

## TRABAJO DE REVISIÓN

Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear

# RESPUESTA SOS EN *E. COLI*. TEST DE INDUCCIÓN DE GENES SOS COMO ENSAYO DE MUTAGENICIDAD

Lic. Jorge L. Fuentes Lorenzo

### RESUMEN

Se presentan las particularidades de la respuesta SOS en células de *E. coli* y se realiza una descripción de los tipos de daños que inducen dicha respuesta. Se tratan además los aspectos relacionados con la regulación del circuito RecA/Lex A, así como de la señal inductora de la respuesta. Se resumen, de acuerdo con la bibliografía actualizada del tema, las funciones de los principales productos génicos de esta respuesta, en particular, RecA y UmuC y D, durante la restauración de la replicación y se discute un modelo que explica el fenómeno de la mutagénesis SOS en *E. coli*. Se hacen algunas consideraciones evolutivas de la mutagénesis SOS en bacterias de acuerdo con el modelo cairiano de evolución. Se explican las particularidades de los tests de inducción de genes SOS, así como su utilidad, tanto en la evaluación de efectos genotóxicos como en la prospección y estudio de mecanismos de acción de sustancias antimutagénicas, radioprotectoras, o ambas.

Descriptor DeCS: RESPUESTA SOS (GENETICA); REGULACION BACTERIANA DE LA EXPRESION GENICA; ESCHERICHIA COLI/ genética; PROTEINA REC A/ genética; PROTEINAS BACTERIANAS/ genética; MUTAGENESIS/ genética; REPLICACION DEL ADN; ADN BACTERIANO.

En las bacterias, la respuesta celular a agentes que dañan su cromosoma o bloquean su replicación se conoce como respuesta SOS, la que constituye una respuesta de emergencia celular a partir de la cual se inducen más de 20 productos génicos (sfiA, sfiB, uvrA, uvrB, uvrC, recA, umuC, umuD, polA, dinD, entre otros), y donde la expresión, la regulación y la modulación de dichos genes es mediada por el circuito recA/lexA. La proteína lexA es

el represor común a todos los genes SOS, incluido el recA; este último es uno de los productos génicos más importantes en las bacterias, involucrado en otras funciones vitales como recombinación, inducción de profagos bacterianos, inducción de filamentos celulares, entre otras.<sup>1</sup>

Una gran variedad de agentes dañantes pueden inducir la respuesta SOS. Los trabajos actuales concuerdan en que la proteína RecA puede ser activada por algún

intermediario común al metabolismo del ADN. Estudios "in vitro" han demostrado que la proteína RecA es activada en presencia de cofactores polinucleotídicos y cofactores mononucleotídicos como ATP y dATP, entre otros.

Se ha comprobado además, que regiones de simple cadena generadas por la ADN polimerasa III al sobrepasar el sitio dañado en el ADN activan la proteína RecA. Estas regiones son incrementadas por la actividad exonucleasa del complejo RecBC o generadas por la reparación de la escinucleasa UvrABC. Una vez activada RecA, auxiliada por las proteínas SSB, ésta puede promover el autoclivaje de LexA y de represores de varios profagos de *E. coli*, resultando en la expresión de los genes SOS.<sup>2</sup> Sin embargo, estudios recientes han sugerido la existencia de rutas de regulación alternativas a LexA para genes SOS, las cuales son igualmente dependientes de la activación de recA.<sup>3</sup>

## **RESTAURACIÓN DE LA REPLICACIÓN Y MUTAGÉNESIS SOS**

La función de restauración de la replicación por RecA es quizás la más importante y compleja de sus funciones para garantizar la supervivencia celular. Todas las evidencias experimentales sostienen la idea de que una amplia gama de rutas de reparación, estrechamente relacionadas y reguladas por el circuito RecA/LexA, son inducidas para restaurar la replicación del ADN. Un hecho que sostiene esta tesis es que el represor LexA tiene diferente afinidad por los promotores de los genes SOS (*uvr*, *rec*, *umu*, *din*, entre otros) involucrados en la reparación del ADN;<sup>4</sup> lo que sugiere que la proteína RecA no sólo desreprime estos genes sino que debe modular coordinadamente la ex-

presión de éstos en dependencia de las necesidades celulares. La recuperación celular es entonces producto de la acción conjunta de un grupo de proteínas controladas por el circuito RecA/LexA, las cuales forman un complejo enzimático capaz de replicar el ADN, aun en condiciones muy dañadas.<sup>5</sup>

Una función regulatoria importante de la proteína RecA, es la de promover el autoclivaje de la proteína UmuD a un producto UmuD'. Resultados obtenidos por Peat y colaboradores<sup>2</sup> sugieren que parte de este paso de activación es un cambio conformacional de la región N-terminal luego del autoclivaje, el cual permite que UmuD' establezca diferentes interacciones con el complejo RecA-filamento de ADN, lo que no es posible para UmuD. Esto ha sido demostrado en proteínas homólogas como LexA y la proteína cI del fago  $\lambda$ .

El modelo del mutosoma RecA-UmuC/D' explica la unión de la ADN polimerasa III con el sitio dañado.<sup>6</sup> Se ha visto que RecA altera la conformación del molde de ADN distorsionado, lo hace más accesible a la ADN polimerasa III e inhibe la actividad editora de esta, mientras UmuC/D' facilita el alargamiento de la cadena con el anclaje de la polimerasa, evitando su disociación del molde y favoreciendo su reasociación.

Dadas estas evidencias experimentales, la mutagénesis SOS puede ser explicada en 2 pasos fundamentales:

1. La ADN polimerasa III incorpora nucleótidos en una cadena lesionada, pero no puede continuar la síntesis.
2. La formación del mutosoma UmuC/D'-RecA debe permitir a la ADN polimerasa III, continuar la síntesis una vez pasada la lesión.<sup>7</sup>

La mutagénesis SOS se considera un estado especializado diferenciado para cam-

bio genético, donde éste ocurre no sólo como consecuencia de la reparación del daño, sino además por un incremento del nivel de mutación en las zonas no dañadas del ADN. Esto condicionó la polémica sobre la idea de "Evolución inducible" la cual fue la precursora inmediata de controversias alrededor de la mutación adaptativa, que tomó fuerzas cuando en 1988, Cairns y sus colegas<sup>8</sup> presentan la tesis de que las mutaciones ocurren con mayor frecuencia cuando el organismo está bajo presión selectiva para esa mutación, en aparente contradicción con la preexistente, donde las mutaciones surgen al azar y sin buscar una utilidad. En esta propuesta, el ambiente no sólo selecciona entre variantes preexistentes, sino que también interactúa con el organismo para generar variación sobre la cual actúa la selección. Este fenómeno de mutagénesis bajo selección ha sido llamado mutación inducida por selección, mutación adaptativa, entre otros.<sup>9</sup>

Según esta hipótesis, el ambiente interactúa con dichos procesos de diversas formas, condicionando una retroalimentación entre los generadores de diversidad genética y el ambiente que selecciona entre las variantes. La eficiencia de estos lazos de retroalimentación debe ser refinada por medio de muchos ciclos de selección, resultando el nivel de mutación de un arreglo entre fidelidad, economía y necesidad ocasional de generar variación. La variación locus-específica sensible al ambiente, ofrece una salida a este arreglo. En este sentido, la selección natural actúa más allá de alelos particulares, favoreciendo la generación de alelos con una alta probabilidad de pasar las pruebas de la selección ambiental.<sup>9</sup>

La rápida evolución de las bacterias a la resistencia a antibióticos y la evolución clonal en la oncogénesis involucran cambios genéticos concertados que pueden in-

cluir aspectos de mutación promovida por selección.

### **TEST DE INDUCCIÓN DE GENES SOS COMO ENSAYO DE MUTAGENICIDAD A CORTO PLAZO**

Se considera que la mayor parte de los eventos mutacionales en las bacterias están relacionados con la mutagénesis SOS.<sup>6</sup> Por ende, los ensayos que miden el nivel de inducción de genes SOS son un buen estimador del potencial mutagénico del inductor. Dichos ensayos resultan atractivos por su sensibilidad, sencillez y por la ventaja adicional de producir resultados en unas pocas horas, y de evaluar un número grande de muestras de forma semiautomática.<sup>10</sup>

El primer ensayo de inducción de genes SOS para la evaluación de efecto mutagénico, se conoce como SOS Chromotest,<sup>11</sup> el cual utiliza una cepa (PQ-37), construida por transducción especializada utilizando el fago Mu (Ap, lac) cts,<sup>12</sup> en el cual fueron incorporados los genes estructurales del operón lactosa de *E. coli* sin su promotor, para formar un fago de transducción especializada Mu-Lac, el cual transporta además el gen de la b-lactamasa, para resistencia a ampicilina. Al ocurrir la integración dentro del gen SOS en la dirección de la transcripción, los genes estructurales del operón lactosa se sitúan de forma tal que sólo se expresan a partir del promotor de este gen. Esta cepa es portadora de la fusión SfiA:: Mu (Ap,lac) cts, que condiciona que los genes lacZ y lacY estén bajo el control genético del operón SfiA de forma que la actividad específica  $\beta$ -galactosidasa sea un indicador de las funciones SOS. Dicho ensayo ha sido validado por estudios comparativos con el *test* de Ames, empleando una gama amplia de

mutágenos conocidos,<sup>11</sup> y actualmente es uno de los *tests* "in vitro" a corto plazo más utilizados para la detección de daño primario al DNA en muestras ambientales.<sup>13</sup> También se emplea el *test* Rec-Lac<sup>14</sup> por las facilidades que brindan las fusiones con este gen referente a niveles de expresión de la fusión y por el producto génico en sí, lo cual puede resultar una información de mucho valor.

En general, los *tests* de inducción de genes SOS, han mostrado probada utilidad

en la detección de efectos mutagénicos tanto de agentes químicos<sup>15</sup> como físicos.<sup>16,17</sup> Dichos ensayos han sido usados además, para el estudio y prospección de inhibidores de DNA girasas como quinolonas,<sup>18</sup> actividad oxidativa ambiental<sup>14</sup> y antimutagenicidad.<sup>19</sup> Actualmente, el *test* de inducción de genes SOS cuenta con una batería de cepas de *E. coli* que portan fusiones del fago Mu(Ap,lac)cts (u otros fagos) con otros genes SOS como umu, din, rec, uvr.

## SUMMARY

The particularities of the SOS response in *E. coli* cells are presented and a description of the types of damage inducing such a response is made. Some aspects connected with the regulation of the RecA/Lex A circuit, as well as with the signal inducing the response are also dealt with. According to the updated bibliography on this topic, the functions of the main genic products of this response, particularly RecA and UmuC and D, during the restoration of replication are summarized. A model that explains the phenomenon of SOS mutagenesis in *E. coli* is discussed, too. Some evolutive considerations of SOS mutagenesis in bacteria are made according to Cairns' evolution model. The specificities of the SOS induction genes tests and its usefulness in the evaluation of genotoxic effects and in the search and study of action mechanisms of antimutagenic and radioprotective substances, or both, are explained.

Subject headings: SOS RESPONSE (GENETICS); GENE EXPRESSION REGULATION, BACTERIAL; ESCHERICHIA COLI/ genetics; REC A PROTEIN/ genetics; BACTERIAL PROTEINS/ genetics; MUTAGENESIS/ genetics; DNA REPLICATION; DNA BACTERIAL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Little JW. Auto-digestion of LexA and phage  $\lambda$  repressors. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:1375-9.
2. Peat TS, Frank EG, McDonald JP, Levine AS, Woodgate R, Hendrickson WA. Structure of the UmuD' protein and its regulation in response to DNA damage. Nature 1996;380:727-30.
3. Asad L MBO, Almeida CEB de, Silva AB de, Asad NR, Leitao AC. Hydrogen peroxide induces the repair of UV-damaged DNA in *Escherichia coli*: a *lexA*-independent but *uvrA*-and *recA* dependent mechanism. Current Microbiol 1994;29:291-4.
4. Vericat JA, Guerrero R, Barbe J. Inhibition of the SOS response of *Escherichia coli* by the Ada protein. J Bacteriol 1988;170(3):1354-9.
5. Zhao X, Taylor JS. Mutation spectra of TA\*, the major photoproduct of thymidyl(3'-5')-deoxyadenosina, in *Escherichia coli* under SOS conditions. Nucl Acids Res 1996;24(8):1561-5.
6. EchoIs H, Goodman MF. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. Mutat Res 1990;236:301-11.
7. Bruck I, Woodgate R, McEntee K, Goodman MF. Purification of a soluble UmuD' Complex from *Escherichia coli*. Biol Chem 1996;271(18):10767-74.
8. Cairns J, Overbaugh J, Miller J. The origin of mutants. Nature 1988;355:142-5.
9. Thaler DS. The evolution of genetic intelligence. Science 1994;264(8):224-5.
10. Fuentes JL, Padrón E, Sol R del, Almeida E, Prieto E, Pérez N, et al. Induction of SOS response in *Escherichia coli* cells with gamma rays. Nucleus 1996;21:11-6.

11. Quillardet P, Huisman O, D'air R, Hofnung M. The SOS chromotest: direct assay of the expression of gen SfiA as a measure of genotoxicity of chemicals. *Biochimie* 1982;64:797-801.
12. Casadaban M, Cohen S. Lactose genes fused to an exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4530-3.
13. Le curieux F, Giller S, Gauthier L, Erb F, Marzin D. Study of the genotoxic activity of six halogenated acetonitriles, using the SOS chromotest, the ames-fluctuation test and the new micronucleus test. *Mutat Res* 1994;341:1-15.
14. Nunoshiba T, Nishioka H. Rec-lac test for detecting SOS-inducing activity of environmental genotoxic substances. *Mutat Res* 1991;254:71-7.
15. Ohta T, Nakamura N, Moriya M, Shirasu Y, Koda T. The SOS function inducing activity of chemical mutagens in *E. coli*. *Mutat Res* 1984;131:101-9.
16. Kosubek S, Ogievetskaya MM, Krasavin EA, Drasil V, Soska J. Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after irradiation by means of the SOS Chromotest. *Mutat Res* 1990;230:1-7.
17. Koudela K, Ryznar L, Kosubek S, Slotva J. Induction of SOS repair by ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 1992;31:343-8.
18. Clerch B, Bravo JM, Llagostera M. Efficiency of Muc AB and *E. coli* Umu DC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*: effects of Muc A and Umu D processing. *Mutat Res* 1996;349:201-8.
19. Gomes EM, Sauto PRF, Felzenszwalb-I. Shark cartilage containing preparation protects cells against hydrogen induced damage and mutagenesis. *Mutat Res* 1996;367:203-8.

Recibido: 26 de diciembre de 1997. Aprobado: 24 de septiembre de 1998.

Lic. Jorge L. Fuentes Lorenzo. Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear. Calle 30 # 502 entre 5ta. y 7ma. Apartado postal 6122. Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (537)-221518, (537)-331188. Correo electrónico: jl fuentes @ ceaden. edu.cu.