



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Química

Programa de
Maestría en Ciencias Químicas

Activación de la respuesta SOS en mutantes de *Escherichia coli* con defectos en exonucleasas (*xonA* y *recJ*), helicasas (*recQ*) y endonucleasas (*xthA*) por daños producidos por diferentes agentes genotóxicos.

TESIS

Presenta:

Bióloga: Viridiana Domínguez

Comité de tutores

Dr. Enrique Morales Ávila

Dr. Jorge H. Serment Guerrero

Dra. Martha Patricia Cruces Martínez

Toluca Estado de México, Diciembre 2014

RESUMEN

La respuesta SOS es una de las estrategias con las que cuenta *Escherichia coli* para contrarrestar las lesiones en el material genético. Está integrada por aproximadamente 60 genes que al activarse le confieren a la célula mayores oportunidades de sobrevivir. La generación de regiones del ADN de una sola banda, es un requisito indispensable para la activación de este sistema, de manera que las lesiones deben ser previamente procesadas de alguna forma, a fin de que la activación de la respuesta tenga lugar. Se conocen algunos genes, como *recO*, *recB* y *recJ*, que intervienen en dicho procesamiento, ya que cuando mutantes defectuosos en dichos genes son expuestos a radiación; la actividad de SOS es menor que en una cepa silvestre. En trabajos anteriores se ha visto que si bien al inactivar genes que intervienen en el procesamiento de lesiones para generar ADN de cadena sencilla, el nivel de inducción de SOS disminuye con respecto a una cepa silvestre, al eliminar genes que intervienen directamente en la reparación, la respuesta SOS aumenta. En el presente trabajo se construirán cepas con defectos en los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ* que participan en diferentes mecanismos de reparación, con la finalidad de evaluar el procesamiento de lesiones producidas por diferentes agentes genotóxicos (agentes alquilantes y oxidantes) mediante la sensibilidad y actividad de la respuesta SOS al exponerlas a diferentes dosis de estos agentes.

INTRODUCCIÓN

El DNA es una de las moléculas más complejas que se conoce, su secuencia de nucleótidos contiene la información genética necesaria para realizar todas las funciones necesarias para la vida. Sin embargo, cuando el DNA está expuesto al ataque de diversos agentes físicos o químicos se puede alterar su estructura química básica, para lo cual, se han desarrollado evolutivamente diferentes estrategias para enfrentar o contrarrestar dichos daños, ya sea para protección contra estos ataques o bien para la reparación de lesiones que se causen en el genoma. Una de estas opciones en *Escherichia coli* es la respuesta SOS, llamada así porque se pensó que era la última alternativa que tenía la célula para poder sobrevivir ante el daño genético (Courcelle, et al., 2001; Serment, et al., 2005). Este sistema responde a lesiones en el DNA o a una interrupción en el proceso de replicación y a la acumulación de DNA de cadena sencilla, desencadenando la expresión de múltiples genes que participan en la reparación, la replicación, la recombinación y la división celular. La respuesta SOS está integrada por alrededor de 60 genes de defensa, cuya expresión se activa al ocurrir lesiones en el DNA (Fernández, et al., 2000). Dentro de estos genes, se encuentran *recA*, que actúa como un regulador positivo y *lexA* que es un represor del sistema. En circunstancias normales el producto *LexA* se encuentra adherido a una secuencia consenso llamada “caja SOS”, que se encuentra presente en todos los genes pertenecientes a esta vía, impidiendo la transcripción de los mismos. Cuando ocurre una lesión o se interrumpe la síntesis de DNA, por agentes que alteran su estructura química, es necesario que ocurran una serie de eventos previos para la formación de regiones de DNA de cadena sencilla, ya que es el sustrato necesario para que se active SOS. Una vez formado el DNA de una hebra, la proteína *RecA* se une a ella y se activa, con lo que promueve la autodegradación de *LexA* y así se permite la expresión de los genes SOS, lo que incrementa la probabilidad de recuperación. Una vez reparado el daño, *RecA* vuelve a su estado basal y *LexA* nuevamente se une a los operadores de la “caja SOS”, reprimiendo nuevamente a los genes de esta vía.

Es importante investigar la sucesión de eventos que ocurren desde que se origina la lesión en el DNA hasta que se activa la respuesta SOS. Los resultados de las investigaciones realizadas con anterioridad, muestran que los productos de los genes *recJ* y *xonA*, son enzimas que a partir de rupturas dobles generadas por la exposición a radiación o pequeños huecos generados por diferentes procesos enzimáticos, degradan una de las cadenas de DNA y generan regiones de una

hebra (Umezú y Kolodner, 1994; Breña y Serment, 1998). Sin embargo, es poco probable que durante los procesos de reparación se genere el DNA de cadena sencilla que la activa. Al respecto recientemente se demostró que entre las enzimas que participan en la modificación o procesamiento de lesiones para generar el DNA de cadena sencilla que activa SOS están cuatro distintas Exonucleasas de cadena sencilla (enzimas que funcionan escindiendo nucleótidos a partir de una reacción de hidrólisis que rompe el enlace fosfodiéster, ya sea en el extremo 3' o 5'), Exo I, RecJ, ExoVII y ExoX (Moser, et al., 1997; Serment, et al., 2008). Con base en esos resultados se propuso un modelo para tratar de explicar la manera en que las lesiones producidas por la radiación gamma se procesan para inducir la respuesta. El modelo postula que se inicia a partir de rupturas de cadena sencilla o bien de cortes producidos por la acción de endonucleasas AP como parte del mecanismo de reparación por escisión de bases. Para confirmar dicha hipótesis, se construyeron cepas con defectos en la enzima RecJ, ExoI (codificada por los genes *recJ*, *xonA*), ExoIII/EndoVI (codificada por el gen *xthA*) que lleva a cabo alrededor del 90 % de los cortes en sitios abásicos o sitios AP en *E. coli* (Sandigursky y Franklin, 1992) y la helicasa RecQ (codificada por el gen *recQ*) para evaluar su contribución en los procesos previos a la activación de SOS ante la exposición a diferentes agentes genotóxicos.

1. ANTECEDENTES

El ADN es la biomolécula responsable de almacenar, transmitir y codificar la información genética que permite que los seres vivos realicen todas sus funciones. Está formado por dos cadenas antiparalelas polinucleotídicas, enrolladas en forma de hélice; cada nucleótido está constituido por un grupo fosfato, una pentosa (desoxirribosa) y una base nitrogenada (Watson y Crick, 1953).

La unión de las tres unidades constitutivas de los nucleótidos de la molécula de ADN se da por medio de enlaces fosfodiéster entre un oxígeno del grupo fosfato de la desoxirribosa y el carbono 3' de una base. Por su parte, la unión entre las bases de ambas hebras esta dada por puentes de hidrogeno, apareándose siempre de la misma manera: G-C y A-T, cualquier cambio modifica no sólo la estructura sino la función (Atkins, 2007).

1.1. Daños al ADN

Debido a que el ADN es una molécula altamente reactiva, tanto la actividad celular interna como los factores externos, (rayos UV, radiación ionizante, agentes químicos, etc.), pueden causar lesiones que resultan en cambios estructurales que interfieren en la replicación y transcripción de la molécula (Morita, *et al.*, 2011).

La mayoría de los daños en el ADN modifican la estructura química de las bases, provocando cambios en las hélices de la molécula por la formación de nuevos enlaces o aductos, produciendo mutaciones, alteraciones en la división celular y afectaciones en el metabolismo celular, que pueden conducir a su muerte (Eccles, *et al.*, 2011).

De acuerdo a su origen los daños en el ADN se pueden clasificar principalmente en:

1. Endógenos: se originan por errores durante la replicación del ADN o por la acción de los radicales libres que se producen durante el metabolismo aerobio. Los daños consisten en cambios tautoméricos en las bases, apareamiento incorrecto o la desaminación de las mismas.

2. Exógenos: Son causados por agentes externos, ya sean físicos (como radiación UV o ionizante) o por una amplia variedad de agentes químicos (Rastogi, *et al.*, 2010).

1.2. Factores endógenos

a. Cambios tautoméricos

Por definición los tautómeros son isómeros que se diferencian sólo en la posición de un hidrogeno (Devlin, 2008). Estas formas se encuentran en equilibrio, y espontáneamente cambian de una forma a otra; sin embargo, si esto sucede durante la replicación de ADN, se pueden producir daños o mutaciones, ya que cambia el patrón de apareamiento normal (Devlin, 2008; Brown, 2007).

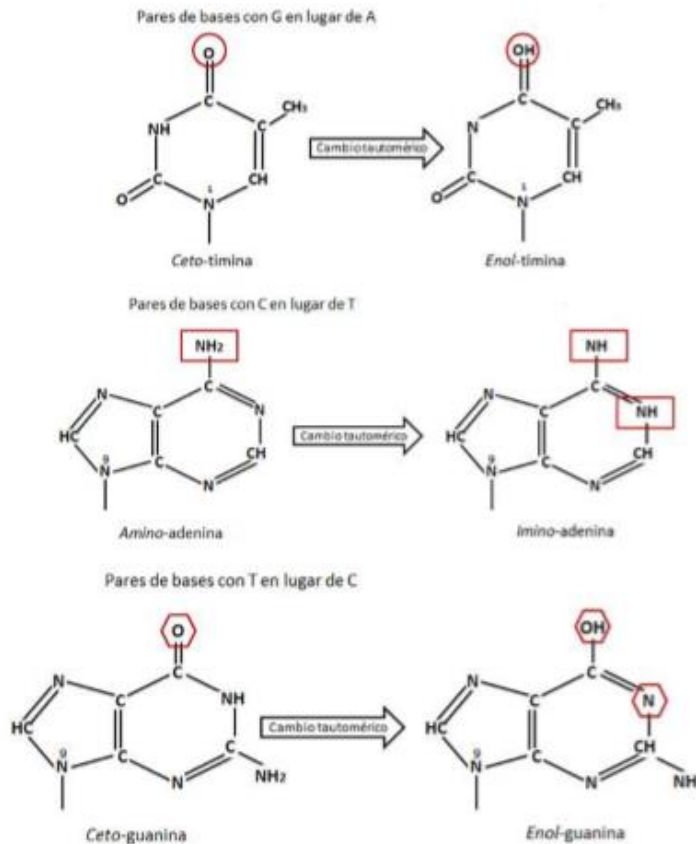


Fig. cambios tautoméricos

b. Desaminación de bases

Estos daños son espontáneos y se producen cuando se pierde el grupo amino exocíclico de la adenina, guanina y citosina dando como resultado una base modificada con un patrón de

apareamiento distinto. Las más frecuentes son la desaminación de la citosina (que cambia a uracilo) y la de 5-metil-citosina a timina. Estas lesiones pueden ser reparadas por escisión de bases (Tubbs, 2012; López-Olmos et al. 2012)

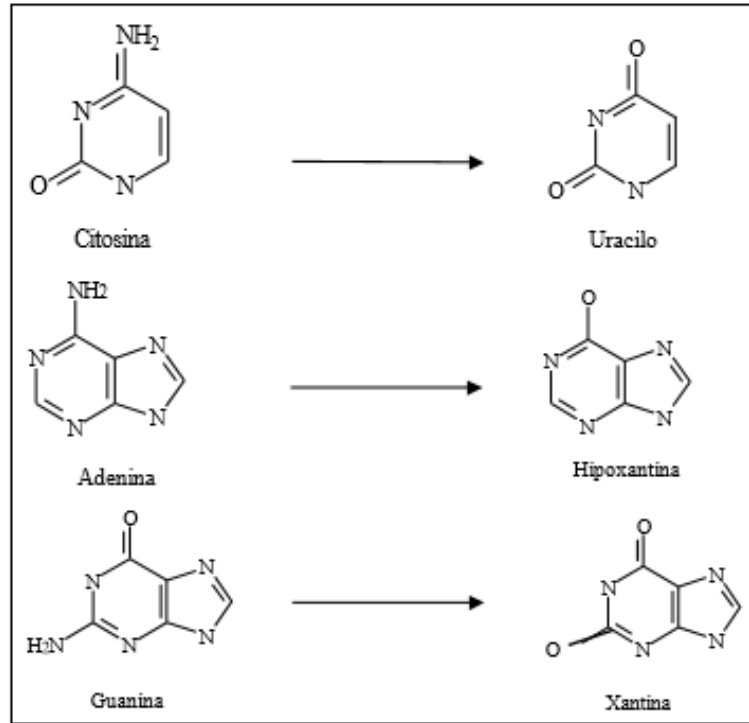


Fig. 2 Desaminación de bases

c. Bases mal apareadas

Los errores que comete la polimerasa de DNA dan lugar a apareamientos incorrectos de bases, por ejemplo que una guanina por error se aparee con una timina. En condiciones normales la actividad de exonucleasa asociada a la polimerasa los corrige, pero si no lo hace esto permanece y en la siguiente ronda de duplicación la cadena con la base errónea servirá de molde, con lo que se fija como una mutación puntual.

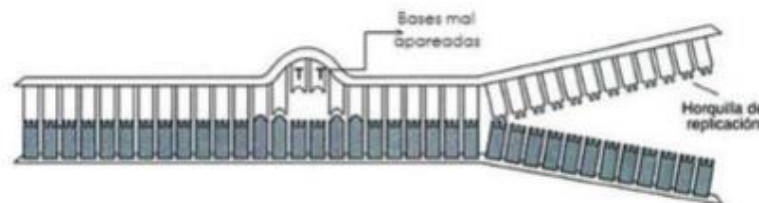


Fig. 3 Malos apareamientos

1.3. Factores exógenos

a. Agentes Alquilantes

Los agentes alquilantes (metilantes y etilantes) son potencialmente citotóxicos y mutagénicos, cuya acción induce varios sistemas de reparación del ADN en la célula (Alquiltransferasas, Reparación por escisión de bases). Los daños más comunes causados por esos agentes son la alquilación de los nitrógenos o de los oxígenos de las bases y ocasionalmente de los fosfatos. La presencia de estas alquilaciones erróneas se considera una lesión premutagénica, ya que puede formar uniones con bases no complementarias. (Nieminuszczy y Grzesiuk, 2007).

Las características más comunes de los agentes alquilantes es que son compuestos electrofílicos con afinidad por centros nucleofílicos en macromoléculas orgánicas. Pueden ser monofuncionales o bifuncionales. Los primeros tienen un solo grupo reactivo que interactúa covalentemente con un solo centro nucleofílico, dando lugar a aductos en el ADN. Los agentes bifuncionales dan origen a enlaces intrabanda, enlaces interbanda o enlaces ADN-proteína (Fu, *et al.*, 2013).4

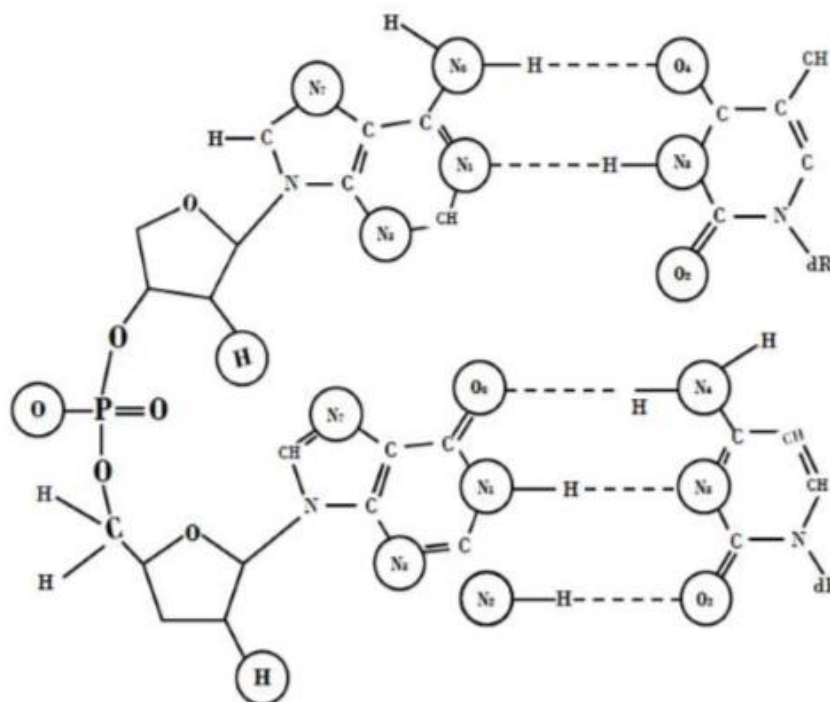


Fig. 4. Alquilación de bases

Algunos ejemplos de agentes alquilantes son metil-metanosulfonato y haluros de metilo, que bloquean la replicación del ADN; o el N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNGU) y el N-metil-N-nitrosourea (ENU), que generan lesiones altamente citotóxicas y mutagénicas que conducen fácilmente a la muerte celular (Tubbs y Tainer, 2010).

Los agentes alquilantes reaccionan con el DNA, produciéndose la alquilación de los nitrógenos o de los oxígenos de las bases y ocasionalmente de los grupos fosfatos. La presencia de aductos, se considera una lesión premutagénica, ya que puede modificar el apareamiento de las bases. Otra consecuencia de estos agentes es que interrumpen la síntesis del DNA, la transcripción del RNA y como consecuencia producir la muerte celular (Miranda, 1998). El ataque de estos compuestos se produce de tres maneras:

- a) Cuando estos agentes se adhieren a las bases de DNA, da como resultado la fragmentación de la molécula por las enzimas de reparación que tratan de remplazar las bases alquiladas

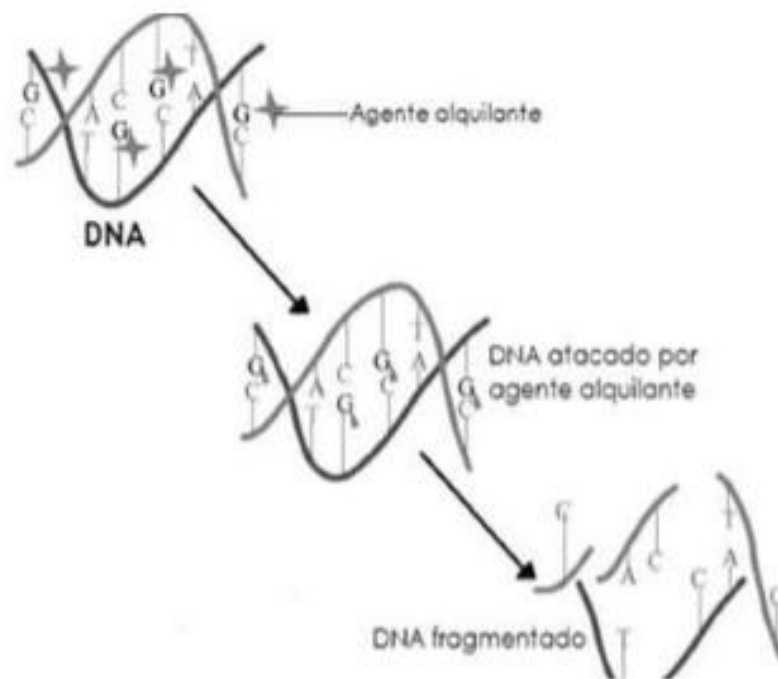


Fig. 5 Fragmentación molecular

b) Algunos agentes alquilantes pueden ser bifuncionales, esto es, pueden formar dos enlaces con el DNA. El ataque de estos compuestos da origen a la formación de enlaces dobles y de acuerdo al sitio donde se produzcan pueden formarse en una cadena (intrabanda) o pueden conectar a dos cadenas distintas de DNA (interbanda) también llamados puentes cruzados, de modo que las dos cadenas opuestas quedan unidas por el agente alquilante.

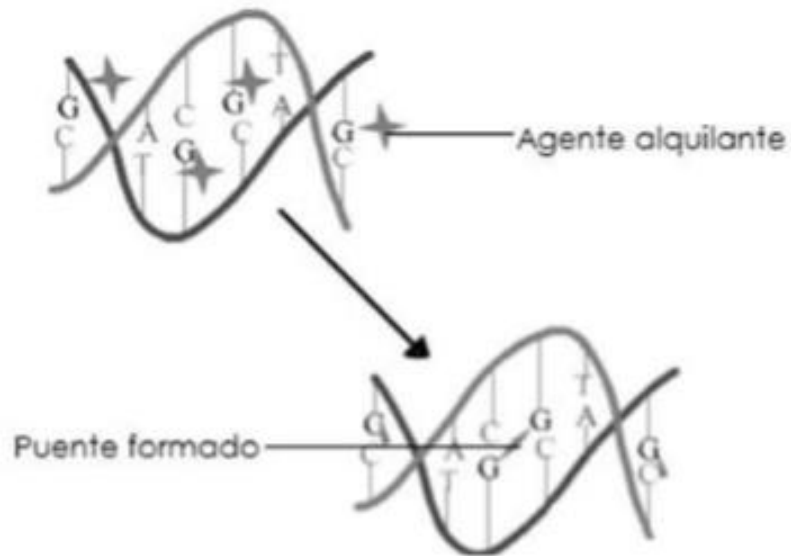


Fig. 6 Entrecruzamientos

c) Por último, la acción de estos agentes provoca la inclusión de nucleótidos incorrectamente apareados, lo que lleva a mutaciones, por ejemplo una G alquilada puede ser emparejada erróneamente con una T.

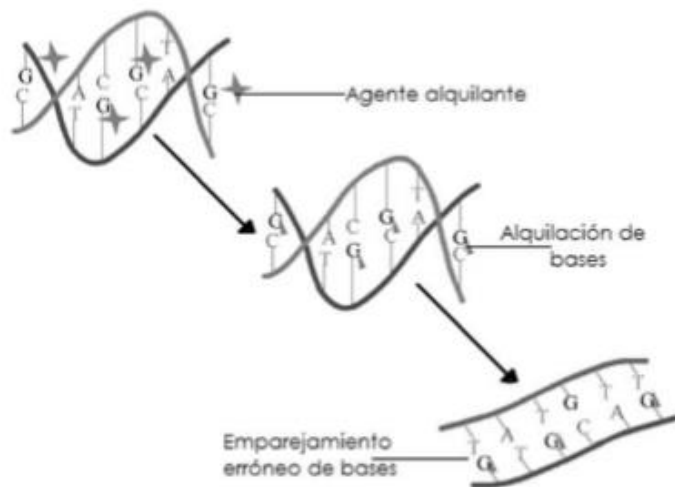


Fig. 7 Malos apareamientos

b. Especies reactivas de oxígeno

La formación de radicales libres se origina en los organismos vivos a partir del uso de compuestos químicos, de la exposición a radiación ionizante, radiación UV de longitudes de onda largas y de forma espontánea por el metabolismo aerobio (Svilar, et al., 2011).

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado, característica que los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en especies reactivas; de las que se derivan las especies reactivas de oxígeno (ERO), de hierro (ERH), de cobre (ERC) y de nitrógeno (ERN); que pueden dañar al ADN, proteínas transportadoras y otras moléculas circundantes (Dorado, et al., 2003).

Las ERO son las más comunes y dañinas, debido a que la molécula de oxígeno tiene dos electrones no apareados y se vuelve altamente reactivo cuando sufre una reducción secuencial. Dentro de las más frecuentes se encuentra el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que se origina cuando un electrón reduce la molécula de oxígeno. Esta especie química es muy reactiva y muy inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación. Si dos electrones se incorporan a la molécula de O_2 , se forma el ion peróxido (HO_2^-), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este es un compuesto peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y forma aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Adicionalmente, la reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Esta especie es una de las más reactivas que se conocen, y presenta una vida media y un radio de acción muy cortos. Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular origina una molécula de agua (Cayuela, 1998; Svilar, et al., 2011).

c. Radiación ionizante

Los efectos producidos por la radiación dependen de numerosos factores y hay que tener en cuenta las siguientes generalidades: La interacción de la radiación con la célula y/o los componentes celulares ocurre totalmente al azar (Alegre, 2001; Milian *et al.*, 2007).

El daño inducido por radiación en el ADN puede producirse por efecto directo e indirecto. En el primero, la energía se deposita directamente sobre la molécula, expulsando electrones y rompiendo enlaces, mientras que el daño causado por efecto indirecto se da por las especies reactivas producidas por la ionización de otras moléculas circundantes. La mayor parte de este efecto proviene de los iones y/o radicales libres que se originan por la radiólisis del agua, que constituye cerca del 80 % de todos los seres vivos. Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen electrones no apareados en la capa de valencia más externa, por lo que pueden oxidar o reducir otras moléculas biológicas. Los radicales más reactivos son: $\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{O}_2\cdot$ y $\text{H}\cdot$, los tres primeros son oxidantes y el último es reductor (Asaithamby y Chen, 2011).

Los daños producidos en el ADN por estas especies son principalmente la ruptura del esqueleto del azúcar-fosfato de una o de ambas cadenas, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) o la formación de uniones cruzadas (*cross-links*) ADN-ADN o ADN proteína. Otro de los daños generados son los sitios AP (apurínicos o apirimidínicos), que son consecuencia de la reacción de los $\text{OH}\cdot$ con los carbonos de la desoxirribosa o la ruptura del enlace N-glucosídico. Finalmente, estos daños dan como resultado rupturas tanto de una como de las dos cadenas del ADN (Zharcov, 2008).

d. Luz UV

De la radiación no ionizante, la única que produce un efecto sobre las moléculas de importancia biológica, es la radiación UV, que si bien no posee la energía suficiente para expulsar electrones de la molécula, si confiere la energía suficiente para excitarlos, con lo que pasan a un nivel de energía más alto y como consecuencia son más reactivos (Hironobu, 2001; Ahmad, et al. 2011).

La radiación UV es responsable de una amplia gama de efectos biológicos como la alteración de proteínas, de DNA y de la reducción del crecimiento y división celular (Rajesh, et al. 2010). Las lesiones producidas por la luz UV más comunes sobre el DNA son los dímeros de pirimidina (o anillos de ciclobutano) y los fotoproductos 6-4 (pirimidín-pirimidón), que de no ser reparadas pueden provocar mutaciones e incluso muerte celular (Rajesh et al. 2010; Young-Hyun et al. 2001; Alcántara et al. 2004). La formación de los dímeros se origina entre dos pirimidinas adyacentes, que por la reacción de los enlaces covalentes entre sus carbonos 5 y 6 provoca la formación de un anillo de ciclobutano, que da como un resultado un abultamiento en la cadena de DNA, causando el bloqueo de la replicación (Yong et al. 2009; Hironobu y Ono, 2001). Por

su parte, los fotoproductos 6-4 pirimidin-pirimidon, se refieren a la formación de una estructura no cíclica entre los carbonos 4' y 6', lo que da origen a torceduras en el DNA provocando mutaciones (Scrima et al. 2008).

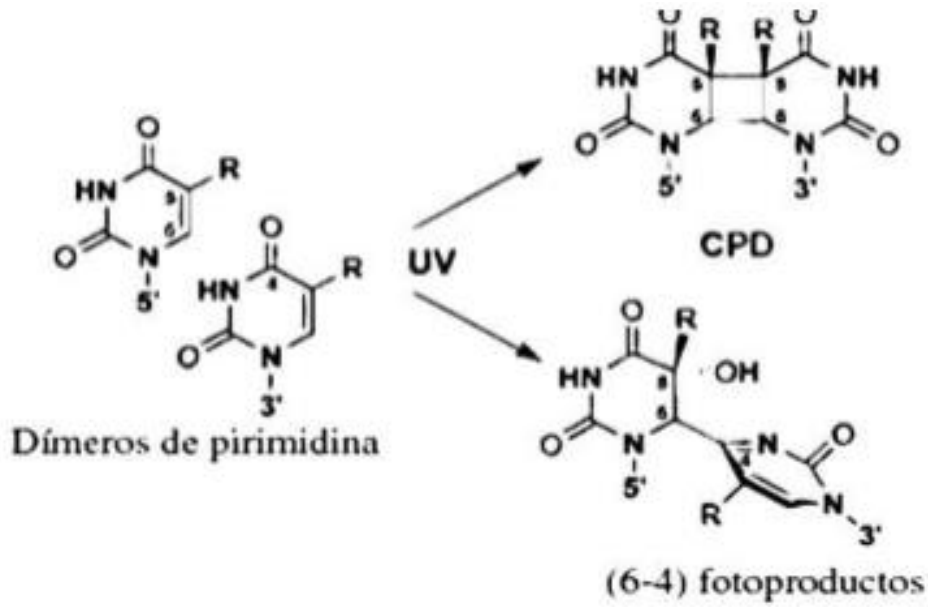


Fig. 8 productos formados por luz UV

1.4. Mecanismos de reparación

A lo largo la evolución, los seres vivos han desarrollado diferentes mecanismos de reparación para mantener la integridad del ADN, que les permite eliminar o tolerar daños en su material genético (Maddukuri *et al.*, 2007; Krwawicz *et al.*, 2007).

Estos mecanismos se pueden clasificar como *site-specific* (como la fotorreactivación y la que resulta de la actividad de las alquiltransferasas), que actúan sobre un tipo específico de daño, reparándolo en un solo paso, o inespecíficos (como la reparación por escisión, la reparación por recombinación, etc.), que reconocen diferentes tipos de daños y en los que el proceso es generalmente más complejo (Jena, 2012; Lavrik, 2011). Por otro lado, existen también sistemas más complejos como la respuesta SOS, la respuesta al choque térmico o la respuesta al estrés oxidante, en los que se desencadena la expresión de un conjunto de genes que se encargan de

reparar el daño en el ADN y conferir más oportunidades a la célula de sobreponerse y sobrevivir bajo condiciones de estrés (Serment-Guerrero *et al.* 2005).

- Mecanismo de reparación específicos

- Fotorreactivación

El proceso de fotorreactivación se ha definido como la reversión de los efectos de la radiación UV en organismos expuestos a esta. Para que se lleve a cabo este proceso es necesaria la presencia de la enzima DNA fotoliasa, que se une específicamente a los dímeros de pirimidina o anillos de ciclobutano. Esta enzima tiene un cofactor que absorbe la energía de la luz visible (espectro azul) y la transfiere a un cofactor catalítico, que a su vez transfiere la energía en forma de electrón con el fin de escindir el anillo de ciclobutano y restaurar directamente la estructura original de las bases (Kumiko *et al.* 2002 Voet *et al.*, 2007 Rajesh *et al.* 2010).

-Alquil-transferasas

Una de las maneras en que se repara el daño en el DNA por alquilación es a través de la reversión de la metilación de las bases mediante proteínas alquiltransferasas que capturan un grupo alquilo (normalmente metilo) del DNA en su cadena polipeptídica, restaurando así la estructura del DNA en un solo paso. Por ejemplo las oxoguaninas (O6-metilguanina y O6-etilguanina) son reparadas por la O6alquilguanina-DNA-alquiltransferasa, que transfiere en forma directa el grupo metilo o etilo que causa el daño al grupo tiol de uno de sus propios residuos de cisteína; lo que inactiva a la proteína (Tubbs y Tainer, 2010; Jadwiga y Grzesiuk, 2007; Voet *et al.* 2007). Las alquiltransferasas reparan los daños por alquilación, transfiriendo el grupo alquilo, normalmente metilo, del ADN a su propia cadena polipeptídica.

-Reparación por escisión

Los sistemas de reparación por escisión poseen una especificidad muy variable, pero comparten las mismas características generales (Lewin, 1996) Estos mecanismos reparan sitios AP o sitios

con dímeros de pirimidina, aductos, alquilaciones etc.. Involucran la participación de nucleasas, que se encargan de eliminar el daño y dejar un hueco en el DNA que posteriormente rellena una polimerasa de DNA basada en la información de la hebra opuesta. Finalmente una ligasa restablece la continuidad del DNA (Devlin, 2006, Mishra, 2002). Hay dos tipos principales de este tipo de reparación: por escisión de bases y por escisión de nucleótidos (Devlin, 2006).

-Reparación por escisión de bases (REB)

Una de las lesiones más comunes es la modificación de bases, que son reparadas a través de la reparación por escisión de bases (REB). Este mecanismo se inicia con el reconocimiento y corte de la base dañada por una glucosidasa específica, que hidroliza el enlace N-glucosídico que une a la base con el azúcar-fosfato, lo que da como resultado la generación de un sitio AP, que es un sustrato para las AP endonucleasas. Estas enzimas hidrolizan el enlace fosfodiéster casi inmediatamente en el extremo 5' del sitio AP (Zharkov, 2008; Buchko, et al. 2002). Si bien algunas glucosidasas bifuncionales son también capaces de cortar sitios AP, lo hacen por eliminación de su extremo 3'-fosfato. Esta diferencia define el primer punto de ramificación de la reparación por escisión de bases: las AP endonucleasas producen un extremo 3'-OH que puede servir como sustrato para una DNA polimerasa, albergando en el extremo 5' el fragmento del desoxinucleótido dañado, que debe ser cortado antes de que se complete la reparación; mientras que las AP liasas producen un extremo 5' sin modificar y obstruyen el extremo 3'. El corte de los extremos modificados se lleva a cabo por diferentes enzimas, dependiendo si el residuo de azúcar abásico es removido desde el extremo 5' o 3'. Después de los tres pasos de la escisión del desoxinucleótido, una exonucleasa de cadena sencilla se encarga de formar un hueco que posteriormente es llenado por una DNA polimerasa y sellado por una DNA ligasa (Belov, 2011, Tronov, et al. 2002; David, et al. 2007). Este mecanismo se caracteriza por la baja probabilidad de errores y por la duración corta de los huecos, (Serment-Guerrero et al., 2005).

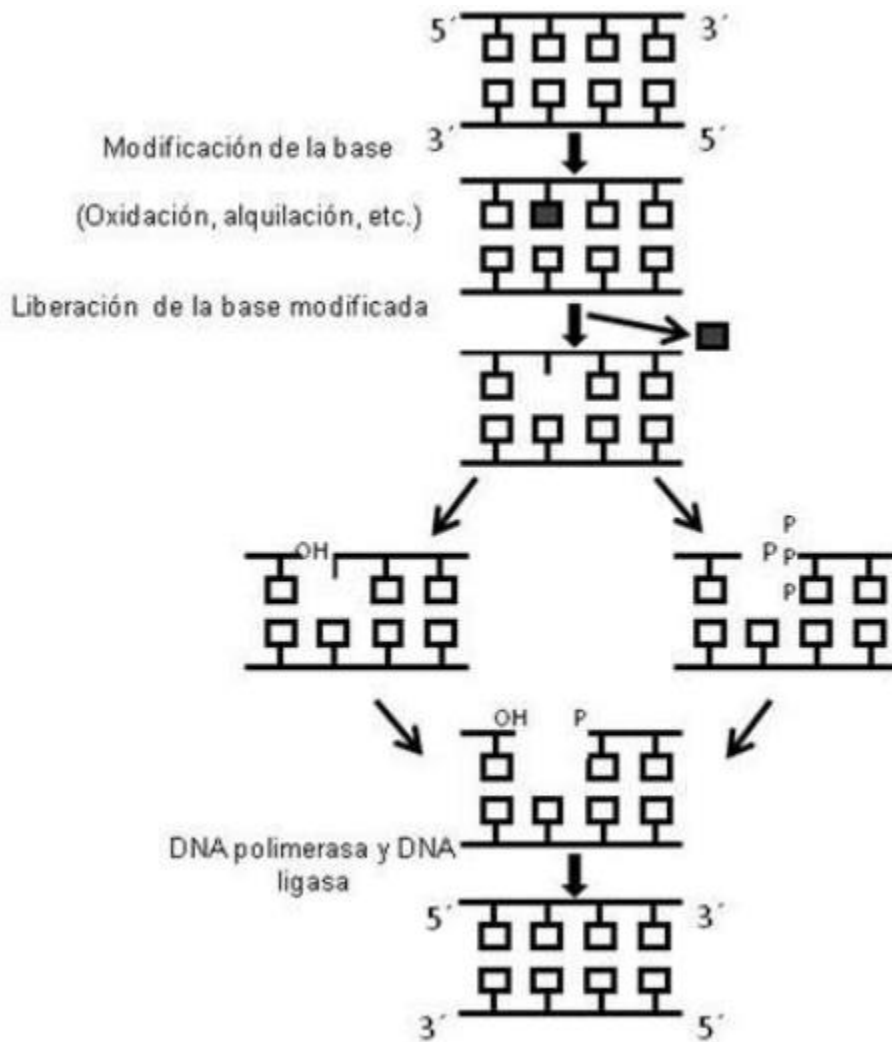


Fig. 9 Reparación por escisión de bases

-Reparación por escisión de nucleótidos (REN)

Este mecanismo de reparación se caracteriza por reconocer una amplia gama de lesiones, como son los dímeros de pirimidina, fotoproductos, aductos, etc., (Tronov et al. 2001). El mejor ejemplo de este mecanismo, es el de los dímeros de pirimidina, que como ya se mencionó son el producto principal de las lesiones por luz UV. En *E. coli*, un complejo de escisión que incluye a las proteínas; UvrA, UvrB y UvrC, reconoce el daño y realiza dos cortes, uno de entre 3 a 5 nucleótidos más abajo y el otro 8 nucleótidos más arriba del dímero, que se elimina como parte de un oligonucleótido de entre 12 y 13 nucleótidos de longitud. El proceso comienza con el reconocimiento de la lesión por UvrA que se une al DNA; entonces UvrB (una helicasa) se

encarga de abrir las hebras del DNA y de desprender a UvrA. A continuación se une UvrC, que cataliza el enlace fosfodiéster de ambos lados de la lesión; finalmente la helicasa UvrD ayuda a la liberación del oligonucleótido correspondiente. Posteriormente una DNA polimerasa (Pol I) llena el hueco, (Fei et al. 2011; Scott and Waters, 1997).

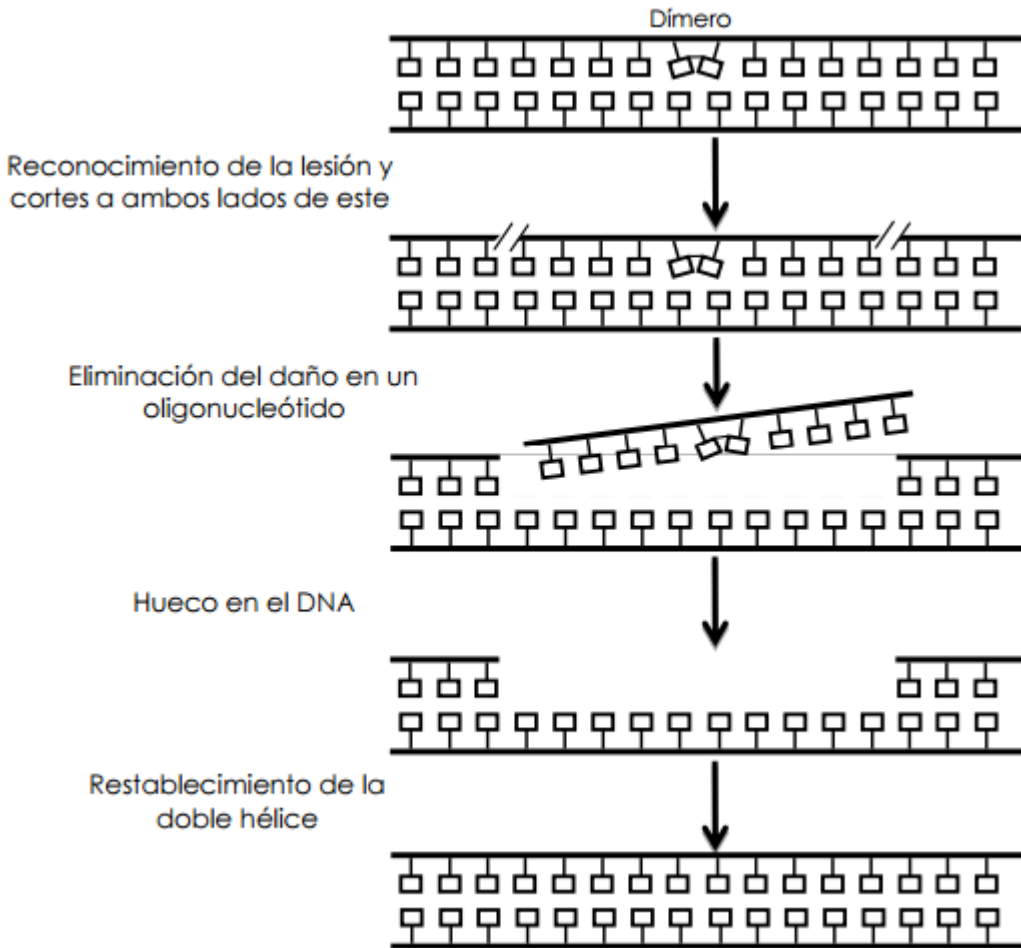


Fig. 10 reparación por escisión de nucleótidos

-Reparación por recombinación

La recombinación homóloga se describió en *Escherichia coli* desde 1940, es una vía que hace uso de DNA homólogo intacto, que sirve como molde para la replicación (Lavrik, 2011; Young, et al. 2003).

Se han descrito dos vías distintas de reparación por recombinación: la vía RecBCD, la cual se encarga de reparar rupturas dobles, y la vía RecFOR; sin embargo ambas vías son dependientes del gen RecA y se diferencian en que la vía RecBCD inicia la recombinación en los sitios Chi (secuencia específica de reconocimiento 5'GCTGGTGG, llamada así por sus siglas en inglés Crossover Hotspot Instigator.) dispersos por el genoma y RecFOR ayuda a la formación del filamento de RecA con el DNA y al desmontaje de la proteína SSB (Sakai y Cox, 2009).

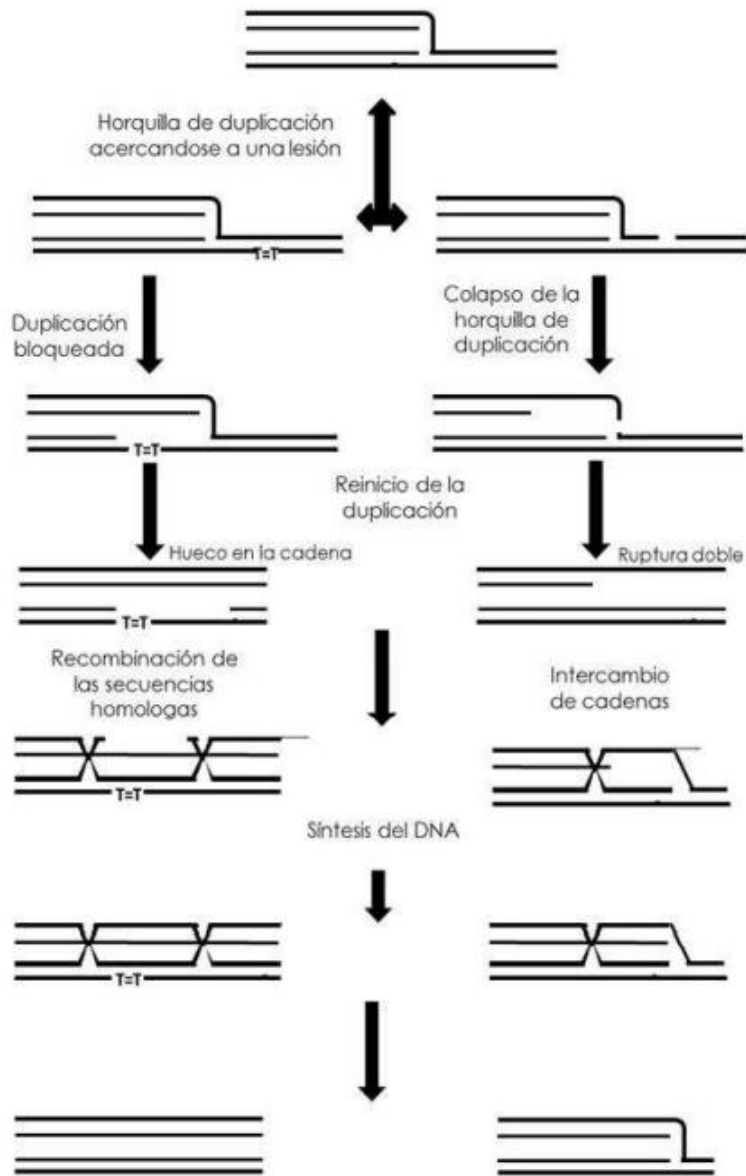


Fig. 11 Reparación por recombinación homóloga

- Vía RecBCD

RecBCD es un complejo proteico multifuncional que consta de tres subunidades, RecB, RecC y RecD. Este complejo, posee distintas actividades: nucleasa, helicasa y ATPasa, además de que es responsable de la reparación de rupturas dobles en el cromosoma bacteriano (Jang, et al. 2012). Cuando hay una ruptura doble en el DNA, RecBCD se une a ella y empieza a degradar uno de los extremos rotos en dirección 3'-5', hasta encontrar un sitio Chi. A partir de este punto la subunidad RecD se inactiva y RecBC comienza a funcionar como helicasa, separando las dos hebras del DNA; además facilita la polimerización de RecA sobre el extremo 3'. De esta manera RecA lleva a cabo el intercambio simultáneo de dicha hebra con la secuencia homóloga de una molécula intacta, de modo que se recupera la información de DNA por medio de la polimerasa (Young, et al. 2003; Jang et al. 2012).

- Vía RecFOR

Se encarga principalmente de reparar los huecos de DNA que son generados cuando la horquilla de replicación encuentra lesiones en el DNA (Cox, 1998). La función de las proteínas RecFOR es modular el ensamble de RecA en el hueco de cadena sencilla, donde RecFR limita la extensión de RecA en el DNA dúplex después del ensamblaje inicial en la hebra de DNA de cadena sencilla; mientras que RecOR ayuda al DNA, a tener acceso a la proteína RecA bloqueada por la presencia de la proteína SSB (proteína estabilizadora de rupturas de DNA). Los tres juntos son necesarios para unir RecA, cuando SSB ha cubierto los huecos en el DNA de cadena sencilla (Maxwell, et al. 2005).

-Reparación metil-dirigida de disparidades de bases (MMR)

Este es un sistema de reparación que contribuye a mantener la estabilidad del genoma a través de la corrección de los pares de bases mal apareadas, que resultan de errores de la polimerasa durante la replicación del DNA. Normalmente la actividad correctora de la exonucleasa asociada a las polimerasas evita, las bases mal apareadas pero si esto no ocurre, dichas disparidades se tienen que eliminar antes de la siguiente replicación, de otra forma habría una mutación. En E.

coli existe un grupo de genes llamados Mut, que están implicados en la eliminación de estos desapareamientos (Fukui, 2010).

La reparación por disparidades de bases o MMR (mismatch repair), reconoce a la hebra recién sintetizada por las metilaciones periódicas. El mecanismo se inicia por el reconocimiento de MutS de una base mal apareada, después, MutL ayuda a la unión de MutS con la endonucleasa MutH. Una vez formado el complejo MutHLS con el DNA, se realizan cortes en las secuencias GATC que no está metilada (que es por ende la que se acaba de sintetizar) a ambos lados de la disparidad; se retira el tramo con ayuda de una exonucleasa y la polimerasa I resintetiza el DNA. Finalmente la proteína Dam metila el DNA ya reparado (Trovo et al., 2002).

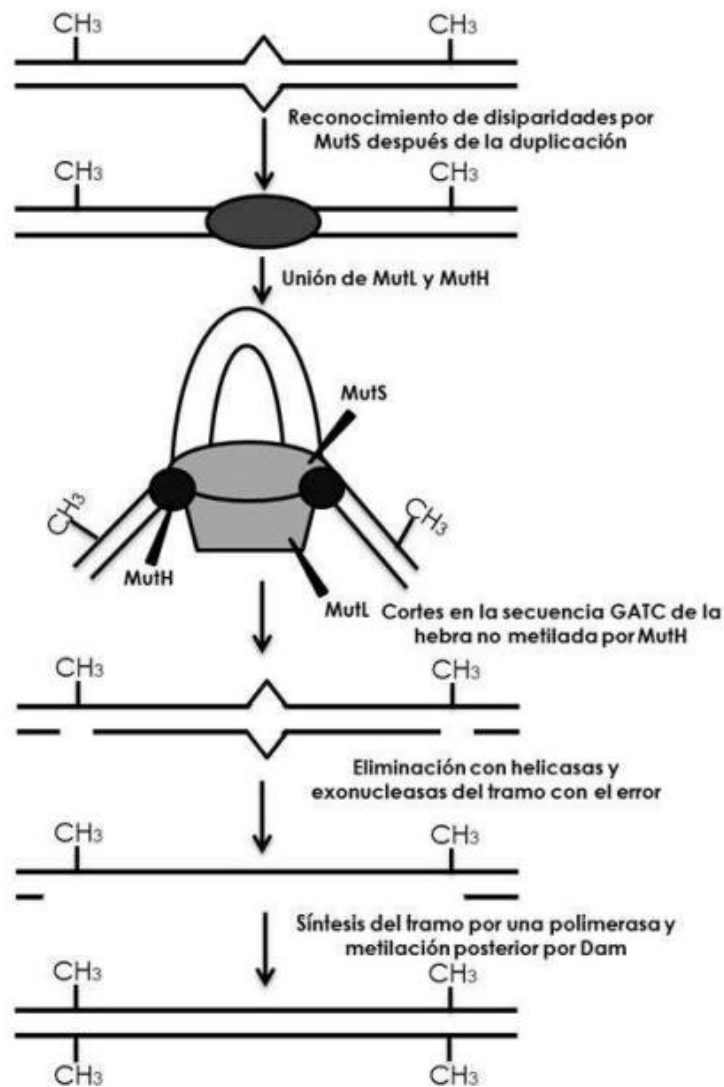


Fig. 12 reparación por disparidades de bases

1.5. Respuesta SOS

El descubrimiento de la respuesta SOS se originó por las observaciones de Weigle (1953) quien observó que al infectar *E. coli* previamente expuesta a luz UV con el bacteriófago lambda inactivado también con UV, aumentaba la supervivencia del mismo con respecto a la infección del huésped sin irradiar. A este fenómeno se le conoce como reactivación de Weigle y posteriormente, Radman (1975) observó que se producían otras manifestaciones tales como la filamentación celular y el aumento en la frecuencia de mutación. Estas observaciones lo llevaron a concluir que en *Escherichia coli* existía un sistema de reparación que se induce cuando el ADN es severamente dañado y su síntesis es detenida, por lo que la llamó “Respuesta SOS”, ya que pensaba que se trataba de la última posibilidad de las células para sobrevivir. Más tarde, Little y colaboradores (1980, 1982) demostraron que RecA y LexA regulan esta respuesta y con base en esto, elaboraron el modelo de regulación vigente hasta ahora (Serment, 2005; Janion, 2008). Este sistema está regulado tanto por el represor LexA como por la proteína RecA y su función principal es la reiniciación de la replicación del ADN, antes de que la célula muera. Los genes que constituyen la Respuesta SOS son inducidos rápidamente y participan en la reparación del ADN tanto libre de errores como mutagénica, incluyendo la reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por recombinación y síntesis translesión (Patel, et al. 2010)

A continuación se describe el modelo de inducción de la respuesta SOS: en ausencia de lesiones en el ADN, los genes SOS tienen el represor LexA unido a la secuencia consenso TATCGATATA-A-ACAGTA presente en su región promotora, que se denomina “caja SOS” reprimiendo su transcripción. Sin embargo, aún en esta situación algunos de los genes del sistema presentan una expresión basal suficiente para cumplir funciones vitales para la célula.

Cuando se producen lesiones en el ADN o se bloquea su replicación, se presenta una acumulación de ADN de cadena sencilla, que es el sustrato que activa la inducción de la respuesta con el consiguiente aumento de la expresión de los genes SOS. Dicha inducción se inicia cuando RecA forma filamentos sobre el ADN de cadena sencilla, iniciando una cascada de reacciones que da lugar a la activación de la proteína RecA como coproteasa (RecA*) que ayuda a la degradación del represor LexA mediante la ruptura del enlace peptídico Ala-84-Gly-85, liberando los operadores del sistema y trayendo consigo la expresión de los genes SOS.

Un aspecto importante de la respuesta SOS es que su actividad se puede regular de acuerdo al grado de daño infligido sobre el material genético (Serment, *et al.* 2005).

Finalmente, cuando se repara la lesión, el sistema recupera su estado inicial y con ello desaparece la señal de inducción, RecA vuelve a su estado basal y LexA vuelve a unirse a la caja SOS reprimiendo nuevamente el sistema.

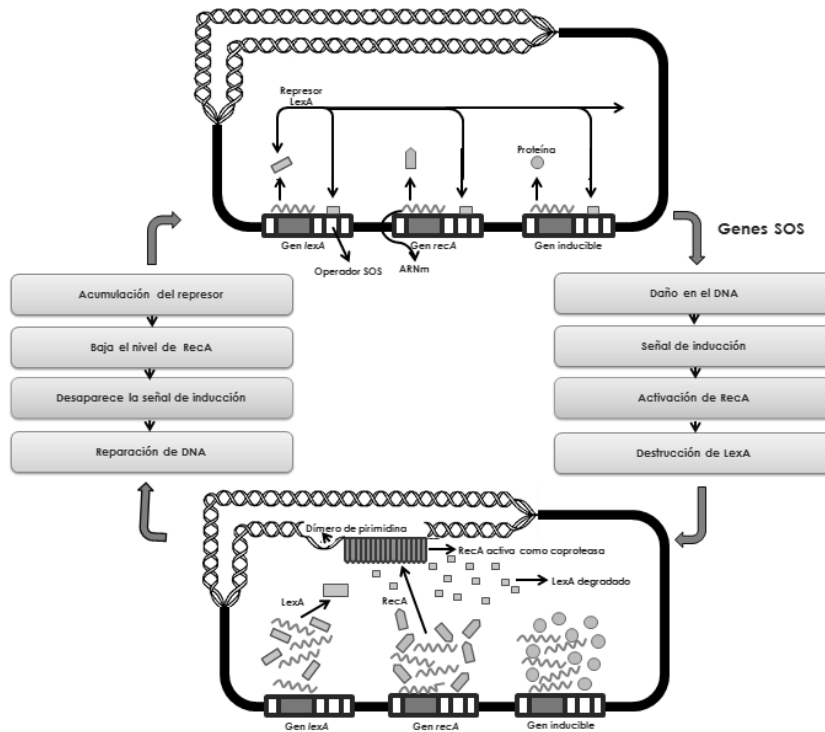


Fig. 13 Modelo vigente de la respuesta SOS (fuente Serment, 2008)

No sólo las proteínas LexA y RecA participan en la inducción de la respuesta SOS, otras enzimas, como los productos de los genes RecFOR participan también al ayudar a la formación de la unión de la proteína RecA con el ADN de cadena sencilla, intensificando la inducción SOS (Sakai y Cox, 2009).

Genes *xonA*, *recJ*, *recQ* y *xthA*

- *xonA* y *recJ*

Estos genes codifican para exonucleasas que se encargan de hidrolizar enlaces fosfodiéster de la molécula de ADN. La exonucleasa I (ExoI), codificada por el gen *xonA*, forma parte de una red de proteínas de replicación y reparación que interactúan con la proteína SSB. Hidroliza

paulatinamente ADN de cadena sencilla empezando por el extremo 3'-hidroxilo, formando desoxirribonucleotidos 5'-monofosfato; mientras que la exonucleasa RecJ degrada ADN de cadena sencilla en dirección 5'-3' (Mishra, 2002).

Se ha reportado que las exonucleasas (RecJ y ExoI), intervienen en el reconocimiento de rupturas dobles, procesando extremos dispares que no pudiera reconocer la enzima RecBCD (exonucleasa que reconoce ruptura de doble cadena), como en el caso de la aparición de cortes o huecos, extendiendo las regiones de ADN de banda sencilla para que se puedan reparar y reactivar. Se ha propuesto también que intervienen en la reactivación por regresión de la horquilla, de modo que las deficiencias en estos genes retardan el crecimiento celular (Cox 2001). Por otro lado, también se ha reportado que ambas exonucleasas se requieren para procesar lesiones producidas por agentes externos como la radiación gamma, dando lugar a la activación de la respuesta SOS.

- *recQ*

El gen *recQ* codifica para una helicasa, que es una enzima que usa la energía liberada de la hidrólisis de ATP para separar las cadenas complementarias de la molécula de ADN y es esencial en procesos tales como la reparación, replicación, recombinación y transcripción. Muestra una orientación específica al ADN de cadena sencilla y puede actuar en dirección 3'-5' o 5'-3' (Tuteja, 2004; Caruthers, 2002).

En los últimos años, se ha demostrado el papel esencial que juegan las DNA helicasas en el mecanismo molecular de la recombinación homóloga (Van Brabant, *et al.*, 2000).

En *Escherichia coli*, la eliminación del gen *recQ* produce una reducción significativa de la frecuencia de recombinación y un aumento en la sensibilidad a la irradiación por luz UV (Sharma, 2011).

- *xthA*

Este gen codifica para una endonucleasa AP que participa en el mecanismo de reparación por escisión de bases, el cual se encarga principalmente de eliminar lesiones oxidativas causadas por agentes alquilantes u oxidantes. Este mecanismo se inicia con el reconocimiento y corte de la base dañada por una glucosidasa específica, que hidroliza el enlace N-glucosídico que conecta a la base con el azúcar-fosfato, lo que da como resultado la generación de un sitio apurínico/apirimínico (AP), que es un sustrato para las AP endonucleasas (*xthA* o *nfo*) hidrolizando

el enlace fosfodiéster. Se sabe que el 90% de las funciones de endonucleasa AP son llevadas a cabo por el gen *xthA* (Zharkov, 2008; Buchko, et al. 2002; Tronov, et al. 2002).

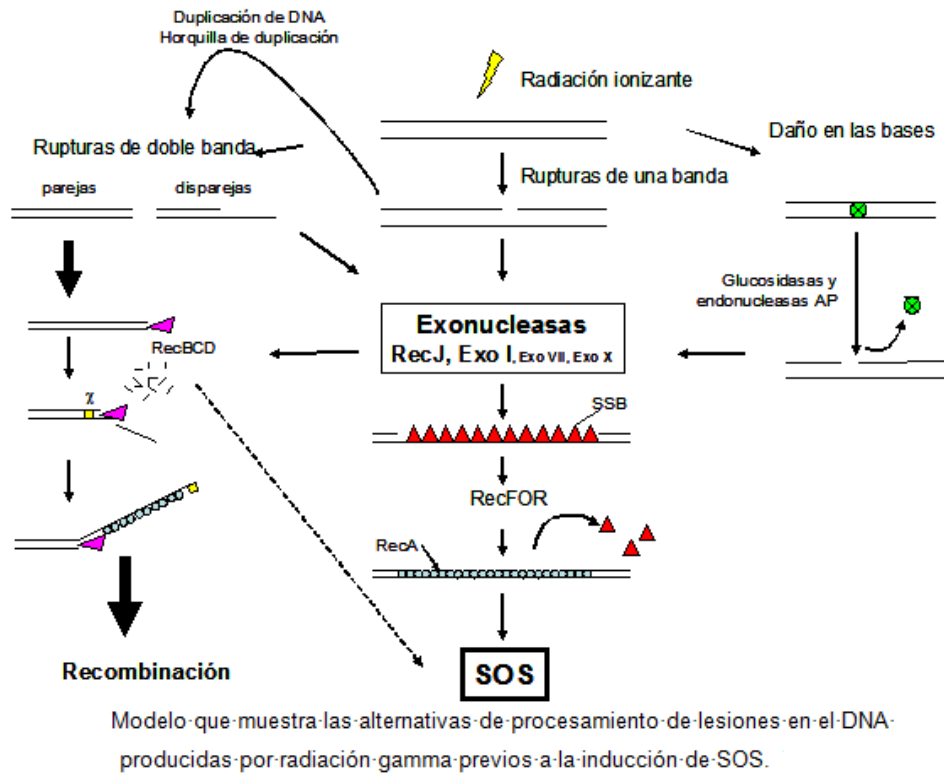
Justificación

De acuerdo a lo descrito, la respuesta SOS está conformada por aproximadamente 60 genes de defensa que al activarse, confiere mayores oportunidades de sobrevivir a la célula cuando el material genético ha sido dañado. Durante algún tiempo se pensó que cualquier alteración en el ADN podía activar dicha respuesta, sin embargo, las investigaciones posteriores han demostrado que sólo es necesaria la presencia de ADN de cadena sencilla, a la que RecA se une, dando inicio a la inducción del sistema.

De esta forma es importante explorar los pasos que ocurren desde que se produce la lesión primaria (o el cambio químico) en el ADN hasta que se activa la respuesta SOS, así como los genes que participan durante este proceso. Desde los primeros trabajos, se encontró que el gen *recO* está involucrado en los procesos previos a la activación de SOS, como parte de un complejo con los productos de los genes *recF* y *recR*. Se ha reportado que el complejo RecFOR se encarga de desplazar a la proteína SSB que se encuentra unida a regiones de ADN de cadena sencilla y promueve la entrada de RecA (Patel, *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que los genes *xonA* y *recB*, que codifican exonucleasas de ADN, también participan en la formación de ADN de cadena sencilla a partir de lesiones inducidas en la molécula, ya que la activación de la respuesta SOS, es drásticamente más baja en mutantes en esos genes, en comparación con una cepa silvestre (Viswantan y Lovett, 1999).

Con base en trabajos previos realizados con cepas defectuosas en diferentes exonucleasas de ADN de cadena sencilla, Serment y colaboradores (2008) propusieron un modelo que pretende explicar el procesamiento de las lesiones producidas por radiación gamma que provoca la activación de la respuesta SOS.



Fuente (Serment, 2008)

El objetivo del presente trabajo es conocer la participación de los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ* en los procesos previos a la activación del sistema SOS, para corroborar o corregir dicho modelo, mediante daños producidos por agentes alquilantes y oxidantes.

2. Hipótesis

La exposición de *Escherichia coli* a diferentes agentes genotóxicos (agentes alquilantes y oxidantes) producirá diversos tipos de lesiones en el ADN. Al estar ausentes los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ* se espera que el nivel de activación de la respuesta SOS sea diferente (disminuya o aumente) debido a la participación de estos genes en los procesos previos a la inducción de la respuesta.

3. Objetivos

a. General

Evaluar el papel que juegan las lesiones producidas por diferentes agentes genotóxicos (agentes alquilantes y oxidantes) mediante la participación de los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ*, en la activación de la respuesta SOS.

b. Específicos

1. Construir cepas de *Escherichia coli* con defectos en los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ*, y evaluar su supervivencia después de la exposición a agentes genotóxicos.
2. Evaluar la participación de los genes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ* en la inducción de la respuesta SOS ante daños producidos por agentes genotóxicos, mediante el cromosoma.

4. Materiales y métodos

4.1. Requerimientos

Se empleará un termociclador para la construcción de los cassettes de eliminación y una cámara de electroforesis. También se hará uso de un electroporador para transformar las células bacterianas por medio de un choque térmico. Para los experimentos posteriores se utilizará una incubadora con agitación, un espectrofotómetro, una centrifuga, un contador de colonias y un refrigerador; además del material básico de laboratorio como mechero, asas bacteriológicas, pipetas de 1, 5 y 10 ml, tubos de ensayo, cajas petri y placas de cultivo.

4.2. Construcción de cepas mutantes *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ*

Se construyeron mutantes con deleciones en *xthA*, *xonA*, *recJ* y *recQ*, para ello se utilizó la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2002). Brevemente, se usó un plásmido como molde y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para construir los “cassetes de eliminación” que en medio tienen el gen que confiere resistencia al antibiótico (tetraciclina o kanamicina) y en los extremos regiones de 40 bases con secuencias homologas que flanquean el gen en cuestión en el cromosoma bacteriano. Una vez obtenidos los cassetes, se transformaron por electroporación células competentes de una cepa receptora BW25113 que tiene un plásmido que expresa los genes del sistema de recombinación *red/gam* de lambda, de modo que al entrar ADN lineal de doble hebra reconozca su región homologa y se integre por recombinación al cromosoma, sustituyendo al gen blanco, en este caso *xthA*, *xonA*, *recJ*, y *recQ*, por el de la resistencia al antibiótico, como describe Chung *et al.* (1989).

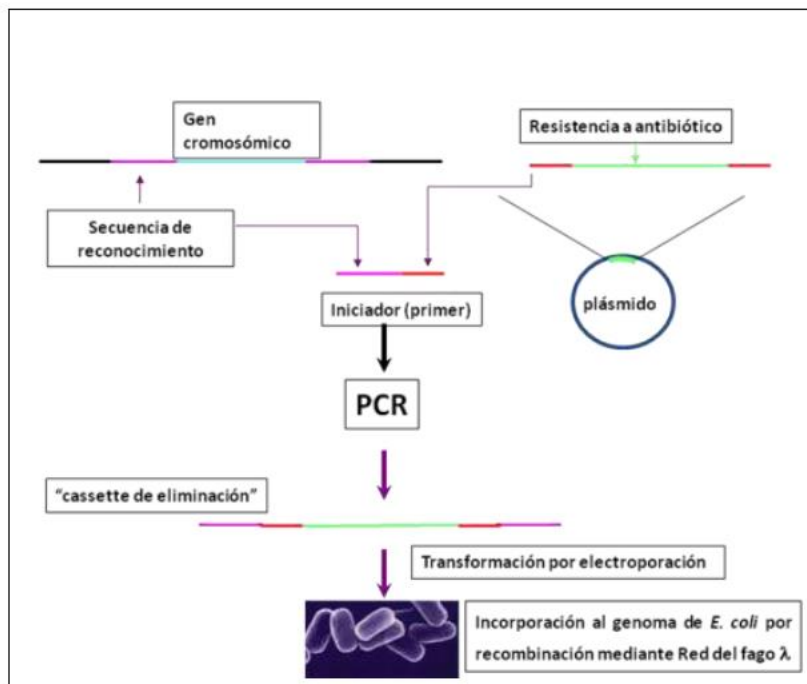


Fig. 14 Construcción de cepas

Una vez obtenidas las cepas se utilizó la técnica de transducción general mediante el fago P1, para transferir el defecto de *xthA*, *recO*, *recJ* y *xonA* a la cepa PQ30, ya existente en el

laboratorio, que tiene los marcadores *lacZ* fusionado a *sula* (gen perteneciente a la vía SOS) necesarios para el cromoenayo. Se probará de manera cualitativa la sensibilidad al antibiótico de los presuntos transductantes para seleccionar los más adecuados.

Transducción

- Preparación del lisado del fago P1

Se sembró cada cepa obtenida de la transformación: BW25113 *xthA::km*, BW25113 *recJ::tc*, BW25113 *xonA::tc* en medio líquido LB (luria Bertani) adicionado con antibiótico (kanamicina o tetraciclina, según sea el caso), y se incubó por 24 horas. Posteriormente, se tomaron 0.2 ml del cultivo anterior en un matraz erlenmeyer, agregándole 0.05 ml de CaCl 1M, 0.05 ml de glucosa al 30% y 10 ml de medio líquido LB, esta mezcla se incubó por una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se tomó 0.1 ml del cultivo anterior y se le adicionó 0.1 ml del fago P1 (preparado a partir de *E. coli* C600 a una concentración de 4×10^9), incubándose con agitación por periodos de 30 minutos, hasta que se observó que el medio se había tornado casi transparente, indicio de que se había llevado a cabo la lisis, y se le agregaron 5 gotas de cloroformo. Por último se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm, se colocó en un tubo con rosca estéril, se le adicionaron 5 gotas más de cloroformo como conservador y se guardó en el refrigerador a 4 °C.

- Transducción y aislamiento

La cepa PQ30, se sembró en 10ml de medio líquido LB adicionado con 1mg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C con agitación durante 18 horas. Una vez obtenido el cultivo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min., se desechó el sobrenadante y al botón celular, se le agregaron 2 ml de solución MC ($MgSO_4$ 0.1 M, 9 ml de agua estéril, 0.05 ml de $CaCl_2$ 1M) y se incubó por una hora; ya transcurrido este tiempo se tomó 0.1 ml de esta suspensión en un tubo de ensaye, al cual se le adicionó además 0.1 ml del fago P1 obtenido anteriormente de cada cepa, 0.9 ml de $MgSO_4$ 0.1 M y se incubó por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se le agregaron 0.2 ml de citrato de sodio 1M y 0.2 ml de medio 2YT y se incubó nuevamente durante 2 horas, para permitir la expresión de los genes de resistencia. Finalmente, se tomó 0.1 ml de este cultivo y se sembró en medio sólido LB con 1mg/ml de ampicilina y 1mg/ml de kanamicina o tetraciclina y se incubó durante 24 horas.

4.3. Exposición a agentes alquilantes y oxidantes

Una vez obtenidas las cepas PQ30 *xthA::amp/km*, PQ30 *recJ::amp/tc* PQ30 *xonA::amp/tc*, se expusieron a distintas concentraciones de agentes alquilantes (etil metano sulfonato, metil metano sulfonato y mitomicina C) y agentes oxidantes (Hidróxido de terbutilo y peróxido de hidrogeno).

Se sembró una colonia de bacterias en 2 ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes (ampicilina/kanamicina o ampicilina/tetraciclina) y se incubó durante toda la noche. De este cultivo se tomó una alícuota y se diluyó en LB líquido (1:50), se incubó con agitación constante a 37°C hasta alcanzar una concentración de 2×10^8 bacterias ($A_{600} = 0.5$). Se centrifugó el cultivo y se desechó el sobrenadante, mientras que el botón celular se resuspendió en buffer de fosfatos 0.02M. Esta suspensión se distribuyó en tubos de ensayo y se expuso a diferentes concentraciones de los agentes alquilantes y oxidantes. Nuevamente se incubó con agitación constante a 37°C por 30 minutos, para permitir la acción de estos genotóxicos.

- Supervivencia

La supervivencia se define como el porcentaje de bacterias que logran recuperarse y dar lugar a una colonia visible al sembrarla en medio de cultivo sólido.

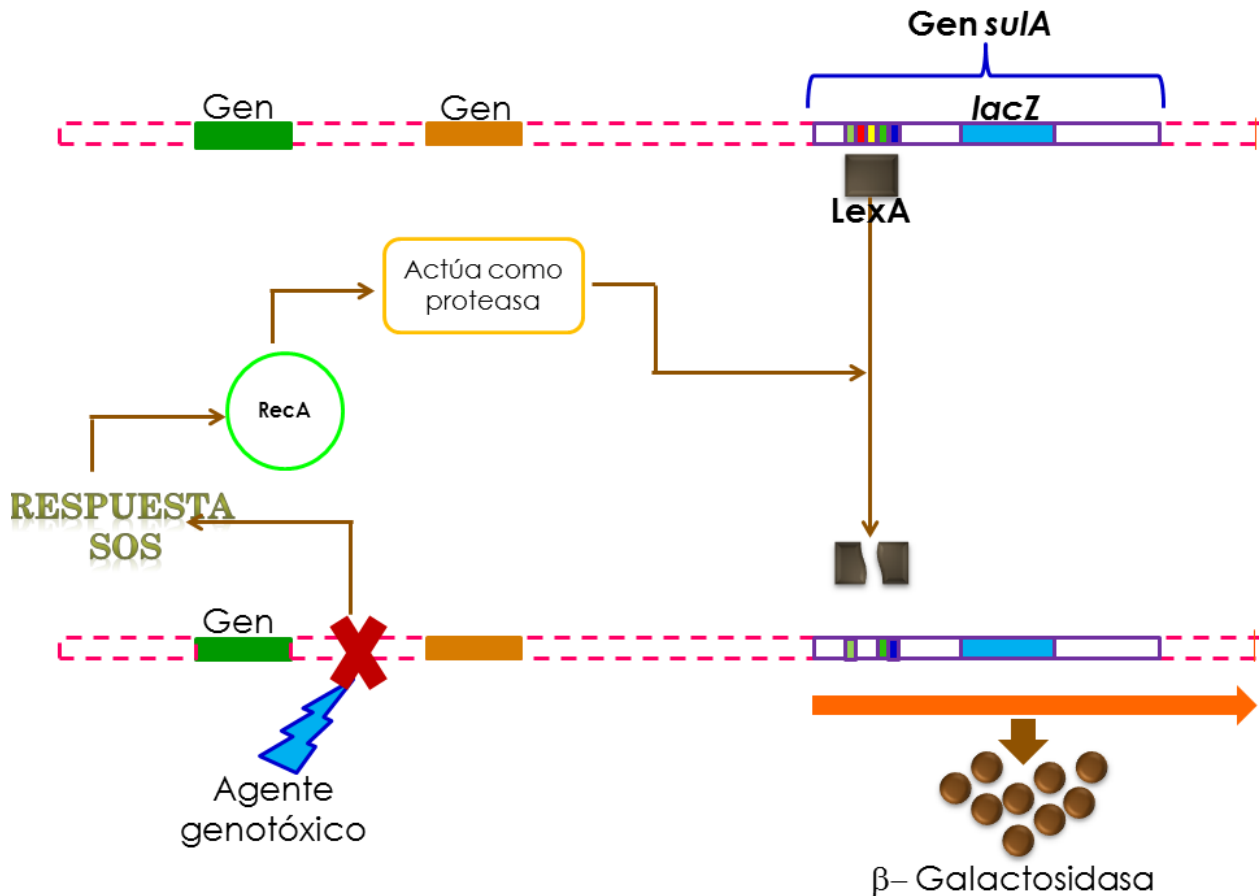
De las bacterias expuestas a los diferentes agentes químicos, se hicieron diferentes diluciones en amortiguador de fosfatos, se sembraron por triplicado en placas de medio LB sólido y se incubaron a 37°C por un periodo de 18-20 horas. Posteriormente se contaron las colonias en cada caja y se calculó el porcentaje de supervivencia tomando como 100% al testigo no expuesto.

- Cromoensayo

Se utilizó la técnica descrita por Quillardet y Hofnung (1985). En las cepas utilizadas en este ensayo el gen *lacZ* (gen que codifica para β -galactosidasa y perteneciente al operón lactosa) está fusionado al el gen *sulA*, que pertenece a la respuesta SOS, por lo que su expresión depende de su activación.

La evaluación de la participación de *xth*, *recO*, *recJ* y *xonA* en la activación de las funciones SOS, se hizo mediante las reacciones de β -galactosidasa y Fosfatasa alcalina, las cuales liberan un color amarillo cuya intensidad es medida por espectrofotometría.

Al igual que en la supervivencia, de un cultivo anterior en líquido, se resembró en LB líquido hasta obtener una concentración de 2×10^8 bacterias ($A_{600} = 0.5$). De este cultivo se tomaron alícuotas de 0.2 ml y se suspendieron en 1.8 ml de LB con los agentes oxidantes y alquilantes a diferentes concentraciones. Se incubó por 1 hora a 37°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo se le agregó a cada tubo 3 gotas de cloroformo para romper la pared celular.



.Fig. 15 Fundamento teórico del cromosoma sintético

Ensayo para β -galactosidasa.

Se preparó una serie de tubos con 2.7 ml de amortiguador B (Na_2HPO_4 0.1M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M, KCl 0.75g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g/l, SDS al 1% y β -mercapto etanol 2.7ml/l, pH7) a cada tubo se le agregaron 0.3 ml de los cultivos obtenidos tras la hora de incubación y 0.5 ml de sustrato ONPG de 4mg/ml (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosas), posteriormente se incubó a 37°C por un tiempo aproximado de 60 minutos, para permitir el desarrollo del color. La reacción se

detuvo agregando 2ml de Na_2CO_3 1M, que inhibe la actividad de la enzima uniéndose al sitio activo e impidiendo que el sustrato se siga degradando.

Ensayo para Fosfatasa alcalina

Al igual que para β -galactosidasa, se preparó una serie de tubos pero ahora con amortiguador P (Tris 1M y SDS 1%, pH 8.8) y como sustrato PNPP (*p*-nitrofenil-fosfato). La reacción se detuvo agregando 1 ml de HCl 2.5 M para inactivar a la enzima (se modifica su estructura tridimensional) y 1 ml de Tris (trishidroximetil-aminometano) para restablecer el pH y el color.

Las lecturas de ambas pruebas se realizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

La determinación de SOS se basa en la intensidad de color, que indica el grado de actividad de ambas enzimas y cuya relación (factor R) se obtiene con la siguiente formula:

$$FR = \frac{A_{420} \cdot \beta\text{-gal} \cdot x \cdot t \cdot f\text{-alc}}{A_{420} \cdot f\text{-alc} \cdot x \cdot t \cdot \beta\text{-gal}}$$

Dónde:

FR: factor R

A_{420} : absorbancia a 420nm

β -gal: β -galactosidasa

f-alc: fosfatasa alcalina

t: tiempo de reacción de cada enzima

El factor de inducción SOS (FI), se calcula al comparar los FR de las muestras tratadas con el testigo:

$$FI = \frac{FR_t}{FR_0}$$

Donde

FR_t : Actividad SOS en irradiados

FR_0 : Actividad SOS en testigos sin irradiar

RESULTADOS

SUPERVIVENCIA

-Mitomicina C

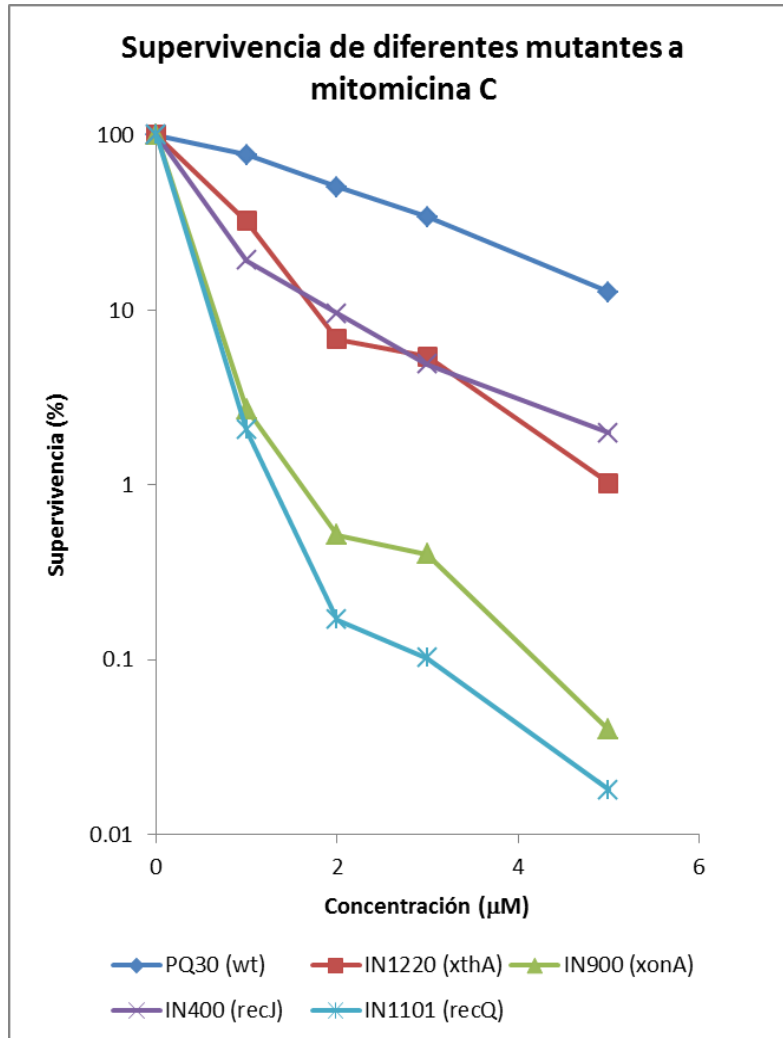


Fig. 16 Supervivencia Mitomicina C

La supervivencia es un evento final, ya que sólo van a crecer aquellas células que fueron capaces sobreponerse a un ambiente de estrés. En la exposición a mitomicina C, los mutantes *xonA* y *recQ* muestran una supervivencia menor que la cepa de silvestre, se sugiere que al estar ausentes estos genes, la célula utiliza todos sus recursos para tolerar el daño, sin embargo, no es suficiente, ya que entre estos mutantes y la cepa silvestre hay una disminución de casi cuatro órdenes de magnitud. Los mutantes *recJ* y *xthA* muestran una supervivencia menor que la cepa

silvestre, casi dos órdenes de magnitud, sugiriendo así que es posible que existan enzimas que puedan ayudar a tolerar el daño.

-Metilmetano sulfonato

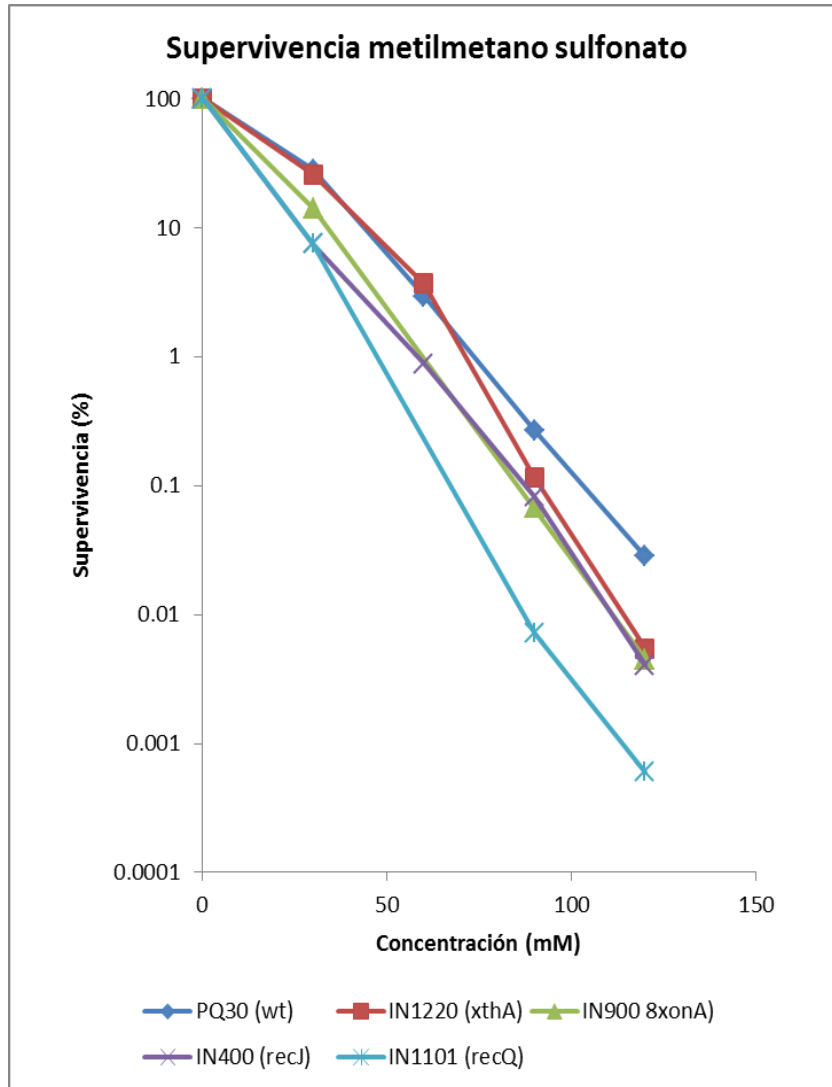


Fig. 17 Supervivencia Metil metano sulfonato

En la exposición a este agente, se puede observar que hay una disminución de supervivencia de los cuatro mutantes y de la cepa silvestre, sugiriendo que es un compuesto tóxico que produce lesiones que van a ser reconocidas por estas enzimas y así permitir la activación de SOS para continuar con su reparación. RecQ, muestra una supervivencia menor, sugiriendo que hay presencia de rupturas de doble cadena.

-Etilmetano sulfonato

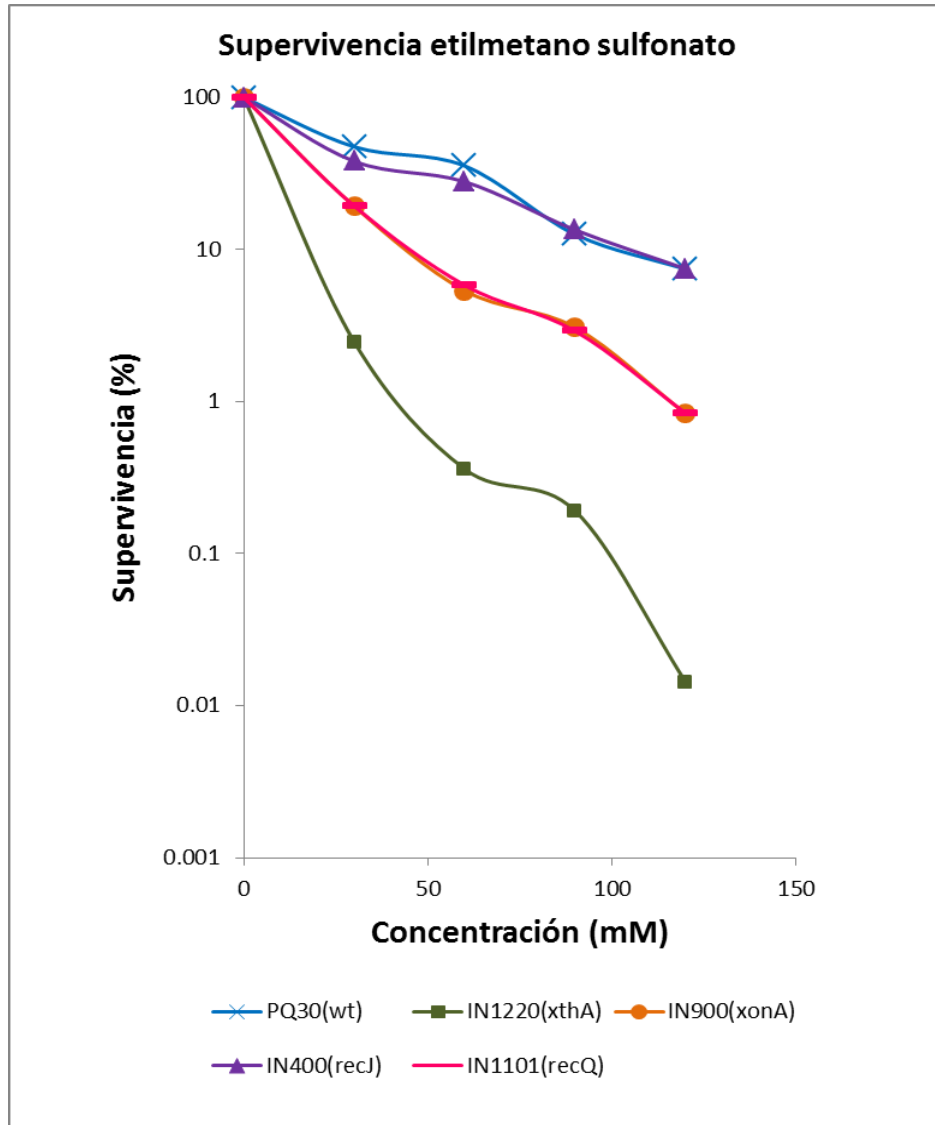


Fig. 18 Supervivencia Etilmetano sulfonato

En la figura se observa que el mutante *xthA* tiene una disminución de casi tres órdenes de magnitud en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo que hay un daño a nivel de bases, ya que al estar ausente la enzima AP, para la cual codifica *xthA*, los sitios AP no van a ser reconocidos, conduciendo así a un colapso de la horquilla de replicación y por ende a muerte celular. Los mutantes *xonA* y *recQ* tienen una disminución de casi dos órdenes de magnitud en comparación con PQ30, sugiriendo que si bien hay una disminución, existen algunas otras glucosidasas que pueden reconocer y procesar el daño, permitiendo así la recuperación de la

célula, mientras que el mutante *recJ* tiene una supervivencia similar a la cepa silvestre, sugiriendo que en su ausencia, esonucleasas como Exo I es suficiente para reconocer y procesar el daño.

-Peróxido de hidrógeno

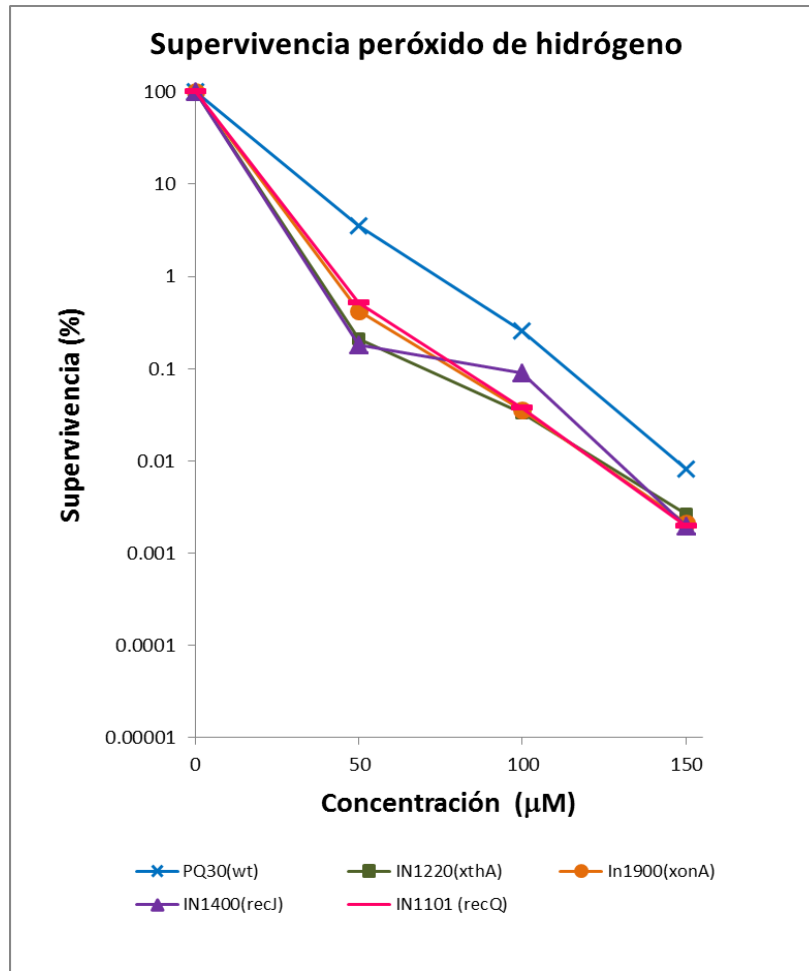


Fig. 19 Supervivencia Peróxido de Hidrógeno

Se puede observar que existe una disminución de la supervivencia de los cuatro mutantes en comparación con la cepa silvestre, estos resultados sugieren que se está produciendo un daño a nivel de bases y de cadena, de manera que al estar ausentes estos genes, no permite a la célula poder tolerar el daño. Es una muestra evidente que el principal mecanismo de reparación involucrado en este tipo de lesiones es la reparación por escisión de bases.

- Hidroperóxido de ter-butilo

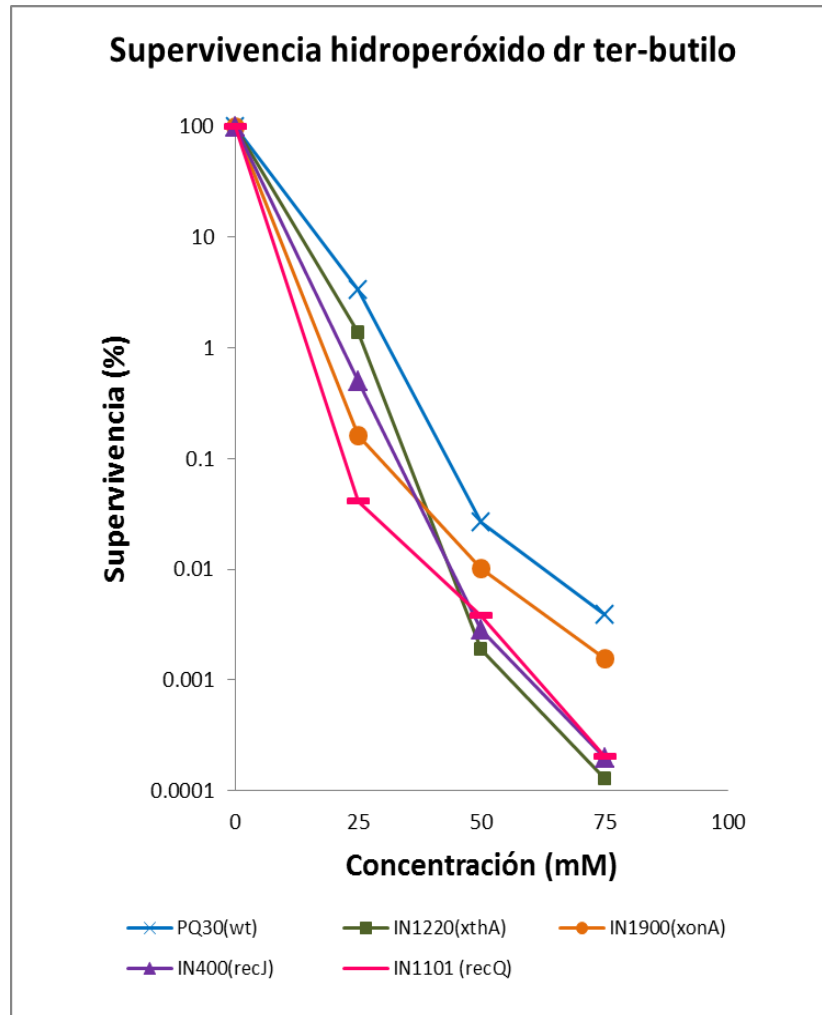


Fig. 20 Supervivencia de Hidroperóxido de ter-butilo

En los resultados obtenidos se observa que los mutantes *xthA*, *recJ* y *recQ* muestran mayor sensibilidad en comparación de la cepa silvestre PQ30, de casi tres órdenes de magnitud, sugiriendo que estos genes están implicados en la reparación de de daños producidos por este agente. Por otra parte, el mutante *xonA*, tiene una sensibilidad muy similar a PQ30, lo que podría indicar que este gen no participa directamente en el procesamiento de estas lesiones producidas, en comparación con los mutantes anteriores.

- Cromoensayo

-Mitomicina C

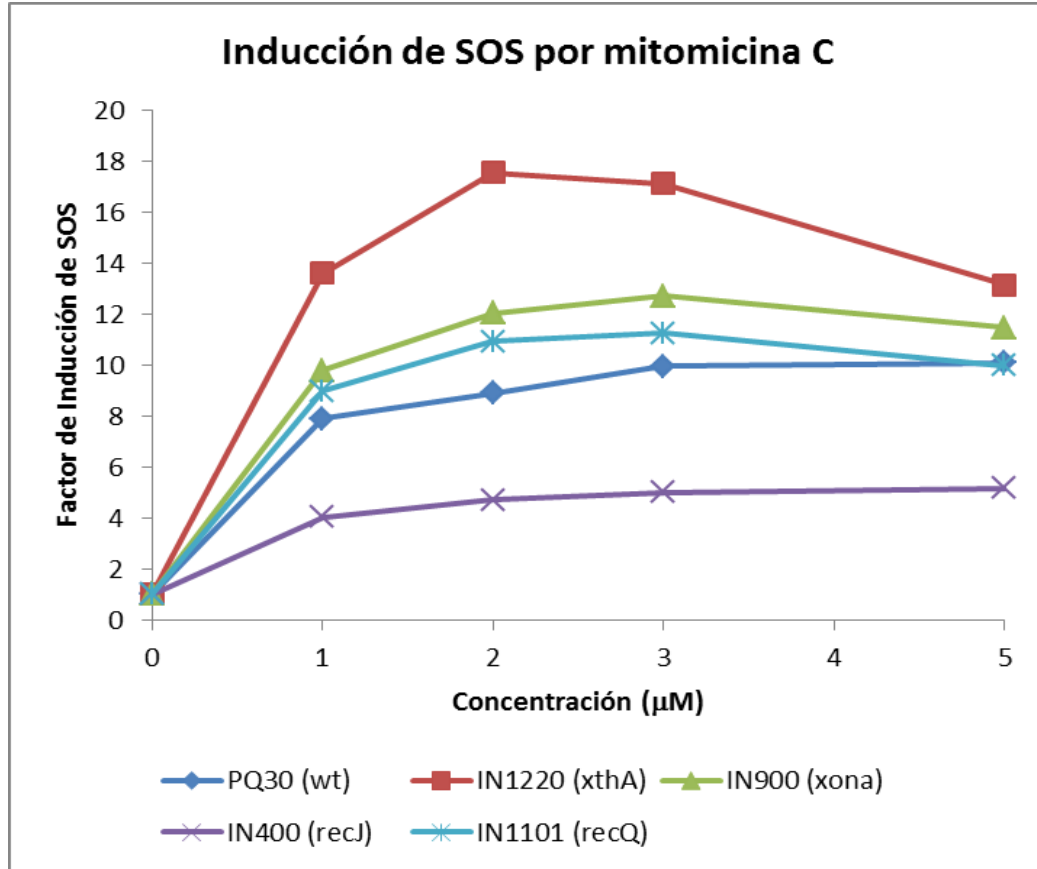


Fig. 21 Inducción SOS por Mitomicina C

Se compara la respuesta SOS entre los diferentes cuatro mutantes *xonA*, *recJ*, *xthA* y *recQ*, tomando como referencia a la cepa silvestre PQ30, expuestas a diferentes concentraciones de mitomicina C. Se puede observar que los mutantes *xonA*, *xthA*, tienen una mayor activación de la respuesta SOS, que sugiere que no participan en la formación de ADN de cadena sencilla que activa dicho sistema, sin embargo, al estar ausentes estos genes, existen lesiones que al no ser reparadas de manera eficiente, existe una acumulación de ADN de cadena sencilla que hace que la expresión sea mayor. Muy por el contrario con el mutantes *recJ*, que muestra una menor activación de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre. Este comportamiento

sugiere que el mutante participa en el reconocimiento de lesiones para la formación de ADN de cadena sencilla que activa esta respuesta. Por otra parte, el mutante *recQ* muestra una ligera activación de la respuesta que disminuye conforme aumenta la concentración a la cual fue expuesta, esto podría indicar, que puede haber rupturas de doble cadena, que como se sabe no son buenas inductoras para la activación de la respuesta.

-Metilmetano sulfonato

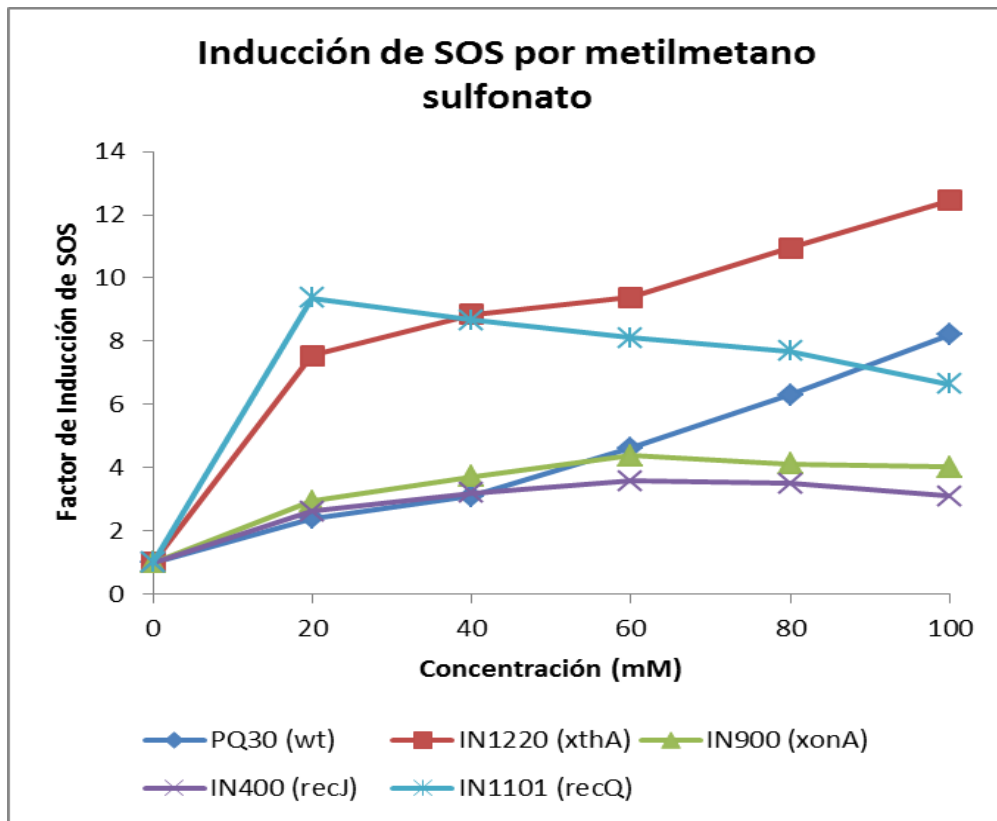


Fig. 22 Inducción SOS por Metilmetano sulfonato

En los resultados obtenidos durante la exposición a diferentes concentraciones de metil metano sulfonato, se puede observar que los mutantes *xonA* y *recJ* muestran una menor activación de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre, que como se mencionó anteriormente, estas dos exonucleasas de cadena sencilla degradan ADN en direcciones contrarias, sin embargo, se puede sugerir que trabajan de manera conjunta en el reconocimiento de lesiones para la formación de ADN de cadena sencilla. Mientras que el mutante *recQ* al igual que en los

resultados obtenidos en la exposición a Mitomicina C, muestra una activación que va disminuyendo conforme va aumentando la concentración, sugiriendo la presencia de rupturas de doble cadena. Por último, el mutante *xthA* muestra una activación de la respuesta mayor que la cepa silvestre, que sugiere que no participa en la formación de ADN de cadena sencilla, que las lesiones producidas por este agente, permanecen por más tiempo, pero no están relacionadas de manera directa con el mutante.

-Etilmetano sulfonato

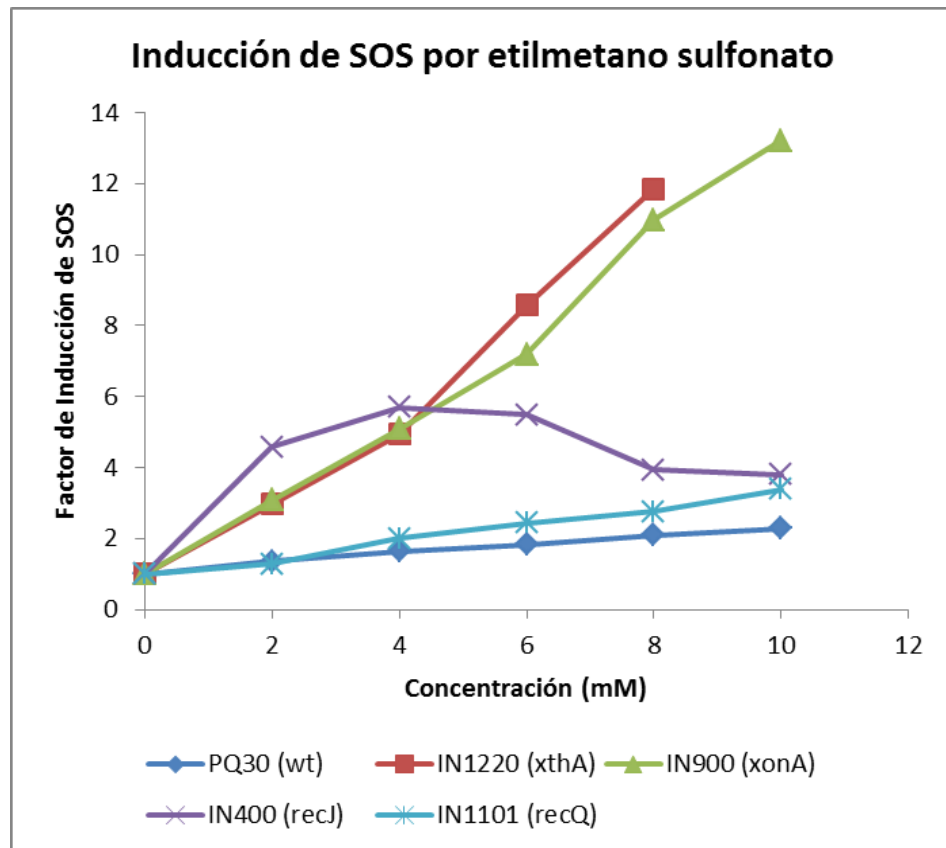


Fig. 23 Inducción SOS por Etilmetano sulfonato

En los resultados obtenidos se puede observar que la cepa silvestre no muestra activación de la respuesta SOS, sugiriendo así que no hay rupturas en el ADN que desencadenen la respuesta, sin embargo, se podría decir que hay una clara presencia de mutaciones, permitiendo que no hay un colapso de la horquilla de replicación. El mutante *recQ*, también muestra que no hay una

activación de la respuesta, mientras que el mutante *recJ*, tiene un comportamiento en el que se observa una ligera activación de la respuesta que disminuye conforme van aumentando las concentraciones de exposición, esto estaría indicando una posible colaboración entre ambos mutantes, de manera que al estar ausente uno u otro no son capaces de procesar el daño de manera independiente, es que si bien, en trabajos anteriores se ha reportado que estos genes tienen una participación conjunta en el reconocimiento de algunas lesiones. Mientras que los mutantes *xonA* y *xthA* muestran una activación de la respuesta SOS bastante superior a la cepa silvestre, que indican que existen lesiones que son reconocidas por estas enzimas, que al estar ausente existe una acumulación de daño y por ende una acumulación de ADN de cadena sencilla, permitiendo que la activación sea bastante elevada.

-Peróxido de hidrógeno

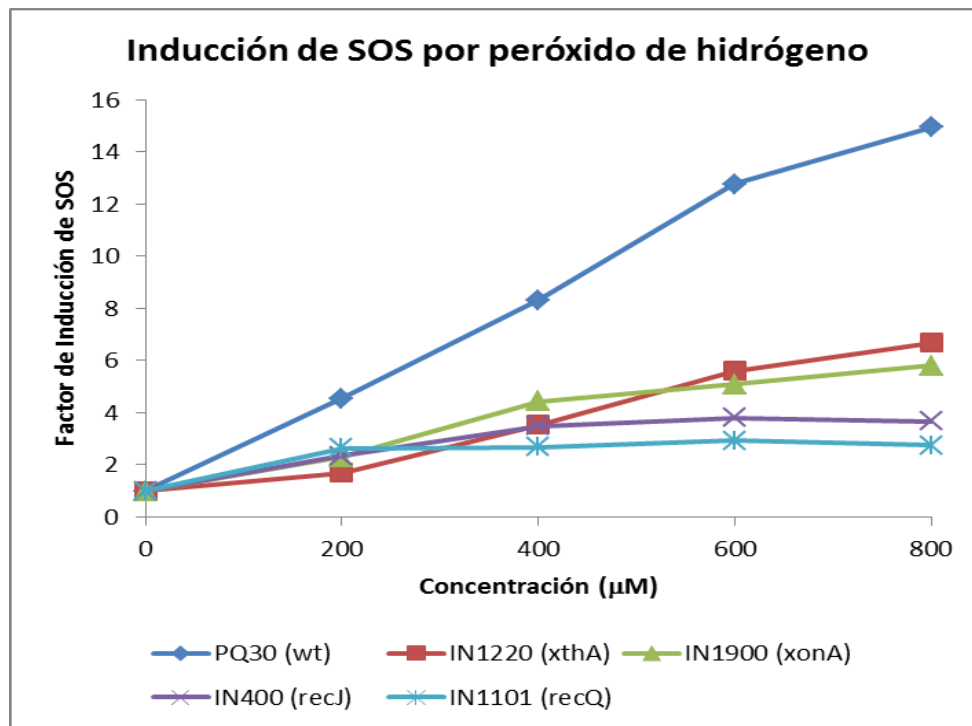


Fig. 24 Inducción SOS por Peróxido de hidrógeno

En la figura, se observa que la activación SOS de los cuatro mutantes *xonA*, *recJ*, *xthA* y *recQ* es menor en comparación con la cepa silvestre, que es una clara evidencia que se está produciendo un daño a nivel de bases, es decir, al haber oxidación en las bases, enzimas como la

endonucleasa AP (*xthA*) reconocen en el proceso de reparación por escisión de bases, una vez reconocido y dependiendo el extremo que se forme, ya sea 3'-5' o 5'-3', o ambos, es el turno de las exonucleasas RecJ y ExoI, que degradan el ADN para terminar con la reparación. RecQ, tiene una participación en el reconocimiento de rupturas de doble cadena que se pueden estar produciendo, de manera que pueda permitir la entrada de las exonucleasas.

- **Hidroperóxido de Ter-butilo**

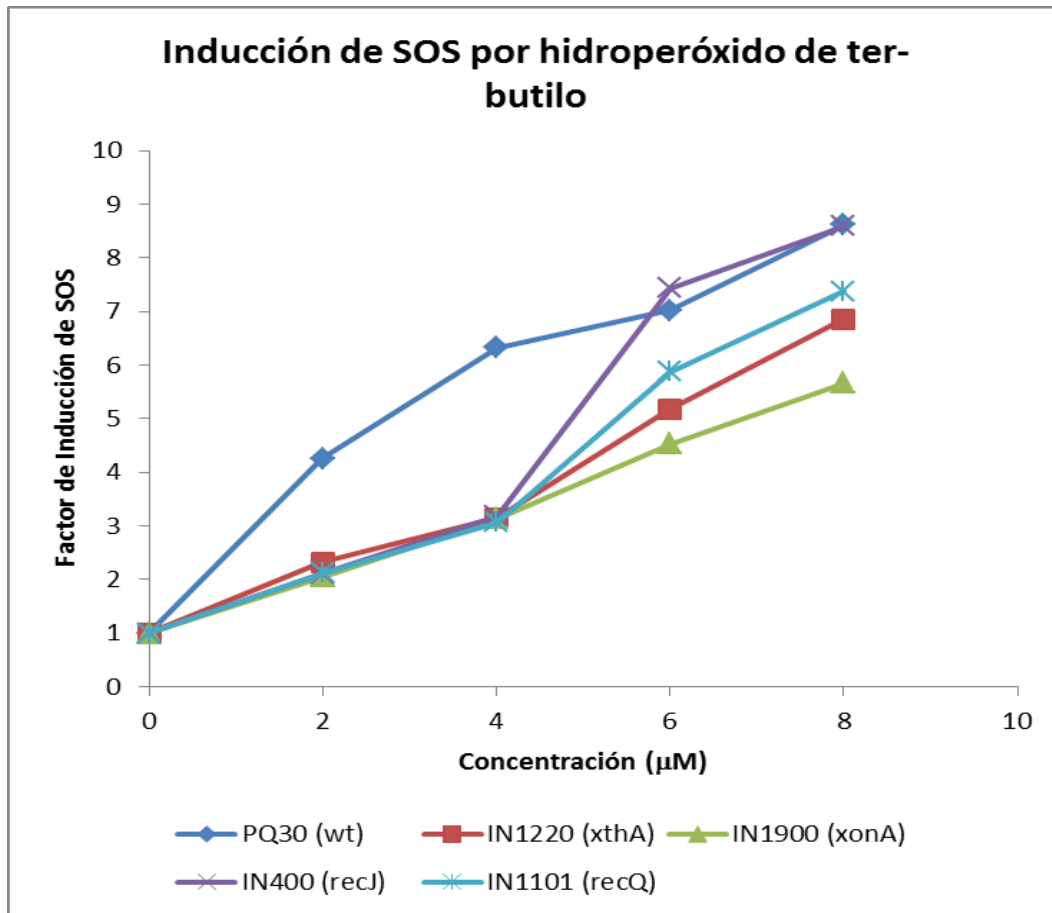


Fig. 25 Inducción SOS por Hidroperóxido de ter-butilo

En la fig. se puede observar que los mutantes *xthA*, *xonA* y *recQ* muestran una inducción de SOS menor que PQ30, lo que sugiere que participan en la formación de ADN de cadena sencilla, que es la señal de inducción para que se inicie el sistema, sin embargo por el comportamiento de la gráfica, se sugiere que existen otros mecanismo que pueden ayudar al reconocimiento de estas lesiones. El mutante *recJ* muestra en las primeras concentraciones una ligera inducción, sin

embargo, esta se dispara a concentraciones más altas, sugiriendo que este gen puede estar participando en la formación de ADN de cadena sencilla, pero también existe la posibilidad de la existencia de otros genes que puedan estar reconociendo estas lesiones, supliendo la función de *recJ*.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de construcción se recuperaron muchas colonias que al parecer eran resistentes a kanamicina, en el caso de los mutantes *recQ* y *xthA*, mientras que para los mutantes *rcJ* y *xonA* se mostraron con resistencia a la tetraciclina, lo que permitía suponer que se habían sustituido los genes *xthA*, *recQ*, *xonA* y *recJ* por el gen que confiere resistencia a los antibióticos y posteriormente se fueron descartando mediante las diferentes pruebas hasta que finalmente se seleccionó una cepa de cada uno.

- Mitomicina C

Supervivencia

Mitomicina C

La mitomicina C (MMC) es un agente alquilante bifuncional capaz de causar aductos mediante uniones covalentes e inducir enlaces inter o intrabanda, además de interactuar con el ARN, la síntesis de proteínas y con el oxígeno molecular, generando radicales libres que dañan al ADN y proteínas (Wei, *et al.* 2001). Estos aductos de no ser reparados pueden bloquear la replicación y la transcripción del ADN, y como consecuencia causar la muerte celular. Tanto eucariotas como procariotas tienen la capacidad de reparar estos aductos, mediante mecanismos como la reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (REB) o reparación por recombinación homóloga; o bien, pueden desencadenar sistemas más complejos de reparación como la respuesta SOS (Mao-wen, *et al.* 2010; Roh, *et al.* 2010).

En los resultados obtenidos ante la exposición de los mutantes *xonA* (IN900), *recJ* (IN400), *xthA*(IN1220) y *recQ* () a diferentes concentraciones de MMC se observó que todos son más sensibles en comparación con la cepa silvestre.

Estas exonucleasas codificadas por los genes *xonA* (ExoI) y *recJ* (RecJ), comparten ciertas similitudes, como que ambas degradan ADN de cadena sencilla, hidrolizan enlaces fosfodiéster,

además de participar en diferentes mecanismos de reparación, como la reparación por escisión de bases, reparación por disparidades de bases y en la reparación por recombinación homóloga. Sin embargo, lo que hace diferentes a estas exonucleasas es la dirección de hidrolisis del ADN de cadena sencilla, ExoI (*xonA*) empieza por el extremo 3'-hidroxilo, formando desoxirribonucleotidos 5'-monofosfato; mientras que la exonucleasa RecJ degrada ADN de cadena sencilla en dirección 5'-3' (Mishra, 2002).

Cuando se produce el daño en el ADN por acción de la MMC, IN400 (*recJ*) tiene una ligera sensibilidad en comparación con la cepa silvestre PQ30, mientras que por el contrario IN900 (*xonA*) es muy sensible en comparación con PQ30, esto puede deberse al patrón de reconocimiento de lesiones. Como se mencionó anteriormente, la MMC genera aductos que pueden causar rupturas de doble cadena, mismas que pueden ser reparadas por recombinación homóloga, sin embargo, se sugiere que tanto RecJ como ExoI tienen una participación en mecanismos de recombinación cuando hay rupturas de doble cadena con extremos disparejos, debido a que son capaces de degradar extremos 5' o 3' según sea el caso.

Sin embargo, en los resultados obtenidos RecJ parece no tener una participación directa con las lesiones producidas, ya que este mecanismo puede hacer uso de resolvasas como RuvABC, las cuales se han reportado ser necesarias para el reconocimiento de lesiones producidas por MMC que pueden procesarlo (Bolt, *et al.* 2016). Por otra parte, ExoI, puede estar reconociendo extremos disparejos en rupturas dobles, de manera que su ausencia le impide a la célula reparar este tipo de daños. En un estudio hecho previamente (Bassett y Kushner, 1985) se propone que en cepas carentes de Exo I, se pueden activar de manera casi automática la colisina El por la exposición de MMC, la cual está regulada por la respuesta SOS. Esto podría estar explicando la sensibilidad que muestra IN900 ante la presencia de MMC.

Por otro lado, también se ha reportado que la MMC puede generar gaps en la molécula de ADN, que van a ser reparados por la reparación por escisión de bases, donde al parecer IN900 puede estar participando en el procesamiento de estas lesiones (Cheng, *et al.* 2016). Si bien, se producen lesiones tanto de ruptura de doble cadena como lesiones a bases, la ausencia de ExoI es determinante para la reparación de daños producidos por MMC.

La endonucleasa AP, que es codificada por el gen *xthA*, está involucrado en la reparación por escisión de bases y participa en el reconocimiento del 90% de los sitios AP (Hornback y Roop II, 2006). Los resultados muestran una sensibilidad de dos órdenes de magnitud en comparación

con la cepa silvestre PQ30, lo que indica que las lesiones que se están produciendo pueden ser reparadas de manera más eficiente por la reparación de escisión de bases, o bien por recombinación homóloga. Muy probablemente el daño que se está generando, sobrepasa las lesiones a bases y por lo tanto, el que haya la participación de los otros mecanismos de reparación o bien, que el tipo de lesiones generadas por este agente sean reconocidas de manera específica por algunas otras enzimas, como en el caso de ExoI.

RecQ es una helicasa cuya función es desenrollar cadenas complementarias de ADN y son fundamentales para garantizar la reparación adecuada del daño en el ADN, lo que es evidente en la figura 16 donde se observa que el mutante *recQ* tiene mayor sensibilidad que la cepa silvestre PQ30, con una diferencia de casi 4 órdenes de magnitud. La MMC, como agente bifuncional puede estar generando rupturas de doble cadena que se están reparando principalmente por recombinación homóloga (Bernstein, *et al.* 2010).

Pese a que el mecanismo de reparación por recombinación homóloga, cuenta con el complejo RecBCD, que cumple una función de helicasa y nucleasa, parecen no ser suficientes para generar extremos 3' de ADN de cadena sencilla, a los cuales RecA se va a unir para continuar con la reparación.

Anteriormente se demostró que RecQ, en conjunto con la exonucleasa RecJ, juegan un papel importante en la reanudación de la síntesis de ADN después de un daño inducido por luz UV, mediante la degradación de la cadena retardada naciente de la horquilla de replicación, además de suprimir la recombinación ilegítima en células con daño en el ADN (Courcelle y Hanawalt 1999;. Courcelle et al 2003; Hanada et al. 1997).

Metilmetano sulfonato

La modificación de bases del ADN por el tratamiento por MMS, ejerce un fuerte efecto mutagénico y genotóxico sobre *E. coli*. Sin embargo, existen muchos sistemas de defensa celular y proteínas que reparan las bases de ADN modificadas y protegen a las células contra la toxicidad, tal como la REB, RRH, MMR y en el último de los casos la respuesta SOS (Nieminuszczy, *et al.* 2009).

Los resultados obtenidos exhiben una alta toxicidad producida por el MMS, como se puede observar en la fig. 17, los mutantes *xonaA* (IN900) y *recJ* (IN400), tienen una sensibilidad mayor

en comparación con la cepa silvestre PQ30, sugiriendo que ante la ausencia de estas dos exonucleasas, los daños producidos por el MMS, no pueden ser reparados de manera eficiente. En reportes anteriores se ha demostrado que se producen deficiencias en cualquier paso de la reparación por escisión de bases ante la exposición a MMS (Drablos, et al. 2004), de manera que la ausencia de las exonucleasa RecJ y ExoI, las cuales actúan después de la acción de una endonucleasa AP, se produce un efecto letal por la exposición a este agente.

Wang y Chang (1991) realizaron trabajos de sensibilidad en diferentes mutantes de *Escherichia coli*, entre ellos *recJ*, ante la exposición a MMS, donde obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo, sin embargo, ellos reportan que hay una ligera sensibilidad en comparación con el cuadruple mutante en *recJ*, *xthA*, *nfo*, *nth*, el cual incrementa en dos órdenes de magnitud su sensibilidad (datos no reportados en este trabajo) lo cual sugiere que la Exonucleasa RecJ, tiene una participación seguida de la acción de *xthA* en el reconocimiento de lesiones, específicamente sitios AP.

Por otro lado Thoms y Wackernagel (1998), reportaron que en experimentos *in vitro*, que la ausencia de la exonucleasa ExoI (*xonA*) disminuyó la conjugación y transducción de la bacteria *E. coli*, mientras que la deficiencia en RecJ dio lugar a un efecto similar aunque menos pronunciado, y la combinación de ambas deficiencias disminuyó la transducción hasta 3 veces y la conjugación hasta 15 veces, y por lo tanto haciéndola más sensible y aumentando la letalidad.

Tanto Exo I como RecJ, no solo participan en el mecanismo de reparación de bases, si bien, cuando este mecanismo es insuficiente para reparar las lesiones, pueden entrar en acción otros mecanismos como la reparación por disparidades de bases, donde estas exonucleasas juegan un papel importante en la degradación de ADN de cadena sencilla; o la reparación por recombinación homóloga, en donde la formación de rupturas de doble cadena por emparejamiento de lesiones, pueden dar origen a extremos disparejos los cuales van a ser reconocidos por estas exonucleasas, de manera que pueden quedar emparejados y así dar inicio a la reparación por medio del complejo RecBCD, perteneciente a la vía (Wyatt y Pittman, 2006).

En la figura 17 el mutante IN1220 (*xthA*, codifica para una endonucleasa AP), muestra menor supervivencia que la cepa silvestre PQ30, sugiriendo que el daño producido por el MMS, genera lesiones en las bases, ya que los sitios AP son generados indirectamente como intermediarios

después de la escisión de bases alquiladas por la acción de DNA glicosilasas, en la reparación por escisión de bases. Los sitios AP son considerados citotóxicos y mutagénicos, por que pueden inducir a rupturas celulares.

El MMS es capaz de promover sitios apurínicos/apirimidínicos, tales sitios resultan de la hidrólisis espontánea de los residuos de nucleósidos alterados en el ADN (Taylor y Weiss, 1982). La formación de sitios AP en el ADN después del tratamiento con MMS es un paso inicial de la reparación por escisión de bases. La endonucleasa AP (*xthA*) crea ADN de cadena sencilla, generando un extremo 3'OH, el cual sirve como cebador para la ADN polimerasa y continuar con la reparación.

En algunos experimentos anteriores se ha reportado que en cepas deficientes en *xthA* al exponerse a MMS, se generan sitios AP por la metilación del Nitrógeno 3 y 7 en las purinas, que son hidrolizados de manera más rápida y da origen a los sitios AP, sugiriendo que el papel de la endonucleasa AP es esencial en el reconocimiento de estos sitios (Ljungquist, 1977; Craig y Hickson, 1991, Sedgwick, 2004).

Los resultados también muestran que la presencia de sitios AP sin reparar en el ADN, la cepa IN1220 tiene mayor sensibilidad al MMS. Sin embargo la participación de *xthA* esta complementada por la acción de otras endonucleasas AP, para las cuales codifican otros genes *nth* y *nfo*; de acuerdo a Cunningham et al. (1986) observaron mayor letalidad por el MMS en el doble mutante *xthA-nfo* y el triple mutante *xthA-nfo-nth*, que en mutantes únicos de *xthA* y *nfo*. Sin embargo, Sikora et al. (2008), realizaron experimentos con mutantes *xthA* y *nfo*, y observaron que la cepa deficiente en *nfo* mostraba mayor tasa de mutagenicidad, mientras que la cepa mutante en *xthA* mostro mayor letalidad al ser expuestas a MMS, sugiriendo que los sitios AP muestran efectos más letales que mutagénicos y que *xthA* es la endonucleasa por excelencia responsable de reconocer estas lesiones. Con los antecedentes anteriores, se confirma que con la ausencia de la endonucleasa AP (*xthA*), los sitios AP generados no son reparados de manera eficiente y por ello hay mayor letalidad en el mutante IN1220.

En la figura 17, la cepa IN1101 deficiente en el gen *recQ*, el cual codifica para la helicasa RecQ, tiene mayor sensibilidad ante la exposición a diferentes concentraciones de MMS en comparación con la cepa silvestre PQ30.

En la ausencia de RecQ, se presentan errores que pueden conducir al colapso de las horquillas de replicación, las cuales necesitan ser reparadas para mantener la integridad del genoma y prevenir rupturas de doble cadena (Bernstein, *et al.* 2010).

En daño inducido por MMS, se forman moléculas en forma de X en los orígenes de la replicación, estas estructuras se visualizaron en mediante electroforesis en gel 2D. De manera que ante la ausencia de RecQ, se condujo a una acumulación de estas estructuras X, colapsando la horquillas de replicación y por ende conduciendo a muerte celular (Liberi, *et al.* 2005).

De hecho, se ha sugerido que el colapso de los horquillas de replicación se produce en cada ciclo celular replicativo haciendo que este sea un problema potencialmente significativo para todas las células en proliferación. Se cree que las helicasas RecQ, que son esenciales para el mantenimiento de la estabilidad del genoma, ya que funcionan durante la replicación del ADN. En particular, los mutantes de helicasa RecQ muestran defectos de replicación y tienen fenotipos consistentes con una incapacidad para reiniciar de manera eficaz la replicación después de la desaparición de la horquilla de replicación (Wu y Hickson, 2001).

Anteriormente se ha mencionado que el MMS produce alquilaciones en las bases de ADN, además de producir sitios AP, o producir brechas (gaps) en el ADN. Este último tipo de lesiones son reparadas por la vía de recombinación RecFOR, y es donde se ha reportado que hay una participación importante de la enzima RecQ (Ivancic-Bace, *et al.* 2005). En experimentos anteriores, se reportó que en mutantes deficientes en la enzima RecQ, mostraban una supervivencia menor en comparación con la cepa silvestre ante la exposición a luz UV; sin embargo, en la exposición a radiación gamma, el mutante en *recQ*, mostró una supervivencia similar a la cepa silvestre, lo cual sugiere que esta enzima tiene mayor afinidad por el ADN de cadena sencilla que por el ADN de cadena doble (Harmon y Kowalczykowski, 2001). De acuerdo a la gráfica de resultados, las lesiones producidas están conduciendo a la formación de ADN de cadena sencilla, de manera que la ausencia de RecQ, haya una mayor muerte celular.

Etilmetano sulfonato

En la figura se observa que el mutante IN400 (*recJ*) muestra una sensibilidad muy similar a la cepa silvestre PQ30, mientras que el mutante IN900 (*xonA*) tiene mayor sensibilidad que PQ30.

De acuerdo a las propiedades del EMS, se sabe que un agente alquilante monofuncional, que al reaccionar con el ADN produce etilaciones en las bases de los nucleótidos. Las mutaciones predominantes observadas por la exposición a EMS son GC-AT, que son causados por los malos apareamientos de O6-etilguanina con la T durante la replicación del ADN. Otra de las lesiones predominantes por el EMS son la etilación del N7 de la guanina, el cual puede repararse eficientemente por la REB, mientras que la etilación del O6 de la guanina se puede reparar por MGMT en niveles bajos [1]. También hay cierta evidencia de que el EMS puede causar inserciones o deleciones de pares de bases, así como deleciones intragenicas más extensas (Sega, 1984). De acuerdo a los resultados, los daños producidos por EMS en condiciones normales de una célula pueden ser reparados de manera eficiente por diferentes mecanismos de reparación o por la presencia de metiltransferasas.

Cabe resaltar que el MMS resultó ser más citotóxico que el EMS, probablemente porque algunas de las lesiones que produce este último agente pueden estar presentes durante la replicación del DNA sin detener el progreso de las horquillas.

Taira, *et al.* (2013), reportaron que la lesión comúnmente producida por el EMS, es la etilación del oxígeno 6 de la guanina (O6-EGuanina), cuya lesión en su mayoría produce transversiones o transiciones en el ADN, que pueden llevar a malos apareamientos o bien producir abultamientos en la cadena de ADN, que su mayoría van a ser reparadas por la reparación por escisión de nucleótidos.

Feitsma *et al.* (2008), realizaron experimentos con agentes etilantes como el EMS, en los mutantes MutH, MutL y MutS, enzimas pertenecientes a la vía de reparación por disparidades de bases, reportando que el mutante MutS presentó un aumento en la frecuencia de mutaciones. MutS una vez que reconoce la base alquilada o la falta de coincidencia en la horquilla de replicación, puede proceder a repararla de dos maneras, mediante la participación de las otras dos proteínas MutL y MutH que pertenecen a la misma vía de reparación, o bien que MutS al reconocer el sitio alquilado conduzca al inicio de otra vía de reparación, como la reparación por escisión de bases o nucleótidos, dependiendo de la cantidad de daño infligido por el agente (Taira, *et al.* 2013).

Al estar ausente la exonucleasa ExoI (*xonA*), se puede sugerir la presencia de lesiones que conducen a daños en las bases, así como la presencia de “gaps” con extremos 3', los cuales no son reconocidos por la ausencia de la exonucleasa, pueden conducir a una muerte celular, que

evidentemente se muestra en proporciones bajas, ya que si bien, existen otras vías de reparación que pueden reconocer los daños, y no necesariamente por la participación de ExoI, como la reparación por disparidades de bases.

Ivankovic, and Dermic (2012) reportaron que en células deficientes en los genes *recBC* y también deficiente en exonucleasa I (ExoI) y SbcCD, que degradan extremos 3'; la helicasa RecQ produce extremos de ADN de cadena sencilla y el complejo proteico RecFOR permite RecA carga en el extremo 3', mientras que su cadena complementaria se degrada por una exonucleasa RecJ (Ivankovic y Dermic, 2012), sugiriendo que RecQ, podría llevar parte de la función de ExoI en su ausencia, además de que de acuerdo a los resultados pueden tener una participación conjunta en la reparación de las lesiones producidas por el EMS.

Por su parte la exonucleasa RecJ, parece no estar involucrada en el reconocimiento de lesiones producidas por el EMS, ya que si bien se observa en la figura 18 muestra un comportamiento similar a la cepa silvestre PQ30, sugiriendo que existen otras vías que pueden reparar estas lesiones, o bien, en comparación con ExoI que tiene una participación más marcada que esta exonucleasa.

Por su parte el mutante IN1220 (*xthA*), mostro mayor letalidad en comparación con la cepa PQ30, sugiriendo que la participación de este gen es importante para el procesamiento de lesiones, principalmente por la presencia de sitios AP.

Cuando las bases de ADN son etiladas por EMS (en su mayoría la posición N-7 de guanina) se hidrolizan gradualmente a partir de la desoxirribosa en el esqueleto del ADN dejando atrás un sitio AP, que puede producir rupturas de cadena sencilla en el ADN(Segal, 1984) de manera que al estar ausente esta endonucleasa AP, estas lesiones no se reparan de manera eficiente, provocando que haya un aumento en la letalidad de la célula respecto a la cepa silvestre.

- **Peróxido de hidrógeno**

En la figura 19 se observa que el mutante IN1900 (*xonA*) muestra mayor sensibilidad en comparación con la cepa silvestre PQ30, sugiriendo que la ausencia de esta exonucleasa, no permite a la célula recuperarse después del daño producido por el peróxido de hidrogeno.

Las bases oxidadas, son una de las principales consecuencias originadas por la acción de agentes oxidantes, de manera que el mecanismo por el cual sería reparado este tipo de daños es por el mecanismo por escisión de bases. Una vez iniciado este mecanismo, existe la participación de otras enzimas, como la endonucleasa AP (*xthA*) que se encarga de reconocer los sitios AP, generando huecos en la molécula, que posteriormente serán reconocidos por exonucleasas, formando ADN de cadena sencilla, que va a ser reconocido y procesado por polimerasas específicas, agregando los nucleótidos correspondientes, terminando el proceso con la participación de una ligasa, la cual sella la molécula, de modo que la molécula de ADN ha quedado reparada. Una de las exonucleasas que participa en este mecanismo de reparación es la ExoI, de manera que su ausencia no le permite reconocer los huecos formados por la endonucleasa AP (*xthA*), y al no ser procesados, pueden llegar a la horquilla de replicación, causando un colapso de esta y por ende conduciendo a muerte celular.

ExoI (*xonA*) se reportado formar una interacción proteína-proteína con la proteína de unión a ADN de cadena sencilla de *Escherichia coli*, SSB, que ayuda a estimular su actividad al cargarla sobre sustratos de ADNss, potencializando su función. (Sandigursky, *et al.* 1996; Lu,*et al.* 2011). En la figura 18 se puede observar que los mutantes IN 1400 (*recJ*) e IN1101 (*recQ*), tienen mayor sensibilidad que la cepa silvestre PQ30, ante daños producidos por la exposición al peróxido de hidrógeno. Estos resultados sugieren que la participación de estos genes es esencial para la reparación de daños producidos por el agente.

Se ha reportado que después de la detención de la replicación por un daño inducido, el ADN naciente en la horquilla de replicación se degrada parcialmente por acción combinada de la exonucleasa RecJ y la helicasa RecQ, que tienen cierta preferencia sobre la hebra ratardada (Hanada, *et al.* 2000). Ante esto, se propone que en conjunto RecJ y RecQ pueden desempeñar un papel en la reparación de lesiones en el ADN recién sintetizado, y que además hay daños producidos por este agente oxidante se están generando después de la replicación del ADN; y la existencia de otras exonucleasas como XonA pueden reconocer el daño producido antes de la horquilla de replicación. Por su parte, Courcelle, *et al.* (2006) encontró que RecJ, y en menor medida RecQ, es necesario para la recuperación eficiente de la síntesis de ADN, después de la detención de la horquilla de replicación. Además, encontraron que en ausencia del procesamiento de ADN naciente, la recuperación y supervivencia de la célula se pueden hacer dependientes de la síntesis de translesión por PolV.

Se ha reportado que mutantes *recQ* son menos sensibles que mutantes *recJ*, sugiriendo que la actividad de la helicasa RecQ mejora, pero no es esencial, para la recuperación promovida por RecJ (Courcelle, et al, 2006). Sin embargo, los mutantes RecJ y RecQ, tienen una letalidad igual, de acuerdo a la gráfica 5 de supervivencia, que difiere un poco con lo reportado, proponiendo entonces que ambas enzimas si pueden tener una participación conjunta en el procesamiento y reparación de daños

El ataque al ADN por radicales libres da aumento a daño oxidativo en las bases, que pueden generar sitios abásicos y rupturas de cadena. *Escherichia coli* posee dos endonucleasas AP capaces de reparar rupturas de cadena por escisión del bloque del extremo 3', la endonucleasa AP, codificada por el gen *xthA* participa en la reparación por escisión de bases y reconoce el 90% de los sitios AP (apurinicos/apirimidinicos) y la endonucleasa IV codificada por el gen *nfo*. Cepas deficientes del gen *xthA* son altamente sensibles al peróxido de hidrógeno, agente oxidativo que induce rupturas de cadena con el bloqueo del extremo 3' como lesión primaria (Castillo-Acosta, et al. 2009).

En la figura 19, se puede observar que el mutante *xthA* (IN1220) muestra mayor sensibilidad que la cepa silvestre PQ30. Se sugiere que el daño producido por el peróxido de hidrógeno es en las bases nitrogenadas del ADN, de tal forma que los sitios AP generados por la oxidación no pueden ser procesados de manera eficiente, lo cual está llevando a muerte celular. De acuerdo a reportes anteriores, el mecanismo de reparación para este tipo de lesiones es la reparación por escisión de bases, sin embargo, ciertas lesiones de tipo oxidativo pueden ser reparadas por la reparación por escisión de nucleótidos (Mitra, et al. 2001).

Algunas de las lesiones formadas por oxidación en las bases son 5,6-dihidroxitimina (dHT), 5-hidroxicitosina, 5-hidroxihidantoina, *trans*-6-hidroxi-5,6-dihidrotimina (Th6) y 7,8-dihidro-8-oxoadenina (oxo⁸A), son reconocidas por *xthA*, siendo estas últimas las de mayor importancia, ya que una induce a citotoxicidad y la otra produce un bloqueo en la replicación, respectivamente (Bjelland y Seeberg, 2003; Cadet, et al. 2003). Esta podría ser una razón por la cual la célula no puede recuperarse. Además, también se han tenido reportes en mutantes de *xthA*, que al ser expuesto a peróxido de hidrógeno, presentaron una reparación más lenta, o bien, que al producirse varios tipos de daños, algunos de estos en los mutantes no se puede reparar (Hagensee y Mosees, 1989).

Demple y colaboradores (1983) reportaron que la importancia de la endonucleasa AP consiste en la restauración del nucleótido normal que tiene extremos 3'-OH, ya que estos pueden actuar como cebadores para la acción de la ADN polimerasa I. por otra parte, concluyen que la actividad de la endonucleasa AP (*xthA*) puede ser no requerida para la reparación de daños por peróxido de hidrógeno. Sin embargo, es necesaria para la reparación óptima de daños producidas por este agente.

En *Escherichia coli*, la presencia de la endonucleasa IV, (*nfo*), representa el 10% de la actividad total de la endonucleasa AP. Cunningham et al. (1986) han demostrado que dobles mutantes *nfo-xthA* son más sensibles al peróxido de hidrógeno que las cepa silvestre, lo que sugiere que endo IV podría sustituir a la endonucleasa AP (*xthA*) en la reparación de daños de H₂O₂, pero no es tan eficiente para el manejo de daños.

Cromoensayo

- Mitomicina C

En los resultados obtenidos en el cromosensado, se observó que la cepa IN400, defectuosa en el gen *recJ*, tiene una menor activación que la cepa silvestre PQ30, como se ha mencionado ya, *recJ* es una exonucleasa que reconoce extremos 5' del ADN, pero que no puede reconocer extremos de ADN "romos" con extremo 3', razón por la cual se le ha asociado con la helicasa RecQ (Cheng, et al. 2016); de manera que cuando hay rupturas de doble cadena que son producidas por la mitomicina C, y se generan extremos dispares, RecJ y RecQ van a trabajar de manera conjunta para reconocer y degradar estos extremos. Otro punto importante es que RecJ es capaz de digerir el ADN que se forma a partir de la acción de una endonucleasa AP, la cual reconoce estos sitios (Dianov, et al. 1994) Por otro lado, las lesiones producidas por este agente pueden ser reparadas de manera eficiente por el complejo RecBCD (reparación por recombinación homóloga), los productos de los genes *mutL*, *mutS* y *mutH*, sin embargo en ambos mecanismos se encuentra involucrada RecJ.

Por su parte la helicasa RecQ (IN1101) muestra un incremento al inicio de la activación de la respuesta que disminuye conforme aumenta la concentración, lo que sugiere que esta helicasa si participa en algún punto en la generación del ADN de cadena sencilla previo a la activación de SOS. Se ha reportado que cuando hay rupturas dobles de extremos dispares donde el extremo

saliente es 3', RecQ comienza a desenrollar el ADN para liberar un extremo 5', el cual reconoce y degrada RecJ, para que posteriormente la proteína SSB se una, que a su vez va a ser retirada por RecFOR, para dar paso a la unión de RecA, donde una parte va a ser reparada por recombinación y otra más pequeña va a dar lugar a la inducción de SOS (Chen., *et al.* 2016). La respuesta en cepas deficientes en RecQ, sugiere la presencia de rupturas de doble cadena que se están produciendo son de extremos dispares, de tal forma, que las exonucleasas RecJ y ExoI están reconociendo, sin embargo hay un punto donde RecJ requiere de la participación conjunta con RecQ, para reconocer los extremos 3' y así digerir el ADN, que estaría activando la respuesta SOS, sin embargo la ausencia de RecQ no le permite a RecJ reconocer estos extremos, lo que justifica la disminución de la activación de la respuesta a concentraciones más altas en el mutante RecQ.

Bernstein *et al.* (2010) demostraron que RecQ en las horquillas de replicación en punto muerto actúa para inducir la señalización SOS, ya que es dependiente de RecA de tal manera que se puede sugerir que la MMC está generando daños durante la horquilla de replicación, que van a ser reconocidos por RecQ.

ExoI (*xonA*), otra exonucleasa que reconoce ADN de cadena sencilla en dirección 3'-5', se puede observar en la figura 2, que el mutante en ExoI (IN900) tiene una inducción de la respuesta SOS mayor que PQ30, lo cual sugiere que no participa en la formación de ADN de cadena sencilla, como lo hace RecJ, que tienen menor inducción de SOS. Sin embargo su ausencia, hace que la expresión de SOS, se eleve de manera que puedan expresarse las colisinas, las cuales van a dar lugar a muerte celular, tal como se puede observar en el mecanismo de activación de la respuesta SOS, a mayor cantidad de daño, mayor expresión de los genes pertenecientes a la vía.

xthA(IN1220) es un gen que como se ha mencionado, codifica para una endonucleasa AP, que reconoce el 90% de los sitios apurínicos/apirimidínicos que se pueden formar por diversas causas endógenas o exógenas (Hornback t Roop II, 2006). Forma parte del mecanismo de reparación por escisión de bases. En la figura 21 se puede observar que la cepa IN1220 deficientes en el gen *xthA*, tiene mayor activación de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre PQ30; sin embargo llega a un punto donde el aumento de la concentración de la MMC hace que disminuya.

Se ha reportado que en mutantes deficientes en *xthA*, son incapaces de reparar los sitios AP creados por el daño a bases, que pueden originarse de forma espontánea o bien por acción de

agentes externos, como en el caso de la mitomicina C. Los sitios AP generados pueden persistir o bien ser reconocidos por glicosilasas, las cuales van a procesar estos sitios para formar el sustrato suficiente para que algunas enzimas como RecJ, lo reconozcan y así dar paso a la formación de ADN de cadena sencilla que sirve como inductor para la activación de SOS (Foster y Davis, 1987).

La formación de mutaciones, se puede sugerir de acuerdo a la supervivencia, ya que esta no se ve afectada de manera significativa en ausencia de *xthA*. Foster y Davis (1987) mencionan que cuando las vías de reparación de los sitios AP, se saturan por la exposición a un agente alquilante bifuncional como MNNG que daña el ADN, podría tener consecuencias mutagénicas y carcinogénicas.

- **Metilmetano sulfonato**

En la figura 22, se observa que los mutantes IN400 (*recJ*) e IN900 (*xonA*), tienen una activación de la respuesta SOS menor en comparación con la cepa silvestre PQ30, pero muy similar entre ambas exonucleasas.

RecJ y ExoI procesan moléculas de ADN regulando la disponibilidad de sustrato, como extremos de cadena sencilla de ADN, para replicación, recombinación y reparación; además para cargar la proteína RecA en extremos de ADN de cadena sencilla, para inducir el regulón LexA y activar la respuesta SOS (Viswanathan y Lovett, 1998; Kowalczykowski, 2000).

Ante estos resultados se sugiere una participación conjunta de ambas exonucleasas en el reconocimiento de lesiones para la formación de ADN de cadena sencilla. En estudios *in vitro* se ha demostrado que cuando hay un daño en la hebra recién sintetizada se produce un extremo 5' en seguida de la base errónea, donde enzimas específicas 5' como RecJ (Chase, *et al.* 1986) pueden comenzar a degradar la cadena para formar ADN de cadena sencilla, mientras si después de la incisión hay un extremo 3' y ante la falta de coincidencia, la enzima específica 3' ExoI (Viswanathan y Lovett, 1999) degrada la hebra y forma el ADN de cadena sencilla (Viswanathan, *et al.* 2001), el cual estaría sirviendo de inducción de la respuesta SOS, si el daño producido sobrepasa otros mecanismos de reparación, como la reparación por disparidades de bases (Thoms, *at al.* 2008).

Otra posible explicación sobre la falta de activación de SOS de los mutantes IN900 e IN400, puede ser que ante la exposición a MMS, una de las lesiones principales es la formación de sitios AP, como se mencionó anteriormente, que la formación de huecos formados en la hebra recién sintetizada se empareje a los sitios AP de la hebra patrón, y convertirse así en rupturas de doble cadena, las cuales son reparadas principalmente por la reparación por recombinación homóloga por medio del complejo RecBDC (Connelly, *et al.* 1998); que de acuerdo al modelo propuesto, solo una pequeña parte de este tipo de lesiones pueden activar la respuesta SOS.

En la figura 22 se observa que el mutante IN1220 (*xthA*) tiene mayor activación de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la endonucleasa AP (*xthA*), no participa en la activación de este sistema; sin embargo su ausencia hace que las lesiones permanezcan por más tiempo incrementando así su nivel de inducción.

De acuerdo al modelo propuesto por Serment (2008), el daño a bases es una de las vías principales para la activación de SOS. De tal manera que cuando la REB es insuficiente para la reparación de los daños producidos por el MMS, existen otras vías como la respuesta SOS.

Los sitios AP producidos por MMS se pueden generar a partir de la depuración espontánea de bases metiladas como 7meA y 3meA o como intermediarios que surgen durante la reparación por escisión de bases metiladas 3meA, 7meG, 3meG y 7meA por DNA glicosilasas.

De acuerdo a previas investigaciones, la ausencia de *xthA*, puede ser reemplazada por *nfo*, el cual codifica para otra endonucleasa AP, sin embargo la participación de esta última endonucleasa es menor que *xth*, o bien, cuando la reparación por escisión de bases es insuficiente, existen otras vías para la eliminación de daños como la reparación por disparidades de bases o recombinación homóloga (Wang y Chang, 1991; Sikora, *et al.* 2009). Estos dos últimos mecanismos también están conectados con la inducción de la respuesta SOS (modelo Serment, 2008) de tal manera, que es probable que la hebra de cadena sencilla se esté generando por cualquiera de estos mecanismos de reparación, pero ante la ausencia de *xth* hasta el 95% de los sitios AP quedan sin reparar (Kow y Wallace, 1985; Cunningham, *et al.* 1986), se puede presentar una acumulación del daño que hace que el nivel de inducción de IN1220 sea mayor que el de la cepa silvestre. Por otra parte, Janion y colaboradores reportaron que en mutantes deficientes de la endonucleasa AP (*xthA*) y el doble mutante (*xthA nfo*) hay una inducción crónica del sistema SOS, lo que podría ser una opción de la elevada respuesta del mutante *xthA*.

En la figura 22 se observa que el mutante IN1101 deficiente en *recQ*, muestra una tendencia elevada de activación de la respuesta SOS en la primera concentración de MMS, sin embargo, va disminuyendo conforme van aumentando las concentraciones de este agente.

RecQ pertenece a un grupo de helicasas de ADN, las cuales tienen como función principal el desenrollar ADN de doble cadena, para proporcionar el intermedio de ADN de cadena sencilla (que se requiere para diversos procesos metabólicos del ADN tales como la replicación, la recombinación, la transcripción y la reparación del ADN (Lahue y Matson, 1990)). Esta helicasa tiene una polaridad 3'-5' en el desenrollamiento del ADN y puede desenrollar diversos sustratos de ADN incluyendo ADN con extremos romos, con salientes 5' o 3' (Matson, 1986; Umezumi, *et al.* 1990; Xiang y Maizels, 2001).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la helicasa RecQ, puede estar participando en la formación de ADN de cadena sencilla, generando un extremo 3', el cual sirve como sustrato para RecA e iniciar con la activación de SOS, ya que se ha reportado que RecQ puede suprimir el mecanismo de recombinación (Smith, 1988; Hanada, *et al.* 1997).

Por otra parte, se ha reportado que la helicasa RecQ también se requiere para la inducción adecuada de la respuesta 'SOS' ante la presencia de horquillas de replicación bloqueadas. Esta propuesta menciona que RecQ desenrolla el ADN dúplex delante de una horquilla de replicación con un bloqueo de cadena "líder", permitiendo el ensamblaje del filamento RecA en la cadena de retraso para inducir la señal SOS. La reparación subsiguiente de la lesión de bloqueo puede ser por la síntesis trans-lesión o el reinicio por recombinación para conducir a la reanudación de la replicación del ADN (Courcelle, *et al.* 2003; Hishida *et al.* 2004; Heyer, 2004). Sin embargo, de acuerdo al comportamiento del mutante, se puede sugerir que esta helicasa puede trabajar de manera conjunta con alguna otra enzima, que ante la ausencia de *recQ*, la formación de ADN de cadena sencilla va disminuyendo. En algunos antecedentes se ha descrito que es probable que RecQ inicie el proceso de desenrollamiento conjuntamente con RecJ, una exonucleasa específica de ADN de cadena sencilla, que digiere la cadena con extremo 5', desplazándola para permitir la formación del filamento RecA en la cadena con extremo 3' – OH, para dar paso a la inducción de SOS (Lovett y Kolodner, 1989).

- Etil metanosulfonato

En los resultados obtenidos en la inducción de la respuesta SOS, la cepa silvestre PQ30 no muestra una inducción de la respuesta. Debido al mecanismo de acción del EMS, se ha reportado que es un mutágeno directo, es decir que no requiere una activación metabólica para alquilar el O6 de la guanina, principal causante de malos apareamientos, induciendo a cambios en las bases (Greenspan, *et al.* 1988). En previos estudios se analizaron 245 mutaciones en regiones codificantes y se reportó una frecuencia del 92% de transiciones GC-AT (Anderson, 1995), mientras que Flibo, 2010, reportó un espectro similar, mientras que Sumeet, S. *et al.* (2010) encontraron solo el 66% de estas transiciones [Anderson, 1995; Blibotte, *et al.*, 2010; Sumeet, *et al.* 2010). Sugiriendo así la presencia de mutaciones que al no ser reconocidas pasa por la horquilla de replicación sin causar colapso alguno que dé pie a rupturas de cadena en el ADN. Sin embargo la presencia de lesiones como la etilación del N7 de la guanina, puede producir daños en la molécula de ADN que pueden repararse por REB de manera eficiente. Por otra parte, la DNA polimerasa III es requerida para mutagenesis del genoma de la bacteria por daños producidos por EMS. La ADN Pol III es la principal encargada de la elongación del ADN (actividad polimerasa 5' → 3') durante la cual también realiza tareas de corrección (actividad exonucleasa 3' → 5'). La Pol III no es requerida para la inducción de SOS o recombinación en el ADN (Yang, *et al.* 2001), sugiriendo una causa para la ausencia de activación de SOS en la cepa silvestre PQ30. También se ha reportado también en publicaciones anteriores que las etilaciones del oxígeno 6 de la guanina se pueden reparar de manera eficiente por NER.

En la activación de SOS por la exposición a EMS se observó que es mayor en los mutantes *xthA* y *xonA* (figura 2C), sugiriendo.

El aumento en la expresión de SOS en los mutantes *xthA* y *xonA*, se sugiere que estas enzimas no participan en la formación de ADN de cadena sencilla para activar de la respuesta, al contrario, su ausencia hace que las lesiones permanezcan por más tiempo. Ante esta sugerencia, la REB, estaría participando en el reconocimiento de lesiones producidas por el EMS, lesiones que por alguna razón mecanismos como la reparación por disparidades de bases o etiltransferasas no pudieron reparar o no han reparado aún. La ausencia de estos genes traería como consecuencia, que dichas estructuras permanecieran por más tiempo. De esta manera, aquellas

lesiones, que de forma natural se hubieran eliminado activan SOS; por ende nuestros mutantes *xthA* y *xonA* harán que aumente el nivel de expresión de dicha respuesta

El mutante *recJ*, muestra al inicio de la inducción de la respuesta un incremento, el cual disminuye a concentraciones más altas, lo cual sugiere que el gen puede estar involucrado en la formación de ADN de cadena sencilla, sin embargo, la presencia de otras exonucleasas como ExoI, ExoVII o ExoX, pudieran estar involucradas, en el reconocimiento de las lesiones, pero a menores niveles, lo cual podía explicar la caída de la curva de la inducción de SOS. Heyer, (2006), explica que la helicasa RecQ, en conjunto con ExoI y bajo ciertas condiciones, pueden reconocer y degradar extremos 5'-3', que se debe a la posible bifuncionalidad de RecQ, que reconoce estos extremos, aunque de manera más lenta que en la dirección contraria, permitiendo que ExoI degrade por su parte el extremo 3' y formar el sustrato para la unión con RecA. Sin embargo, el mutante *recQ* muestra una actividad de la respuesta SOS similar a PQ30, lo que indica que no está involucrada en el proceso, pero si puede tener participación en la ausencia de otros genes como en el caso del mutante *recJ*.

- **Peróxido de hidrógeno**

En la figura 24, puede observar que el mutante IN1900 tiene una activación de la respuesta SOS menor que la cepa silvestre PQ30. XonA es una exonucleasa que participa en la reparación por escisión de bases para eliminar los restos de la desoxirribosa-fosfato, después de la escisión del ADN en un sitio AP por una endonucleasa AP (Sandigursky y Franklin, 1994). De manera que su ausencia sugiere que el daño producido por el peróxido de hidrógeno se da principalmente por oxidación a las bases.

La ausencia de este gen, sugiere que se podrían generar extremos 3' durante la exposición al peróxido de hidrógeno, que al no ser reconocidos y degradados para formar el ADN de cadena sencilla, al cual, por medio de la intervención de RecFOR, se une RecA para dar inicio a la Activación de SOS, podrían estar colapsando la horquilla de replicación.

Se ha sugerido que *xonA* tiene funciones adicionales, como la habilidad de bloquear enzimas pertenecientes a la vía de recombinación, que reconocen al ADN como sustrato, tal es el caso de la proteína SSB y *recA*. Una interacción de XonA y RecA, es importante en el proceso de reparación por recombinación (Bedale, et al. 1993)

La exonucleasa ExoI forma parte de una red de proteínas de replicación y reparación que interactúan con SSB, que incluye a la exonucleasa RecJ, la proteína de recombinación RecO y la helicasa RecQ. De manera que sugiere, que en algún momento de la reparación tienen una participación conjunta estas proteínas para el reconocimiento de daños y la formación de ADN de cadena sencilla (Lovett, 2011).

La ausencia de *xonA*, puede afectar la activación de la respuesta SOS, ya que al ser una exonucleasa que degrada ADN de cadena sencilla en dirección 3'-5', tiene como una doble funcionalidad unirse al ADN durante el procesamiento de la cadena, permitiendo la unión a RecA mediante la participación de RecFOR, para iniciar la activación de la respuesta. En trabajos anteriores se ha reportado que una alteración en esta exonucleasa, podría degradar ADN de manera incontrolada, hasta terminar con todo el ADN de un cromosoma (Kirk y Oliveras, 1978).

Existe otras exonucleasas que pueden degradar extremos 3' como Exo VII, que puede procesar estos extremos, pero en menor proporción que ExoI, lo que podría explicar la poca inducción de SOS (Thoms, et al. 2008).

Se ha reportado que la proteína SSB se une a horquillas de replicación abandonadas para estabilizar a la molécula de ADN. Por su parte la ExoI (*xonA*) actúa sobre sustratos SSB/ADN de cadena sencilla, donde SSB se une a ExoI y estimula su actividad de exonucleasa, para generar así ADN de cadena sencilla, que va a ser reconocido por el complejo RecFOR (Molineux y Gefter, et al. 1975; Viswanathan, et al. 2001; Burdett, et al. 2001). Esto podría sugerir que parte de los daños que se están generando por el peróxido de hidrógeno, es durante la replicación del ADN, atacando a las horquillas de replicación.

Demuestran que ExoI es capaz de desplazar a SSB sin una interacción directa, sin embargo, la formación de complejos proporciona una mejora positiva de la actividad de ExoI en el procesamiento de ADN de cadena sencilla (Lu y Keck, 2008).

En la figura 24 se observa que los mutantes IN1400 (*recJ*) e IN1900 (*xonA*) tienen una menor inducción de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre PQ30, ante la exposición a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. De acuerdo a los efectos producidos por este agente, son el daño oxidativo a las bases nitrogenadas del ADN y de manera menos frecuente rupturas de cadena sencilla. De manera que la ausencia de estos genes, no permite la formación de ADN de cadena sencilla, para inducir la expresión de SOS.

La similitud en cuanto a la activación de SOS entre estas dos enzimas, se tiene antecedente de que pueden tener una participación conjunta. Si bien se ha reportado en trabajos anteriores que cuando se encuentra ADN de cadena sencilla con extremos 5', va a ser reconocido y degradado por RecJ y convertirlo en un producto intermedio con un extremo saliente de ADN 3'. Aunque este extremo como es bien sabido no va a ser reconocido por RecJ, RecQ podría unirse a este intermedio e iniciar el desenrollamiento, generando un extremo 5' de ADN de cadena sencilla, que va servir de sustrato para que RecJ continúe con sus funciones. O bien, si existen extremos romos de ADN de cadena sencilla o saliente con extremo 3', RecQ ayuda a RecJ iniciar la degradación del ADN. Por lo tanto RecQ y RecJ cooperan para crear ADN de cadena sencilla para dar inicio a los respectivos mecanismos de reparación (Katsumi y Kowalczykowski).

La formación de productos intermedios generados por RecJ y RecQ, como la formación de un extremo 3' de ADN de cadena sencilla, sirven como sustrato para el complejo RecFOR, que tiene una participación previa a la activación de SOS, ya que ayuda a el ensamblaje de RecA, formando el nucleofilamento que dará inicio a la activación de SOS (Sawitzke y Stahl, 1992).

Por otra parte se sugiere que tanto RecJ como RecQ juegan un papel importante en la reanudación de la síntesis de ADN después de un daño inducido, como lo reporta Courcelle et al. (2003) en experimentos realizados con UV.

RecQ tiene como función conservada la restauración de las horquillas de replicación del ADN cuando se han detenido (Murray et al. 1997; Courcelle, et al. 1999), generando ADN de cadena sencilla, el cual, dependiendo de la cantidad de daño, puede dar inicio a la inducción de la respuesta SOS. De acuerdo a lo anterior se puede sugerir que las funciones RecQ son necesarias para poder generar la señal de inducción de SOS, y esto puede darse cuando la horquilla de replicación se ha bloqueado, induciendo la reparación del daño (Hishida, et al. 2004).

En reportes previos en experimentos en la vía RecFOR, que es necesario para la reparación de gaps de ADN de cadena sencilla, la helicasa RecQ y la exonucleasa RecJ trabajan de manera cooperativa para promover la degradación del ADN en las horquillas de replicación bloqueadas, permitiendo de ese modo que RecA se una a la cadena sencilla de ADN, y dar inicio a SOS (HARmon y Kowalczykowski, 1998; Coucelle y Hanawalt, 1999; Morimatsu y Kowalezykowski, 2003). Sin embargo, en otros estudios también se han observado que, en mutantes que dependen de la vía RecF para recombinación o supervivencia, RecJ juega un papel más crítico que RecQ para la activación de SOS (Lovett, et al. 1988).

Por su parte, RecJ es un mediador en la reparación por escisión de bases, degradando sitios abásicos o en el restablecimiento de horquillas de replicación que han sido bloqueadas (Wakamatsu, et al. 2010; Estinis y Bénédicte, 2008). Además, los análisis genéticos han establecido que RecJ juega un papel más importante en la recombinación de RecQ, posiblemente a que esta helicasa asume la responsabilidad de desenrollado en la molécula de ADN (Kantake, et al. 2002)

En la figura 24 se puede observar que el mutante IN1220 deficiente en el gen *xthA*, muestra menor actividad de la respuesta SOS en comparación con la cepa silvestre PQ30, lo que sugiere que este gen participa en la formación de ADN de cadena sencilla para la inducción de la respuesta.

Los sitios AP (apurínicos/apirimidinicos) se forman a partir de la hidrólisis del enlace N-glucosídico de 2-deoxiribonucleosidos, o bien por daño a las bases producidos por daño oxidativo (Cadet, et al. 2012). Estos sitios, son reparados eficientemente por la REB. El reconocimiento de los sitios AP es iniciado por la endonucleasa AP, codificada por *xthA*, que cataliza la incisión de ADN en los sitios AP, preparando al ADN para los pasos subsecuentes de la reparación, como la síntesis y ligación (Otterlei, et al. 2000).

De acuerdo al modelo propuesto, una de las causas para la activación de la respuesta SOS es mediante el daño producido a bases y rupturas de cadena sencilla, principalmente. La pérdida espontánea de bases de ADN, así como la eliminación de bases ADN dañadas por enzimas específicas dirigidas a distintas lesiones de base, crea sitiosapurínicos / apirimidinicos (AP) no codificantes y letales. Los sitios AP son el intermedio central en la reparación de escisión de base de ADN (BER) y deben ser procesados por endonucleasas AP (Mol, et al. 2000). De tal forma, que los sitios AP que se han generado, y que en la ausencia de *xthA*, no se pueden procesar de forma eficiente. Al no ser procesadas estas lesiones, no se puede continuar con los pasos posteriores de la reparación por escisión de bases, donde se estaría generando el ADN de cadena sencilla que daría paso a la activación de la respuesta SOS, trayendo como consecuencia efectos letales, que pueden estimarse en el porcentaje de supervivencia.

La endonucleasa AP también puede remover fragmentos con extremos 3', que surgen del ataque de radicales libres (Bernelot y Demple, 1989), otra vía por la cual se puede generar el ADN de cadena sencilla, que también sería la señal de inducción para SOS.

La poca actividad de la respuesta SOS en el mutante IN1220, se sugiere que puede deberse a la participación de otras enzimas como son la endonucleasa IV (*nfo*), que pueden sustituir a la endonucleasa AP codificada por *xthA*, sin embargo, en el proceso de reparación no es tan eficaz, ya que endonucleasa IV, solo puede reparar un 10% de los sitios AP producidos por el H₂O₂ (Hagensee y Moses, 1989). Cunningham et al. (1986), demostraron que dobles mutantes *nfo-xth* son más sensibles al peróxido de hidrógeno que cualquiera de los mutantes por separados, confirmando así que la endonucleasa IV tiene una pequeña participación en el procesamiento de los sitios AP, aunque no sea tan eficiente.

Referencias

1. Alegre, B. N. (2001) Reacción celular ante la radiación. *Radiobiología*. 1:9-11.
2. Anderson, P. (1995) *Caenorhabditis elegans* –modern biological analysis of an organism. *Mutagenesis*. Pp. 31-58.
3. Asaithamby, A. y Chen, D. J. (2011) Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutat. Res.* 711:87-99.
4. Atkins, J. (2007). Principios de Química, 3ª, España, Medica Panamericana. 169p.
5. Bassett, L. C. y Kushner, R. S. (1985). Spontaneous induction of Colicin E1 in *Escherichia coli* strains deficient in both Exonucleases I and V. *Journal of Bacteriology*. 164(3): 1362-1365.
6. Bedale, A. W., Inman, B. R. y Cox, M. M. (1993). A reverse DNA strand Exchange mediated by recA protein and Exonuclease I. *The Journal of Biology Chemistry*. 268(30):15004-15016.
7. Bernelot M. C. y Demple, B. (1989). Multiple DNA repair activities for 3'-deoxyribose fragments in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 17:587-600.
8. Bernstein, A. K., Gangloff, S. y Rothstein, R. (2010). The RecQ DNA helicasa in DNA repair. *Annu Rev Genet*. 44: 393-417.
9. Bernstein, A. K., Gangloff, S. y Rothstein, R. (2010). The RecQ helicases in DNA repair. *Annu. Rev. Genet*. 44:393-417.
10. Bjelland, S. y Seeberg, E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research*. 531:37-80.
11. Bolt, L. E., Jenkins, T., *et al.* (2016). Identification of *Escherichia coli* *ygaO* y *rpmG* as novel mitomycin C resistance factors implicated in DNA repair. *Bioscience Reports*. 36: 1-9.
12. Brown, T. A. (2007) Genomas, 3a, Buenos Aires, Medica Panamericana. 523-525 p.
13. Buchko, W. G., Wallace, S. S. y Kennedy, M. A., (2002). Letter to the editor: base excision repair: NMR backbone assignments of *Escherichia coli*

- formamidopyrimidine-DNA glycoylasa***. *Journal of Biomolecular.* 22:301-302.
- Casarett, A., (1968). *Radiation Biology.* Prentice-Hall, Englewood, New Jersey. 367p
14. Burdett V, Baitinger C, Viswanathan M, Lovett ST, Modrich P (2001) In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6765– 6770.
 15. Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol*, 3:3-8.
 16. Cadet, J. Douki, T. Gasparutto. D. y Ravanat, L.J. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research.* 531:5-23.
 17. Cadet. J., Loft, S., Olinski, R., Evans, D. M. Bialkowski, K., Wagner, R. J., Dedon, C. P., Moller, P., Greenberg, M. M. y Cooke, S: M. (2012) Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radic Res.* 46(4):1-27.
 18. Caruthers, J. M., McKay, D. B. (2002) Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:123-133.
 19. Castillo-Acosta, M. V., Ruiz-Pérez, M. L., Yang, W. González-Pacanowska, D. y Vidal, E. A. (2009). Identification of a residue critical for the excision of 3'-blocking ends in apurinic/apyridimidinic endonucleases of the Xth family. *Nucleic Acids Research.* 37(6):1829-1842.
 20. Cayuela, M. M. (1998) Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica.* 39(1):5-18.
 21. Chase, J. W., Rabin, A. B., Murphy, B. J., Stone, K. B. y Williams R. K. (1986). *Escherichia coli* exonuclease VII. Cloning and sequencing of the gene encoding the large subunit (*xseA*). *J. Biol. Chem.* 261:14929-14935.
 22. Cheng, K., Xu, H., *et al.* (2016). Structural basis for DNA 5'-end resection by RecJ. *eLife.* 1-21.
 23. Connelly, J. C., Kirkham, L. A. y Leach, D. R. (1998). The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7969–7974.

24. Courcelle, T. C., Chow, H. K., Casey, A. y Courcelle, J. (2006). Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*. *PNAS.org/cgi/doi*. 103(24):9154-9159.
25. Courcelle, J. and Hanawalt, P.C. (1999). RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 543–551
26. Courcelle, J., Crowley, D.J., and Hanawalt, P.C. 1999. Recovery of DNA replication in UV-irradiated *Escherichia coli* requires both excision repair and recF protein function. *J. Bacteriol.* 181: 916–922.
27. Courcelle, J., Donaldson, J.R., Chow, K.H., and Courcelle, C.T. (2003). DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science* 299: 1064–1067.
28. Cox, M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu. Rev. Genet.* 35:53-82.
29. Craig, N. R. y Hickson, D. I. (1991) Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Research.* 19(20):5519-5523.
30. Cunningham, R. P., Saporito, S. M., Spitzer, S. G. y Weiss, B. (1986). Endonuclease IV (*nfo*) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168:1120-1127.
31. Cunningham R. P, Saporito, S.M., Spitzer, S. G. Weiss, B. (1985). Endonuclease IV (*nfo*) mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168:1120-1227.
32. Demple, B. y Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63:915-948.
33. Demple, B., Halbrook, J. y Fung, D. (1983). *Escherichia coli xth* mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 153:1079-1082.
34. Devlin, M. T. (2008). Bioquímica, 4a, Ed. Reverté, Barcelona, España. 194-195; 37-43 p.
35. Dianov, G., Sedgwick, B., Daly, G., Olsson, M., Lovett, S., and Lindahl, T. (1994). Release of 5'-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Res.* 22: 993–998.

36. Dorado, M. C., Vargas, C., Rivas, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*. 46(6):229-235.
37. Drablos, F., Feyzi, E., Arne, A. P., Vaagbo, B. C., Kavli, B., Bratlie, S. M., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G. y Krokan, H. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 3:1380-1407.
38. Eccles, J. L., O'Neill P. y Lomax E. M. (2011). Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? *Mutation Research*. 711(1-2):134-141.
39. Fietsma, H., Akay, A. y Cuppen, E. (2008). Alkylation damage causes MMR-dependent chromosomal instability in vertebrate embryos. *Nucleic Acids Res*. 36:4047-4056.
40. Fléhard, M., Cortes, M., Répérant, M. y Germon, P. (2012) New role for the *ibeA* in H₂O₂ stress resistance of *Escherichia coli*. *Journals ASM. Org*. 94(17): 4550-4560.
41. Flibotte, S., *et al.* (2010) Whole-genome profiling of mutagenesis *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 185:431-441.
42. Foster, L. P. y Davis, F. E. (1987). Loss of an apurinic/apyrimidinic site endonuclease increases the mutagenicity of *N*-methyl-*N'*-nitrosoguanidine to *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 84:2891-2895.
43. Fu, D., Calvo, A. J. y Samson, D. L. (2013) Series: Genomic instability in cáncer balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*. 12(2):104-120.
44. Gillor, O., Vriezen, C. A. J. y Riley, A. M. (2009) The role of SOS boxes in enteric bactericin regulation. *Microbiology*. 154:1783-1792.
45. Gocke, E., Bürgin, H., Müller, L. and Pfister, T. (2009) Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicology*. 19:254-265.
46. Gonzalez-Flecha, B. y Demple, B. (1999). Role for *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 181(12): 3833-3836.
47. Greenspan, J., Xu, F. and Davidson L. R. (1988) Molecular analysis of ethyl methanesulfonate-induced reversion of a chromosomally integrated mutant shuttle vector gene in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*. 8(10):4185-4189

48. Hagensee, E. M. y Moses, E. B. (1989). Multiple pathways for repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 171(2):991-995.
49. Hanada, K., Iwasaki, M. Ihashi, S. y Ikeda, H. (2000). UvrA and UvrB suppress illegitimate recombination: synergistic action with RecQ helicase. *Proc Natl Acad USA*. 97(11):5989-5994.
50. Hanada, K., Ukita, T., Kohno, Y., Saito, K., Kato, J. y Ikeda, H. (1997). RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:3860-3865.
51. Harmon, F. G. y Kowalczykowski, C. S. (2001). Biochemical characterization of DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J. Biol. Chem.* 276:232-243.
52. Heyer, D. W. (2004). Damage signaling: RecQ Sends an SOS to you. *Current Biology*. 14:895-897.
53. Hishida, T., Yong-Woon, H., Shibata T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H. y Shinagawa, H. (2004). Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes&Development*. 18:1886-1897.
54. Hornback, L. M. y Roop II, M. R. (2006). The *Brucella abortus xthA-1* gene participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. *Journal of bacteriology*. 188(4): 1295-1300.
55. Ivancic-Bace, I., Salaj-Smic, E. y Brcic-Kostic, B. (2005). Effects of *recQ*, and *RecFOR* mutations on recombination in nuclease-deficient *recB recD* double mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:1350-1356.
56. Ivankovic, S. and Dermic, D. (2012). DNA end resection controls the balance between homologous and illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Plos one*. 7(6): 1-12.
57. Janion, C. (2008) Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*. 4(6): 338-344.

58. Janion, C., Sikora, A., Nowosielska, A. y Grzesiuk, E. (2003). *E. coli* BW535 a triple mutant for the DNA repair genes *xthA*, *nth* and *nfo*, chronically induces the SOS response. *Environ. Mol. Mutagen.* 41:237-242.
59. Jena, N. R. (2012). DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37:503-517.
60. Kantake N, Madiraju MV, Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) Escherichia coli RecO protein anneals ssDNA complexed with its cognate ssDNA-binding protein: A common step in genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24):15327–15332.
61. Katsumi , M. y Kowalczykowski, C. S. (2014). RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination. *Cross Mark PNAS PLUS.* 133-142.
62. Kirk, R. T. y Oiveras, M. B. (1978). Processivity of DNA exonucleases. *The Journal of Biological Chemistry.* 253(2):424-429.
63. Kow, Y. W. y Wallace, S. S. (1985). Exonuclease III recognizes urea residues in oxidized DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8354-8358.
64. Kowalczykowski, S. C. (2000). Initiation of genetic recomobination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* 25:156-165.
65. Krwawicz, J., Arczewska, K. D., Speina, E., Maciejewska, A.y Grzesiuk, E. (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Polon* 54: 413–434.
66. Kumiko, O., Katayama, H. y Ohgaki, S., (2002). Photoreactivation of Escherichia coli after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Applied and Environmental Microbiology.* 68:6029-6035.
67. Lahue, E. E. y Matson, W. S. (1990) Purified *Escherichia coli* F-factor Tray protein binds oriT. *J. Bacteriol.* 3:1385-1391.
68. Lavrik, O. L. (2011) DNA repair: a key mechanism stabilizing the genome. *J. Biosci.* 76(1):7.

69. LEstinis, R. y Bénédicte, M. (2008). UvrD and UvrD252 counteract RecQ, RecJ, and RecFOR in a *rep* mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190:5995-6001.
70. Liberi, G., Maffioletti, G., Lucca, C., Chiolo, I., Baryshnikova, A. , *et al.* (2005). Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication forks in *sgs1* mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev.*19:339–350.
71. Ljungquist, S. (1977). A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA*. *The Journal of Biological Chemistry*. 252(9):2808-2814.
72. López-Olmos, K., Hernandez, M. P., Contreras-Garduño, J. A., Robleto, E. A., Setlow, P., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M. (2012) Roles of endonuclease V, Uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA basedeamination-induced mutagenesis. *Journal Bacteriology*. 94(12):243-252.
73. Lovett, S. T, DeLuca, L. C. y Kolodner, R. D. (1988). The genetic dependence of recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*, 120(1):37-45.
74. Lovett, S. T. y Kolodner, D. R. (1989). Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. 86(8):2627-2631.
75. Lovett, T. S. (2011) The DNA exonucleases of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 4(2): 1-45.
76. Lu, D. y Keck, L. J. (2008). Structural basis of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein stimulation of exonuclease I. *PNAS. Org/cgi/doi*. 105(27):9169-9174.
77. Lu,D., Myers,A.R., George,N.P. and Keck,J.L. (2011) Mechanism of exonuclease I stimulation by the single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 39, 6536–6545.
78. Maddukuri, L., Dudzińska, D. y Tudek B. (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 4. The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mammalian cells. *Acta Biochim Polon* 54: 469–482.

79. Mao-wen, W., Zheng, Y., Jasti, P. V., Champeil, E., Tomasz, M., Wang, Y., Basu, K. A. y Tang, M. (2010). Repair of Mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Research*. 38(20):6976-6984.
80. Matson, W. S. (1986). *Escherichia coli* helicase II (*uvrD* gene product) translocates unidirectionally in a 3'-5' direction*. *The journal of biological Chemistry*. 261(22):10169-19175.
81. Milian, F. M., Gouveia, A. N., Gual, M. R., Echeimberg, J. O., Arruda-Neto, J. D., Garcia, F., Schenberg, A. C., Vicente, E. J., Rodriguez, O., Guzman, F. y Deppman, A. (2007) In vitro effects of gamma radiation from ⁶⁰Co and ¹³⁷Cs on plasmid DNA. *J.Biol. Phys.* 33:155-160.
82. Mishra, C., N. (2002). Nucleases: molecular biology and applications. Ed. John Wiley & Sons, Inc. pp. 246.
83. Mitra, S. Boldogh, I. Izumi, I. y Hazra, T. K. (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathways for repair of oxidative DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 38:180-190.
84. Mol, C. D., Hosfield, D. J. y Tainer, J. A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res.* 460(3-4):211-229.
85. Molineux IJ, Geftter ML (1975) Properties of the *Escherichia coli* DNA-binding (unwinding) protein interaction with nucleolytic enzymes and DNA. *J Mol Biol* 98:811– 825.
86. Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Lino, H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakawa, N., Masui, R. y Kuramitsu S. (2010) Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: A comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of Nucleic Acids*. 2010:1-32.
87. Murray, J. M., Lindsay, H. D., Munday, C. A. y Carr A. M. (1997). Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol. Cell. Biol.* 17:6868-6875.
88. Nieminuszczy, J. Mielecki, D. Sikora, A., Wrzesinski, M., Chojnacka, A., Krwawicz, J., Janion, C. y Grzesiuk, E. (2009). Mutagenic potency of MMS-induced

- 1meA/3meC lesions in *E. coli*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50:791-799.
89. Nieminuszczy, J. y Grzesiuk, E. (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. *Acta Biochimica Polonica*. 54: 459-468.
 90. Otterlei, M. Kavli, B. Standal, R. Skjelbred, C. Bharati, S. y Krokan, E. H. (2000). Repair of chromosomal abasic sites *in vivo* involves at least three different repair pathways. *The EMBO Journal*. 19(20):5542-5551.
 91. Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M. M. y Goodman, M. F. (2010) A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Critical Reviews in biochemistry and Molecular Biology*. 45(3):171- 184.
 92. Poljsak, B. (2011) Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011:1-15.
 93. Rajesh, P., Rastogi, R., Kumar, A., Tyagi, M. B. y Rajeshwar, P. S. (2010) Molecular mechanisms of Ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010:5-32.
 94. Rastogi, R., Kumar, A., Tyagi, M. B. y Sinha, R. (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*. 2010:1-24.
 95. Roh, S. A., Cook, L. A., *et al.* (2010). DNA cross-linking, double-strand breaks, and apoptosis in corneal endothelial cells after single exposure to mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49(11): 4837-4843.
 96. Sakai, A. y Cox, M. M. (2009) RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *The journal of Biological Chemistry*. 284(5):3264-3272.
 97. Sandeep, K., Maslov, S. y Sneppen, K., (2007), UV-Induced mutagenesis in *Escherichia coli* SOS response: A quantitative Model. *Plos computational Biology*. 3(3):452-462.
 98. Sandigursky, M. y Franklin, A. W. (1994). *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein stimulates the DNA deoxyribophosphodiesterasa activity of exonuclease I. *Nucleic Acids Research*. 22(2):247-250.

99. Sandigursky, M., Mendez, F., Bases, R. E., Matsumoto, T. and Franklin, W. A. (1996) Protein-protein interactions between the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein and exonuclease I. *Radiat. Res.*, 145, 619–623.
100. Santa-Gonzalez, G., Gomez-Molina, A., Arcos-Burgos, M., Meyer, N. J. y Camargo, M. (2016). Distinctive adaptative response to repeat exposure to hydrogen peroxide associated with up regulation of DNA repair genes and cell cycle arrest. *Redox Biology*. 9:124-133.
101. Sawitzke JA, Stahl FW (1992) Phage lambda has an analog of *Escherichia coli* recO, recR and recF genes. *Genetics* 130(1):7–16.
102. Sedgwick, B. (2004). Repairing DN-methylation damage, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5:148-157.
103. Sega, G. A. (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate, *Mutation Research/reviews in genetic Toxicology*, 134:113-142.
104. Serment, G. J., Breña-Valle, M. y Espinosa-Aguirre, J. J. (2008) *In vivo* role *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis*. 23(4) 317-323.
105. Serment-Guerrero, J., Breña-Valle, M. y Espinosa Aguirre, J. (2005) La Respuesta SOS en *Escherichia coli*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(2):99-105.
106. Sharma, S. (2011). Non-BDNA secondary structures and their resolution by RecQ helicases. *Journal of Nucleic Acids*. 125:211-226.
107. Sikora, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., Nieminuszczy, J., Wrzesínski, M. Grzesiuk, E. (2009). Lethal and mutagenic properties of MMS-generated DNA lesions in *Escherichia coli* cells deficient in BER and Alk-B directed DNA repair. *Mutagenesis*. 25(2):139-147.
108. Smith, G. R. (1988). Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol Rev.* 52(1):1-28.
109. Sumeet, S. *et al.* (2010) Analysis of Multiple Ethyl Methanesulfonate-Mutagenized *Caenorhabditis elegans* Strains by Whole-Genome Sequencing. *Genetics Society of America*. 185:417:450.

110. Svilar, D., Goellner, M. E., Almeida, H. K. y Sobol, R. (2011) Base excision repair and lesión- dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidants & Redox signaling*. 14(12): 2491-2507.
111. Taylor, F. A. y Weiss, B. (1982). Role of exonuclease III in the base excision repair of uracil-containing DNA. *Journal of Bacteriology*. 151(1):351-357.
112. Thoms, B. y Wackernagel, W. (1998). Interaction of RecBCD enzyme with DNA at double-strand breaks produced in UV-irradiated *Escherichia coli*: requirement for DNA end processing. *J. Bacteriol.* 180:5639–5645.
113. Thoms, B., Borchers, I. y Wackernagel, W. (2008). Effects of single-strand DNases ExoI, RecJ, ExoVII, and SbcCD on homologous recombination of *RecBCD*⁺ strains of *Escherichia coli* and roles of SbcB15 and XonA2 ExoI mutant enzymes. *Journal of Bacteriology*. 190(1):179-192.
114. Tronov, V. A., Konstatinov, E. M. y Kramarenko, L. L.,(2002). Role of excision mechanisms of DNA repair in induction of apoptosis. *Biochemistry*. 67(7):730-736.
115. Tubbs, L. J. y Tainer, J. A. (2010) Alkyltransferase-like proteins: molecular switches between DNA repair pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(22):3749-3762.
116. Tubbs, L. J., Latypov, V., Kanugula, S., Butt, A., Meilikishvili, M., Kraehenbuehl, R., Fleck, O., Marriott, A., Watson, A. J., Verbeek, B., McGown, G., Thorncroft, M., Santibanez-Koref, M. F., Millington, C., Arvai, A. S., Kroeger, M. D., Peterson, L. A., Williams, D. M., Fried, M. G., Margison, G. P., Pegg, A. E. y Weiguo, J. A. (2012) Endonuclease V: an unusual enzyme for repair of DNA deamination. *Cell. Mol. Life Sci.* 18 (12): 1222-1134.
117. Tujeta, N. y Tujeta R. (2004) Unraveling DNA helicases, motif, structure, mechanism and function. *Eur. J. Biochem.* 271:1849-1863.
118. Umezu, K., Nakayama, K. y Nakayama, H. (1990). *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5363-5367.
119. Van Brabant, A. J., Stan, R y Ellis, N. A. (2000) DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Rev. Genom. Hum. Genet.* 1:409-459.

120. Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, Modrich P, Lovett ST (2001) Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem* 276:31053–31058.
121. Viswanathan, M. y Lovett, S. T. (1999). Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3-5 DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.* 274:30094-30100.
122. Viswanathan, M. y Lovett, S. (1999) Exonucleases X of *E. coli*, a novel 3'-5' DNase and DNAQ superfamily member involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, 274:30094-30100.
123. Viswanathan, M. y Lovett, S. T. (1998). Single strand DNA specific exonucleases in *Escherichia coli*. Roles in repair and mutation avoidance. *Genetics*. 149:7-16.
124. Voet, D., Voet, G. y Pratt, C. W., 2007. Fundamentals of biochemistry. 2º, MedicaPanamericana. España. 896p.
125. Wakamatsu, T., Kitamura, Y., Kotera, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S. y Masui, R. (2010). Structure of RecJ exonuclease defines its specificity single-stranded DNA. *The journal of biological chemistry*. 285(13):9762-9769.
126. Wang, V. T-C. y Chang, Y. H. (1991). Effect of *rec* mutations on viability and processing of DNA damaged by Methylmethane sulfonate in *xth nth nfo* cells of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 180(2):774-781.
127. Watson, J. D. y Crick, F.H.C. (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*.171:737–738.
128. Wei, Y., Vollmer, C. A. y Larossa, A. R. (2001). In vivo titration of mitomycin C action by four *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 183(7): 2259-2264.
129. Weigle JJ. (1953). Induction of mutation in a bacterial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 39 (7): 628–36.
130. Wu, L. y Hickson, D. I. (2002). RecQ helicases and cellular responses to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 509:35-47.

131. Wyatt, D. M. y Pittman, L. D. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem. Res. Toxicol.* 19:1580-1594.
132. Xiang, W. y Maizels, N. (2001). Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Research.* 29(8):1765-1771.
133. Yang, P. H., *et al.* (2001) Whole-genome effects of ethyl methanesulfonate-induced mutation on nine quantitative traits in outbred *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 157:1257-1265.
134. Young-Hyun, Y., Dong-Hyun, L., Yoon, J. H., Nakajima, S., Yasui, A. y Pfeifer, G. P. (2001) Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 276:44688-44694.
135. Zharkov, D. O. (2008) Base excision repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:1544-1565.