la inducción de la escisión precisa de *Tn10* son distintos a los involucrados en la inducción de la mutación puntual.

Los experimentos realizados con las mutantes *recN*, *ruvA* y *ruvB* indicaron que estos genes, que participan en la reparación recombinacional o postreplicativa del ADN, intervienen en el proceso en estudio.

Los experimentos realizados con las mutantes *recBC sbcB* y *recF*, indicaron que los genes *recBC* o *sbcB* y *recF* también podrían estar involucrados en forma directa o indirecta en el proceso de inducción de la escisión precisa de *Tn10*.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos sobre el comportamiento de la escisión precisa de *Tn10* con los de un elemento genético similar pero de menor tamaño se utilizó un minitransposón de 1,8 Kb (mini-*Tn10* Km).

Se observó que la frecuencia de escisión de mini-*Tn10* km incrementa hasta 10 veces por la acción de la mitomicina C y la irradiación ultravioleta.

Experimentos realizados con mutantes *lexA3* (ind^-), defectivas en la inducción del sistema SOS, indicaron que la inducción de la escisión de mini-Tn10 Km depende de la expresión de este sistema.

Experimentos realizados con mutantes *recN* y *ruvB* indicaron que en el incremento de la escisión de mini-Tn10 Km están involucrados genes de reparación recombinacional o postreplicativa.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo demuestran que el incremento en la frecuencia de escisión de Tn10 y de mini-Tn10 luego de irradiación ultravioleta depende de la expresión del sistema SOS y en particular de genes involucrados en la recombinación y reparación postreplicativa, tales como *recN*, *ruvA* y *ruvB*. Las mutaciones *recN262*, *ruvA60* y *ruvB52* no anularon completamente la inducción de la escisión, lo cual sugiere que varios mecanismos diferentes intervendrían en el proceso en estudio y/o que existe un cierto grado de redundancia en las actividades de los genes involucrados.

Two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is stylized and appears to be 'Eduardo'. The signature on the right is more legible and appears to be 'Susana Linares'.

7. REFERENCIAS

Albertini, A. M., M. Hofer, M. P., Calos and J. H. Miller (1982) On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell*, 29, 319-328

Alper M. and B. Ames (1975) Positive selection of mutants with deletions of the *gal-chl* region of the *Salmonella* chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions, *J. Bacteriol.*, 121, 259-266.

Andreeva, I.V., O.Y. Rusina, E. E. Mirskaya and A. G. Skavronskaya (1990) The effect of plasmid pKM101 on umuDC function enhancing precise excision of transposons, *Mutation Res.*, 230, 55-60.

Balbinder E., Coll E., Hutchinson J., Bianchi A, Groman T., Weeler K. and M. Meyer (1993) Participation of the SOS system in producing deletions in *Escherichia coli* plasmids, *Mutat. Res.*, 286, 253-265.

Balbinder, E., C. Mac vean and R., E., Williams (1989) Overlapping direct repeats stimulate deletions in specially designed derivatives of plasmid pBR325 in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 214, 233-252.

Bierne H., S. D. Ehrlich and B. Michel (1991) The replication termination signal *terB* of the *Escherichia coli* chromosome is a deletion hot spot, *EMBO J.*, 10, 2699-2705.

Birnboim H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic. Acids. Res.*, 7, 1513-1523.

Bochner, B., H.C. Huang, G. Schieven and B.N. Ames (1980) Positive selection for loss of tetracycline-resistance, *J. Bacteriol.*, 143, 926-933.

Bonura T and K. Smith (1975) Enzymatic production of DNA double strand breaks after ultraviolet irradiation of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 121, 511-517.

Brunier, D., B. Michel and S. Ehrlich (1988) Copy choice illegitimate DNA recombination, *Cell*, 52, 883-893.

Brunner, D.P., B. A. Traxler, S. M. Holt and L.L. Crose (1986) Enhancement of UV survival, UV and MMS mutability, precise excision of *Tn10* and complementation of *umuC* by plasmids of different incompatibility groups, *Mutation Res.*, 166, 29-37.

Cairns, J. (1981) The origin of human cancers, *Nature*, 289, 353-357.

Clark A. (1971) Toward a metabolic interpretation of genetic recombination in *Escherichia coli* and its phages, *Ann. Rev. Microbiol.*, 23, 437-464.

Cortopassi G. and N. Arheim (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6927-6933.

Cox M. (1991) The RecA protein as a recombinational repair system, *Mol. Microbiol.*, 5, 1295-1299.

Das Gupta, U., K. Weston-Hafer and D. E. Berg (1987) Local ADN sequence control of deletion formation in *Escherichia coli* plasmid pBR322, *Genetics*, 115, 41-49.

Davis, R. W., D. Botstein, and J. Roth (1980) *Advanced bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

De Flora S. and F. D'Agostini (1992) Halogen lamp carcinogenicity, *Nature*, 356, 569.

Dianov G., T. Timchenko, O. Sinitsina, A. Kuzminov and R. Salganik (1991) Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation, *Mutat. Res.*, 225, 448-452.

Dimpfl J. and H. Echols (1989) Duplication mutation as an SOS response in *Escherichia coli* enhanced duplication formation by constitutively activated RecA, *Genetics*, 123, 255-260.

Doherty J., R. Lindeman, R. Trent, M. Graham and D. Woodcock (1993) *Escherichia coli* host strains SURE and SRB fail to preserve a palindrome in lambda phage: improved host strains, *Gene*, 124, 29-36.

Dutreix, M., P.L. Moreau, A. Bailone, F. Galibert, J.R. Battista, G.C. Walker and R. Devoret (1989) New *recA* mutations that dissociate the various RecA protein activities in *Escherichia coli* provide evidence for an additional role for RecA in UV mutagenesis, *J. Bacteriol.*, 171, 2415-2423.

Echols, H. (1981) SOS functions, cancer and inducible mutagenesis, *Cell*, 25, 1-2.

Efstratiadis A., Posakony J., Maniatis J., Lawn R., O'Connell C., Spritz R., DeRiel J., Forget B., Weissman S., Slightom J., Blechi A., Baralle F., Shoulders C. and N. Proudfoot (1980) The structure and evolution of the human α -globin gene family, *Cell*, 21, 653-668.

Ehrlich S. D. (1989) In Berg D. E. and M. M. Howe (ed) *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 799-832.

Farabough, P., U., Schmeissner, M., Hofer and J. H. Miller (1978) Genetic studies of the *lac* repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the *lacI* gene of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 126, 847-863.

Foster, T., J., V. Lundblad, S.Halling and N. Kleckner (1981) Three *Tn10* associated excision events: relationship with transposition and role of direct and inverted repeats. *Cell*, 23, 215-227.

Glickman, B., and L. S. Ripley (1984) Structural intermediates of deletion mutagenesis: a role for palindromic DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 512-516.

Hafner, L.M. and D.G. MacPhee (1989) Modulation of mutagenesis involving precise excision of transposon Tn10, *Mutation Res.*, 211,291-299.

Haseltine W. (1983) Ultraviolet light repair and mutagenesis revisited, *Cell*, 33, 13-17.

Hopkins, J., M. Cløments and M. Syvanen (1983) New class of mutations in *Escherichia coli* (*uup*) that affect precise excision of insertion elements and bacteriophage Mu growth, *J. Bacteriol.*, 153, 384-389.

Ikedo H., K. Moriya and T. Matsumoto (1980) *In vitro* study of illegitimate recombination involvement of DNA gyrase, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45, 399-408.

Ishiura M., Hazumi N., Uchida T. and Okada (1989) A *recB recC sbcB recJ* host prevents *recA*- independent deletions in recombinant cosmid clones propagated in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 171, 1068-1074.

Kirchner J., D. Lim, E. Witkin, N. Garvey, and V. Roegner-Maniscalco, (1992) An SOS-inducible retronphage (ϕ R86) in *Escherichia coli* strain B, *Mol. Microbiol.*, 6, 2815-2824.

Kleckner N. (1989) In Berg D. E. and M. M. Howe (ed) *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 229-261.

Kleckner N., Bender J., and S. Gottesman (1991) Uses of transposon with emphasis on Tn10, *Methods Enzimol.*, 24, 139-180.

Kuan, C., S. Iiu and I. Tessman (1991) Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in *Escherichia coli*, *Genetics*, 128, 45-57.

Kushner S., DNA repair in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and molecular biology (Neidhardt F, eds)(1987) American Society for Microbiology Washington DC.

Latarjet, R., P. Morenne and R. Berger (1953) Un appareil simple pour le dosage des rayonnements ultraviolets emis par les lampes germicides, Ann. Inst. Pasteur, 85, 174-184.

Levy M. S., E. Balbinder, and R. Nagel (1993) Effect of mutations in SOS genes on UV-induced precise excision of Tn10 in *Escherichia coli*, Mutat. Res., 293, 241-247.

Levy, M.S., P. Pomposiello and R. Nagel (1991) RecA dependent increased precise excision of Tn10 in *Salmonella typhimurium*, Mutation Res., 255, 95-100.

Lewis K., M. Jenkins and D. Mount (1992) Isolation of DNA damage inducible promoters in *Escherichia coli*: regulation of *polB(dinA)*, *dinG* and *dinH* by LexA repressor, J. Bacteriol., 174, 3377-3385.

Little, J.W., S.H. Edmiston, L.Z. Pacelli and D.W. Mount (1980) Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 77, 3225-3229.

Lloyd R., and C. Buckman (1991a) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K12 and of its role in recombination and DNA repair, 73:1004-1011.

Lloyd R., and C. Buckman (1991b) Overlapping functions of *recD*, *recJ* and *recN* provide evidence of three epistatic groups of genes in *Escherichia coli* recombination and DNA repair, Biochimie, 3, 313-320.

Lloyd R., M. C. Porton and C. Buckman (1988) Effect of *recF*, *recJ*, *recN*, *recO* and *ruv* mutations on ultraviolet survival and genetic recombination in a *recD* strain of *Escherichia coli* K12, *Mol. Gen. Genet.*, 212, 317-324.

Lloyd R., S. M., Picksley and C. Prescott (1983) Inducible expression of a gene specific to the RecF pathway for recombination in *Escherichia coli* K12, *Mol. Gen. Genet.*, 190, 162-167.

Lloyd R. and G. Sharples (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *Escherichia coli* RecG protein, *EMBO J.*, 12, 17-22.

Lorenzo, C., E. Howard and R. Nagel (1990) Studies on Tn10 transposition and excision in DNA repair mutants of *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, 232, 99-104.

Lundblad V., and N. Kleckner (1985) Mismatch repair mutations of *Escherichia coli* K12 enhance transposon excision, *Genetics*, 109, 3-19.

Lundblad, V., A.F. Taylor, G. R. Smith and N. Kleckner (1984) Unusual alleles of *recB* and *recC* stimulate excision of inverted repeat transposons Tn10 and Tn5, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 81, 824-828.

MacPhee, D.G., and L.M. Hafner (1988) Antimutagenic effects of chemicals on mutagenesis resulting from excision of a transposon in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, 207, 99-106.

Mahan M. and J. Roth (1989) Role of *recBC* function in formation of chromosomal rearrangements: a two step model for recombination, *Genetics*, 121, 433-443.

Maloy, S.R. and W.D. Nunn (1981) Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 145, 1110-1112.

Mandal N., A. Mahdi, G. Sharples and R. Lloyd (1993) Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruv B* and *ruvC* mutations, *J. Bacteriol.*, 175, 4325-4334.

Maniatis, T. J., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982) *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Miiler, J. and K. Low (1984) Specificity of mutagenesis resulting from the induction of the SOS system in the absence of mutagenic treatment, *Cell*, 37, 675-682

Miller, J. H., (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Mita S., Rizzuto R, Moraes C., Arnaudo E., Fabrizzi G. and E. Schon (1990) Recombination via flankin direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA, *Nucleic Acids Res.*, 18, 561-567.

Miura-Masuda A. and H. Ikeda (1990) The DNA gyrase of *Escherichia coli* participates in the formation of a spontaneous deletion by *recA*-independent recombination *in vivo*, *Mol. Gen. Genet.*, 220, 345-352.

Nalbantoglu J., Hartley D., Phear G., Tear G. and M. Meuth (1986) Spontaneous deletion formation at the *aprt* locus of hamster cells: the presence of short sequence homologies and dyad symmetries at deletion termini, *EMBO J.*, 5, 1199-1204.

Nohmi, T., J.R. Battista, L.A. Dodson and G.C. Walker (1988) RecA- Mechanistic relationship between transcriptional derepression and posttranscriptional activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 85, 1816-1920.

Overbye, K., and P. Margolin (1981) Role of *supX* gene in ultraviolet light induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, 146, 170-178.

Picksley, S. M., Attfield, P., and R. Lloyd (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional *recN* product, *Mol. Gen. Genet.*, 195, 267-274.

Pruss, G., and K. Drlica (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription, *Cell*, 56, 521-523.

Saig K., Orie H., Tanaka Y., Miura A. and H. Ikeda (1988) Formation of deletion in *Escherichia coli* between direct repeats located in the long inverted repeats of a cellular slime mold plasmid: participation of DNA gyrase, *Mol. Gen. Genet.*, 214, 4-5.

Sargentini N., and K. Smith; *Mutation Research* (1989) Role of *ruvAB* genes in UV and γ -radiation mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 215:115-129.

Sargentini N, and K. Smith (1992) Involvement of RecB-mediated (but not RecF-mediated) repair of DNA double strand breaks in the γ -radiation production of long deletions in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 265:83-101.

Sassanfar M., and J. Roberts (1991a) Constitutive and UV-mediated activation of RecA protein: combined effects of *recA441* and *recF143* mutations and of addition of nucleosides and adenine, *J. Bacteriol.*, 173,5869-5875.

Sassanfar M., and J. Roberts (1991b) Nature of the SOS inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication, *J. Mol. Biol.*, 212, 79-96.

Schwartz D. and J. Beckwith (1969) Mutagens that cause deletions in *Escherichia coli*, *Genetics*, 61, 371-376.

Selby C. and A. Zancar (1990) Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 3522-3525.

Shiba T., Iwasaki H., Nakata A., and H. Shinagawa (1991) SOS- inducible DNA repair proteins RuvA and RuvB, of *Escherichia coli*: Functional interactions between RuvA and RuvB for ATP hydrolysis and renaturation of the cruciform structure in supercoiled DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 8445-8449.

Shinagawa,H., I. Hiroshi, K. Takesi and A. Nakata (1988) RecA-protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A),85,1806-1810.

Shurvinton C., Lloyd R., Benson F., and P. Attfield (1984) Genetic and molecular analysis of the *Escherichia coli* *ruv* gene, Mol. Gen. Genet., 194, 322-329.

Silhavy T., M. L. Berman and L. Enquist (1984) Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Simic D., Vukovic B., Ajanovic A., and J. Knezevic-Vukcevic (1991) Activation of RecA protein in recombination deficient strains of *Escherichia coli* following DNA-damaging treatments, Mutat. Res., 254, 255-262.

Singer B. and Wetlye (1988) Deletion formation in bacteriophage T4, J. Mol. Biol., 202, 233-243.

Sweasy,J.B., E.M.Witkin, N.Sinha and V. Roegner-Maniscalco (1990) RecA protein of *Escherichia coli* has a third essential role in SOS mutator activity. J. Bacteriol., 172, 3030-3036.

Szostak J., R. Rothstein and F. Stahl (1983) The double strand repair model for recombination, Cell, 33, 25-35.

Taylor A. (1992) Movement and resolution of Holliday junctions by enzymes from *Escherichia coli*, Cell, 69, 1063-1065.

Todo T. and S. Yonei (1983) Inhibitory effects of membrane binding drugs on excision repair of DNA damage in UV irradiated *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, 112, 97-107.

Walker, G.C. (1984) Mutagenic and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, 48, 60-93.

Wang, T., and K. Smith (1983) Mechanisms for the *recF*-dependent and *recB*-dependent pathways of postreplication repair in UV irradiated *Escherichia coli uvrB*, *J. Bacteriol.*, 156, 1093-1098.

Wang, T., and K. Smith (1988) Different effects of *recN* and *recJ* mutations on the postreplication repair of UV-damaged DNA in *Escherichia coli* K12, *J. Bacteriol.*, 170:2555-2559.

West S. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination, *Ann. Rev. Biochem.*, 61, 603-640.

West S. and B. Connolly (1992) Biological roles of the *Escherichia coli* RuvA, RuvB and RuvC proteins revealed, *Mol. Microbiol.*, 6, 2755-2759.

Witkin, E., McCall J., Volkert M. and I. Wermundsen (1982) Constitutive expression of SOS functions and modulation of mutagenesis resulting from resolution of genetic instability at or near the *recA* locus of *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 185, 43-50.

Woodgate R., and S. Sedgwick (1992) Mutagenesis induced by bacterial UmuDC proteins and their plasmid homologues, *Mol. Microbiol.*, 6, 2213-2218.

Yang Y. and G. Ferro-Luzzi Ames (1988) DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 85, 8850-8854.

Yi, T., D. Stearns and B. Dimple (1988) Illegitimate recombination in an *Escherichia coli* plasmid: modulation by DNA damage and a new bacterial gene, *J. Bacteriol.*, 170, 2898-2903.

Zhang C., Baumer A., Maxwell R., and P. Nagley (1992) Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual, *FEBS*, 1, 34-38.