

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO B SOBRE LA
SUPERVIVENCIA Y LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS EN ESTIRPES
BACTERIANAS DEFICIENTES PARA LAS NUCLEASAS REC J Y EXO I**

ELKE TATJANA ARISTIZÁBAL TESSMER



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2014**

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO B SOBRE LA
SUPERVIVENCIA Y LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS EN ESTIRPES
BACTERIANAS DEFICIENTES PARA LAS NUCLEASAS REC J Y EXO I**

ELKE TATJANA ARISTIÁBAL TESSMER

Pasantía de Investigación, presentado como requisito para optar al título de:

Bióloga

Director

Ph. D. JORGE LUIS FUENTES LORENZO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2014**

DEDICATORIAS

A mi familia, Javier Mauricio Villamizar Cújar, Julia Orgel y mis amigos.

Elke Tatjana Aristizabal Tessmer

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander, por dar me la oportunidad de hacer parte del grupo de investigación y de realizar la Pasantía de Investigación.

A Nathalia Quintero, por su apoyo y sus consejos durante el desarrollo de la Pasantía.

Al Ph. D. Jorge Luis Fuentes, por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender en el laboratorio de Microbiología.

A mi familia por su apoyo moral, económico y por su amor.

A Javier Villamizar, por su constante apoyo, amistad y amor.

A cada una de las personas que colaboró con la realización del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 CEPAS DE <i>E.coli</i> UTILIZADAS EN EL TRABAJO Y PRUEBAS PRELIMINARES.....	18
2.2 CONDICIONES DE CULTIVO	19
2.3 CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE LAS ESTIRPES CELULARES.....	19
2.4 CURVAS DE INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS DE LAS ESTIRPES CELULARES.....	20
2.4.1 ENSAYO ENZIMÁTICO β -GALACTOSIDASA (β -G).....	21
2.4.2 ENSAYO ENZIMÁTICO FOSFATASA ALCALINA (FA).....	21
2.4.3 CÁLCULO DEL FACTOR DE INDUCCIÓN SOS.....	22
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	23
3. RESULTADOS	24
3.1 RADIOSENSIBILIDAD DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS A RUV-B.....	24

3.2 DOSIS LETAL DEL 50% (DL50) DE LAS TRES CEPAS.....	25
3.3 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS EN LAS ESTIRPES BACTERIANAS IN400, IN900 Y PQ30 FRENTE AL TRATAMIENTO CON RUV-B	26
4. DISCUSIÓN.....	28
5. CONCLUSIONES.....	32
6. RECOMENDACIONES.....	33
7. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Supervivencia (%) de las estirpes bacterianas IN400, IN900 y PQ30 a la RUV-B.....	25
Figura 2. Cinética de inducción de la respuesta SOS en las estirpes bacterianas IN400, IN900 y PQ30 frente al tratamiento con RUV-B.....	27

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en el trabajo	18
Tabla 2. Valores promedios de DL_{50} y sus correspondientes errores estándares para las estirpes bacterianos estudiados.....	25

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. ANOVA de una vía.....	44
Anexo B. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa IN400.....	44
Anexo C. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa IN900.....	45
Anexo D. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa PQ30.....	45

RESUMEN

TITULO:

EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA TIPO B SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS EN ESTIRPES BACTERIANAS DEFICIENTES PARA LAS NUCLEASAS REC J Y EXO I *

AUTOR:

Elke Tatjana Aristizábal Tessmer**

Palabras claves:

E.coli, SOS chromotest, radiación UV-B, radiosensibilidad, daño genético, nucleasa.

DESCRIPCIÓN

La radiación UV-B se considera el componente de la radiación solar de mayor relevancia biológica, dado mayormente por los efectos genotóxicos perjudiciales sobre los organismos vivos. Para conocer la importancia de las exonucleasas RecJ y ExoI en la reparación de lesiones del ADN, causadas por radiación UV-B, se realizaron ensayos de radiosensibilidad con mutantes de *Escherichia coli* defectivas para estos genes exonucleasa, bajo diferentes dosis de RUV-B. Adicionalmente se calculó el DL₅₀ de cada cepa. Posteriormente se realizó el SOS Chromotest para las cepas isogénicas. La cepa IN400 deficiente del gen *recJ*, que codifica para la exonucleasa RecJ fue significativamente más radiosensible que la cepa salvaje PQ30, indicando su importancia en la participación de los mecanismos que reparan daños genéticos producidos por RUV-B; esto fue confirmado por la inducción de la respuesta SOS para el rango de dosis entre 0,001 y 0,007 J/cm², la cual resultó significativamente mayor que la estirpe salvaje. La estirpe celular IN900 deficiente del gen *xonA*, que codifica para la exonucleasa ExoI también fue más sensible que PQ30, aunque no significativamente; esto indica una importancia moderada en la reparación de lesiones genéticas causadas por RUV-B. La inducción de la respuesta SOS de la estirpe IN900 para dosis mayores a 0,006 J/cm² fue significativamente menor que en la estirpe salvaje PQ30, sugiriendo que la ExoI puede estar implicada en la generación de regiones de cadenas simples que resultan en la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli*.

* Pasantía de Investigación.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Pregrado en Biología. Director: Ph. D. Jorge Luis Fuentes Lozano

ABSTRACT

TITLE:

EFFECT OF THE ULTRAVIOLET RADIATION TYPE B ON SURVIVAL AND INDUCTION OF THE SOS RESPONSE IN BACTERIAL STRAINS DEFICIENT FOR THE NUCLEASES REC J AND EXO I*

AUTHORS:

Elke Tatjana Aristizábal Tessmer**

Key Words:

E.coli, SOS Chromotest, UV-B radiation, radiosensitivity, genetic damage, nuclease.

DESCRIPTION

UV-B radiation is considered to be the component of solar radiation with the highest biological relevance, mainly because of the harmful genotoxic effects on living organisms. In order to get to know the importance of the exonucleases RecJ and ExoI in DNA lesion repair, radiosensitivity trials with *Escherichia coli* mutants, defective for these exonuclease genes were performed under different doses of RUV-B. Additionally the LD₅₀ was calculated for each strain. Subsequently the SOS Chromotest was performed for the isogenic strains. The strain IN400, deficient of the *recJ* gene, which encodes for the exonuclease RecJ was significantly more radiosensitive than the wild type strain PQ30, indicating its importance in the participation in mechanisms that repair genetic damage produced by UVR-B; this was confirmed by the induction of the SOS response for the dose range between 0,001 and 0,007J/cm², that resulted being significantly higher than the wild type strain. The cellular strain IN900, deficient of the *xonA* gene, which encodes for the exonuclease ExoI was also more sensitive than PQ30, although not significantly; that indicates a moderate importance in genetic lesion repair, caused by UVR-B. The induction of the SOS response of the strain IN900 for doses higher than 0,006J/cm² was significantly lower than the wild type strain PQ30, suggesting that ExoI could be involved in the creation of single stranded regions, which result in the induction of the SOS response in *Escherichia coli*.

* Internship of Investigation.

** Science faculty. Department of Biology. Degree of Biology. Director: Ph. D. Jorge Luis Fuentes Lozano

INTRODUCCIÓN

El estudio de los efectos biológicos de la radiación ultravioleta gana cada día mayor relieve dado mayormente por los efectos genotóxicos perjudiciales que tiene la sobreexposición a la radiación solar sobre los organismos vivos [Kozmin *et al.*, 2003; Svobodová *et al.*, 2003; González-Púmariega *et al.*, 2009;]. La radiación ultravioleta tipo B (RUV-B) se considera el componente de la radiación solar de mayor relevancia biológica [Perdiz *et al.*, 2000]. La RUV-B induce daños en la molécula de ADN siendo los dímeros de pirimidina *cis-syn* ciclobutano (CPD) y el fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP), los tipos más frecuentes [Mitchell, 1988]. A pesar de que la RUV-B es mayormente filtrada por la capa de ozono (solo llega un 5%), el efecto carcinogénico de la radiación solar es mayormente asociado con este componente [Perdiz *et al.*, 2000; Matsumura y Ananthaswamy, 2002; Zaidi *et al.*, 2008; Tsatsou *et al.*, 2012].

En bacterias la exposición a RUV induce una respuesta celular de estrés genotóxico conocida como respuesta SOS [Witkin, 1976]. Durante esta respuesta, se inducen un grupo de aproximadamente 40 genes [Courcelle *et al.*, 2001; Quillardet *et al.*, 2003], regulados bajo el circuito de las proteínas RecA/LexA [Higashitani *et al.*, 1995; Serment-Guerrero *et al.*, 2008]; entre cuyas funciones se encuentran: la reparación del daño genético [Walker, 1985; Anderson y Kowalczykowski, 1997; Morimatsu y Kowalczykowski, 2003; Dillingham y Kowalczykowski, 2008; Persky y Lovett, 2008; Bichara *et al.*, 2011; García-González *et al.*, 2013; Hishida *et al.*, 2013], la síntesis trans-lesión [Echols y Goodman, 1990], la restauración de la replicación del genoma [Courcelle *et al.*, 2001; McGlynn y Lloyd, 2002; Rangarajan *et al.*, 2002; Courcelle *et al.*, 2003; Chow y Courcelle, 2004, 2007; Heller y Mariani, 2006; Bichara *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2007; Al-Hadid *et al.*, 2008; Bachrati y Hickson, 2008] y el control de la división celular [Huisman & D'Ari, 1981; Opperman *et al.*, 1999]. En su conjunto,

las funciones antes mencionadas garantizan la sobrevivencia celular [Krishna *et al.*, 2007; Janion, 2008].

El daño genético producido por la RUV-B en *Escherichia coli* es reparado mayormente mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos llevado a cabo por el complejo exonucleolítico UvrABC/D; el cual elimina los CPD y los 6-4PP del ADN celular [Sinha & Häder, 2002]. Recientes estudios [Serment-Guerrero *et al.*, 2008], han mostrado la importancia de las exonucleasas, que degradan las cadenas simples de ADN (ssDNA, de sus siglas en inglés) como RecJ y ExoI para la reparación del daño genético y para la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli* respectivamente; luego del tratamiento con radiación gamma. La exonucleasa RecJ degrada ssDNA en la dirección 5´-3´ [Lovett y Kolodner, 1989] mientras que la exonucleasa I (ExoI) degrada en la dirección 3´-5´ [Lehman y Nussbaum, 1964]. Ambas enzimas han sido asociadas con los siguientes mecanismos de reparación del daño en el ADN: reparación de errores en el apareamiento de bases [Burdett *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006] , reparación por escisión de bases [Dianov *et al.*, 1994; Breyer y Matthews, 2000; Wakamatsu *et al.*, 2010] y reparación mediante recombinación homóloga [Kushner *et al.*, 1971; Lovett y Clark, 1984; Phillips *et al.*, 1988; Razavy *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 2007; Morimatsu *et al.*, 2012]. Varios estudios han mostrado que las nucleasas que degradan ssADN, juegan diferentes roles en los mecanismos de recombinación y de reparación del daño genético inducido por la RUV [Kushner *et al.*, 1971; Lieberman y Witkin, 1983; Phillips *et al.*, 1988; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Viswanathan y Lovett, 1999]. La exonucleasa I (ExoI) y la exonucleasa RecJ participan junto con el complejo exonucleolítico RecBCD (ExoV) en la reparación por recombinación del daño producido por RUV en *Escherichia coli* [Thoms y Wackernagel, 1998; Viswanathan y Lovett, 1998; Đermić, 2006; Thoms *et al.*, 2008]. La exonucleasa RecJ además permite la acción del complejo recFOR en el sitio dañado por RUV [Courcelle y Hanawalt, 1999; Courcelle y Hanawalt, 2001;

Chow y Courcelle, 2004], la reparación del daño genético, la restauración de la replicación del genoma [Courcelle *et al.*, 2003; Heller y Mariani, 2006; Bichara *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2007; Bachrati y Hickson, 2008; Rudolph *et al.*, 2008] y resultó ser esencial para la inducción de la respuesta SOS en células mutantes (*recB*) de *Escherichia coli* donde fue introducida una rotura de doble cadena de ADN [Vlašić *et al.*, 2008, 2011].

El presente estudio, tiene como objetivo estudiar la radiosensibilidad y la inducción de la respuesta SOS en estirpes de *Escherichia coli* deficientes para la actividad exonucleasa RecJ y Exol que son expuestas a RUV-B.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la radiosensibilidad a RUV-B de estirpes bacterianas proficientes y deficientes para actividad exonucleasa del ADN.
- Estudiar la cinética de inducción de la respuesta SOS frente a la RUV-B en las estirpes bacterianas mediante el ensayo SOS Chromotest.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CEPAS DE *E.coli* UTILIZADAS EN EL TRABAJO

Las cepas usadas en el presente estudio y sus correspondientes genotipos son listadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en el trabajo.

Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en el presente trabajo			
Cepa	Genotipo	Función	Fuente/referencia
PQ30	<i>F⁻, thr, leu, his, pyrD, thi, trp::MuC⁺, srl::Tn10, rpoB, sfiA::MuΔ(Ap lacZ), cts, lac ΔU169, galE, galY, phoC. wt</i>	Salvaje	Quillardet y Hofnung, 1985
IN400	Igual a PQ30, pero <i>recJ284::Tn10</i>	Deficiente para la actividad RecJ (exonucleasa simple cadena 5'-3')	Breña-Valle y Serment-Guerrero, 1998
IN900	Igual a PQ30, pero <i>ΔxonA300::cam</i>	Deficiente para la actividad Exol (exonucleasa simple cadena 3'-5')	Serment-Guerrero <i>et al.</i> , 2008

Las cepas IN400 e IN900 fueron desarrolladas y gentilmente suministradas por el Dr. Jorge Serment Guerrero del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares de

México [Breña-Valle y Serment-Guerrero, 1998; Serment-Guerrero *et al.*, 2008]. La cepa PQ30 fue desarrollada y suministrada por el Dr. Phillipet Quillardet del Instituto Pasteur de Francia.

2.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Las estirpes bacterianas se cultivaron durante toda la noche (15 h) en medio Luria-Bertani (10 g Triptona/L, 5 g Extracto de Levadura/L, 10 g Cloruro de Sodio/L, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (17 µg/mL), bajo condiciones de agitación y a una temperatura de 37 °C. Para ello, se tomó una alícuota (200 µl) de la cepa conservada y se inoculó en 20 mL de medio Luria-Bertani (LB). Al día siguiente, el cultivo se diluyó en medio fresco (4 mL de cultivo crecido en 40 mL de LB para ensayos de radiosensibilidad y 2 mL de cultivo crecido en 20 mL de LB para ensayos SOS) suplementando nuevamente con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (17 µg/mL) y luego se dejó crecer bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente hasta una densidad óptica DO_{600nm} de 0.40.

2.3 CURVAS DE SOBREVIVENCIA DE LAS ESTIRPES CELULARES

Alícuotas (7 ml) de cultivos de cada estirpe crecidos hasta una DO_{600nm} de 0.40 ($\sim 2 \times 10^8$ células/ml), fueron dispensadas en cajas Petri (diámetro de 8,9 cm) e irradiadas a diferentes dosis de RUV-B en una cámara de irradiación UVA/UVB modelo BS-02 (Dr. Grobel UV-Elektronik GmbH, Alemania). Las dosis de RUV-B ensayadas estuvieron entre 0.001 y 0.5 J/cm²; las cuales se verificaron mediante el controlador de radiación modelo UV-MAT de la misma casa comercial. Las suspensiones celulares irradiadas fueron diluidas en suero fisiológico (0.75% NaCl) en rangos de diluciones ajustadas para cada dosis de radiación ensayada. Por último, 0.1 ml de las diluciones fueron sembradas en cajas de Petri con Agar y

medio LB para contar al día siguiente las unidades formadoras de colonias por cada dosis de radiación. Se desarrollaron tres curvas dosis-efecto independientes con tres replicas cada uno. La letalidad celular fue expresada en porcentajes de sobrevivencia celular.

2.4 CURVAS DE INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS DE LAS ESTIRPES CELULARES

Las alícuotas (4,5 ml) de cultivos de cada estirpe crecidos hasta una DO_{600nm} de 0.40 fueron mezcladas con 18 mL de LB 2x para obtener una dilución 1:5. De esta mezcla se tomaron 12 mL y se suspendieron en 12mL de agua destilada. Se transfirieron alícuotas de 2122 μ L en cajas de Petri (diámetro de 4,9 cm) y se irradiaron usando similares condiciones que los experimentos de sobrevivencia celular. El rango de dosis de radiación usado para la inducción de la respuesta SOS en cada estirpe bacteriana se determinó experimentalmente, considerando como máximo valor la dosis letal media (LD_{50}) de la estirpe silvestre PQ30 según lo indicado por [Randhawa, 2009]. Alícuotas de 200 μ L de células irradiadas en cada tratamiento, del blanco y del control no irradiado fueron transferidas a tubos Eppendorf estériles e incubadas durante 2 horas a 37°C en una incubadora de alta precisión de marca Eppendorf Termomixer (Sao Paulo, Brazil). En todos los casos, se desarrollaron tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno. Los ensayos enzimáticos β -galactosidasa y fosfatasa alcalina se desarrollaron en microplacas para ELISA de 96 pozos (Brand GMBH, Alemania), siguiendo los procedimientos descritos a continuación:

2.4.1. ENSAYO ENZIMÁTICO β -GALACTOSIDASA (β -G)

En cada pocillo de las microplacas se mezclaron 135 μ L de Buffer Z (110 mM mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM Mg_2SO_4 , 0.1% SDS, 40 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0) con 15 μ L de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a 37°C para que ocurriera la lisis celular. La reacción enzimática se inició con la adición de 30 μ L de solución del sustrato de la β -galactosidasa (4 mg/mL ONPG en buffer fosfato: 61 mL Na_2HPO_4 0.1 M, 39 mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, pH 7) y se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de color. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 μ L de la solución de Na_2CO_3 (1M).

2.4.2. ENSAYO ENZIMÁTICO FOSFATASA ALCALINA (FA)

En cada pocillo de las microplacas, se mezclaron 135 μ L de Buffer T (1 M Tris, 0,1% SDS, pH 8.8) con 15 μ L de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a 37°C para que ocurra la lisis celular. La reacción enzimática se inició con la adición de 30 μ L de solución del sustrato de la fosfatasa alcalina (4 mg/mL PNPP en T buffer) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo de color. La reacción se detiene añadiendo 50 μ L de la solución de HCl (2,5M) y se estabiliza pH adicionando 50 μ L de solución TRIS (2M).

Las lecturas de cada ensayo enzimático se desarrollaron a una densidad óptica de 420 nm ($\text{DO}_{420\text{nm}}$) usando un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo SCIENTIFIC Inc., Milford, MA, USA).

Las unidades enzimáticas de la actividad β -G y FA serán calculadas según se indica a continuación:

$$\text{Unidades enzimáticas} = \frac{1000 * A_{420}}{t}$$

Donde A_{420} es la medida de la densidad óptica de la mezcla de incubación leída a 420_{nm} y t es el tiempo de incubación en presencia del sustrato (ONPG o PNPP) en minutos.

La relación (R) de las unidades enzimáticas de β -G y FA refleja la inducción del gen *suIA*, incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas.

$$R = \frac{\text{Unidades } \beta - \text{galactosidasa}}{\text{Unidades fosfatasa alcalina}}$$

2.4.3 CÁLCULO DEL FACTOR DE INDUCCIÓN SOS

Se empleó como criterio de genotoxicidad el factor de inducción SOS (FI), el cual representa los datos de inducción del gen *suIA* normalizados en cada tratamiento y se consideran una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN. El FI se calculó como sigue:

$$FI = \frac{R_c}{R_0}$$

Donde R_c son las células tratadas y R_0 son las células no tratadas.

La interpretación de los resultados se realiza como sigue: *i)* “no genotóxico”, valores de FI menores de 1.5 *ii)* “inconclusos”, valores de FI entre 1.5–2.0 y *iii)* “genotóxico”, valores mayores de 2.0 y una clara relación dosis-efecto.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

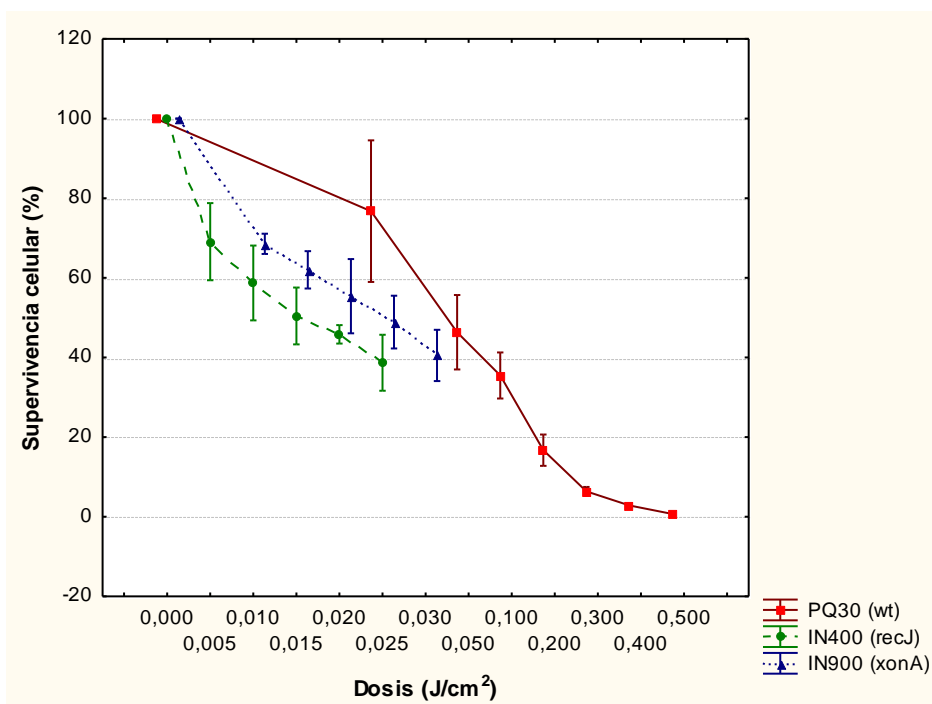
La normalidad de los datos se evaluó usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, la homogeneidad de varianzas mediante una prueba Levene. Los datos de FI para los tratamientos que no mostraron normalidad fueron transformados para su comparación usando el transformado logaritmo neperiano (LN). Se calcularon los valores promedio del factor de inducción (FI) y sus correspondientes errores estándar. Los valores medio de FI para los diferentes tratamientos (dosis) se compararon con el control no irradiado en todas las cepas y con los respectivos FI's de la cepa silvestre mediante una prueba de Tukey. Para los análisis estadístico se usaron los programas SPSS (versión 13.0 para Windows, SPSS Inc (2005), Chicago, USA) y STATISTICA V.6 (versión 6.0, para Windows, StatSoft Inc (2003), Tulsa, USA). Se realizaron 3 curvas para cada cepa con sus respectivos ajustes, mostrando la relación entre Probits y el Logaritmo de las dosis (Randhawa, 2009). A partir de estas curvas de ajuste se calculó el DL50 medio y el error estándar para cada cepa. Las curvas de ajustes se realizaron Microsoft Excel (versión para Windows, Microsoft (2010), Washington, USA).

3. RESULTADOS

3.1 RADIOSENSIBILIDAD DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS A LA RUV-B.

En la Figura 1, se muestran los valores de sobrevivencia celular de las diferentes estirpes bacterianas luego del tratamiento con distintas dosis de RUV-B. La estirpe proficiente para actividad exonucleasa (PQ30) mostró la menor sensibilidad al tratamiento con RUV-B, con un valor de $DL_{50} = 0,054 \pm 0,022$ (Tabla 2). Para todo el rango de dosis estudiado, las estirpes deficientes para actividad exonucleasa RecJ (IN400) y ExoI (IN900) mostraron valores relativamente menores que la estirpe salvaje (PQ30). Sin embargo, el cálculo del DL_{50} para las estirpes IN400 ($0,015 \pm 0,004$) e IN900 ($0,023 \pm 0,013$) mostró que solo la estirpe IN400 (*recJ*) resulta significativamente menor ($p \leq 0,05$) a la estirpe salvaje (Tabla 2); indicando la importancia de este gen para la sobrevivencia celular en *Escherichia coli*.

Figura 1. Supervivencia celular (%) de las estirpes bacterianas IN400, IN900 y PQ30 a la RUV-B.



3.2 DOSIS LETAL DEL 50% (DL₅₀) DE LAS TRES CEPAS

Tabla 2. Valores promedios de DL₅₀ y sus correspondientes errores estándares para las estirpes bacterianos estudiados.

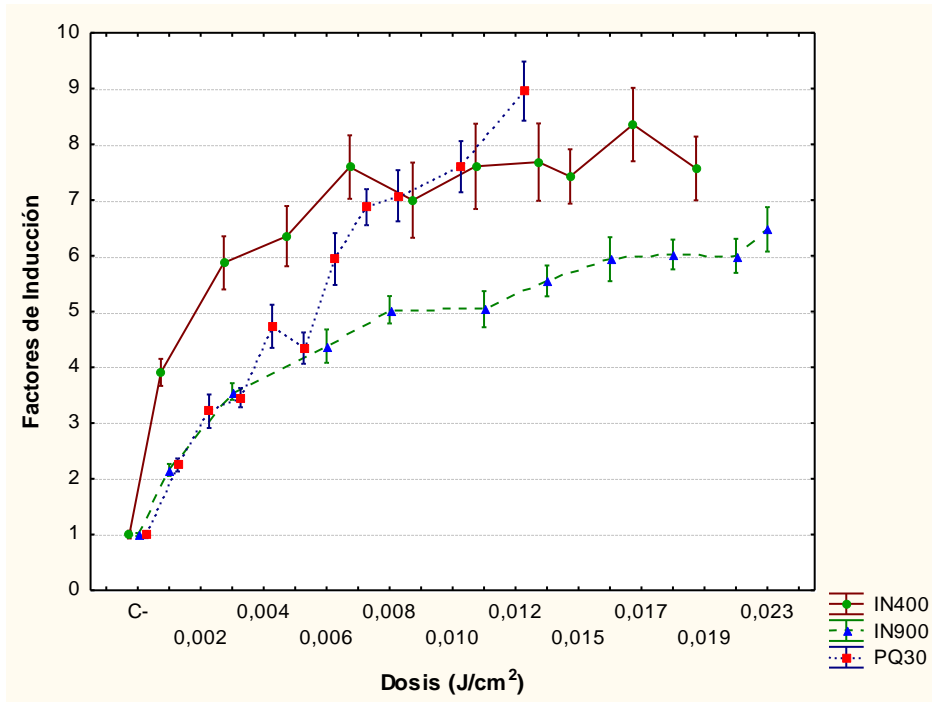
Cepa	DL ₅₀ ± EE
PQ30 (<i>wt</i>)	0,054 ± 0,022
IN400 (<i>recJ</i>)	0,015 ± 0,004 *
IN900 (<i>xonA</i>)	0,023 ± 0,013 n.s

(*) valores significativo para una $p \leq 0,05$

3.3 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS EN LAS ESTIRPES BACTERIANAS IN400, IN900 Y PQ30 FRENTE AL TRATAMIENTO CON RUV-B

En la Figura 2 se muestra la cinética de inducción SOS frente al tratamiento con RUV-B en las diferentes estirpes estudiadas. En todos los casos, el valor de FI fue significativo ($p \leq 0,05$) respecto al control no irradiado a partir de una dosis de $0,001\text{J}/\text{cm}^2$ (Anexo 9.2-9.4). Desde la primera dosis de RUV-B ($0,001\text{J}/\text{cm}^2$) las tres cepas muestran FI's $> 2,0$ (Figura 2); indicando niveles de genotoxicidad. Comparando con la estirpe salvaje (PQ30), la estirpe IN400 (*recJ*) mostró niveles de inducción SOS superiores para el rango de dosis comprendido entre $0,001$ y $0,007\text{ J}/\text{cm}^2$ (Figura 2) sugiriendo que esta enzima contribuye a la reparación del daño genético producido por la RUV-B. Por el contrario, la estirpe IN900 (*xonA*) mostró niveles de inducción SOS inferiores a la estirpe salvaje (PQ30) para dosis superiores a $0,006\text{J}/\text{cm}^2$; sugiriendo que la enzima Exonucleasa I contribuye a la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli*.

Figura 2. Cinética de inducción de la respuesta SOS en las estirpes bacterianas IN400, IN900 y PQ30 frente al tratamiento con RUV-B.



4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se estudió la radiosensibilidad y la inducción de la respuesta SOS en estirpes de *Escherichia coli* deficientes para la actividad exonucleasa RecJ y Exol; las cuales fueron expuestas a RUV-B.

Comparando con la estirpe proficiente para las mencionadas actividades exonucleasas (PQ30), se pudo constatar que la estirpe con deficiencia genética para la actividad exonucleasa RecJ (IN400) es relativamente más radiosensible (Figura 1); indicando su importancia en la participación de los mecanismos que reparan daños genéticos producidos por RUV-B en correspondencia con lo observado previamente en *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Deinococcus radiodurans* [Viswanathan y Lovett, 1998; Skaar *et al.*, 2002;].

En la estirpe celular IN400 la inducción de la respuesta SOS para el rango de dosis entre 0,001 y 0,007 J/cm² resultó significativamente mayor que la estirpe salvaje; confirmando la importancia de la exonucleasa RecJ para la reparación del daño genético producido por RUV-B en células de *Escherichia coli*. Este último hallazgo, contrasta con lo observado cuando la estirpe IN400 es irradiada con radiación gamma [Serment-Guerrero *et al.*, 2008]. Estos autores encontraron niveles de inducción SOS para IN400 significativamente menores que la estirpe salvaje; sugiriendo la participación de la exonucleasa RecJ en la conversión de roturas de doble cadena a regiones de cadenas simples que resulten en la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli* [Serment-Guerrero *et al.*, 2008; Vlašić *et al.*, 2008, 2011]. Diferencias en la naturaleza del daño inducido por la RUV-B y por la radiación gamma, podrían explicar los contrastantes resultados obtenidos en el presente estudio y los desarrollados por estos autores.

RecJ es una exonucleasa que degrada ADN de cadena simple en dirección 5´- 3´ [Lovett y Kolodner, 1989; Yamagata *et al.*, 2002] y ha sido identificada y en la vía de reparación por recombinación homóloga [Lovett y Clark, 1984; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Michel *et al.*, 2007; Morimatsu *et al.*, 2012].

La principal vía de reparación del daño del ADN causado por RUV-B es la escisión de nucleótidos, regulada por el complejo UvrABC/D y se encarga principalmente de la reparación de los dímeros de pirimidina *cis-syn* ciclobutano (CPD) y del fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona [Brash *et al.*, 1991; Sinha y Häder, 2002]. Sin embargo trabajos con mutantes deficientes para la reparación del ADN bajo radiación UV han demostrado eventos de recombinación homóloga aparte de la reparación por escisión de nucleótidos [Wang y Smith, 1983; Ganesan, 1974]. La exonucleasa RecJ permite la acción del complejo RecFOR en la reparación por recombinación homóloga procesando el ADN naciente en la horquilla detenida en el sitio dañado por RUV y alargando los tramos de ssDNA, [Courcelle y Hanawalt, 1999; Courcelle y Hanawalt, 2001; Chow y Courcelle, 2004]; permitiendo así la reparación del daño genético y la restauración de la replicación del genoma [Lovett y Kolodner, 1989; Courcelle y Hanawalt, 1999; Courcelle y Hanawalt, 2001; Chow y Courcelle, 2004; Morimatsu y Kowalczykowski 2003; Heller y Mariani, 2006; Bichara *et al.*, 2007; Courcelle y Chow, 2007; Michel *et al.*, 2007; Bachrati y Hickson, 2008; Rudolph *et al.*, 2008] En ausencia de RecJ la degradación del ADN naciente de la horquilla de replicación no ocurre y se aumenta la frecuencia de recombinación ilegítima [Hanada *et al.*, 1997, Rudolph *et al.*, 2008]. Además la exonucleasa RecJ participa junto con el complejo exonucleolítico RecBCD (ExoV) procesando el ADN a extremos romos o de ssADN de pocos nucleótidos en la reparación por recombinación del daño producido por RUV en *Escherichia coli* [Thoms y Wackernagel, 1998; Viswanathan y Lovett, 1998; Đermić, 2006; Kickstein *et al.*, 2007; Thoms *et al.*, 2008].

Por su parte, la estirpe con deficiencia para la actividad exonucleasa Exol (IN900) también mostró valores de sobrevivencia relativamente menores que la estirpe salvaje PQ30 frente a UV-B (Figura 1). Sin embargo, a diferencia de lo observado para la estirpe IN400 el valor del DL₅₀ para IN900 no resultó significativamente diferente al de la estirpe salvaje (Tabla 2.) en correspondencia con lo observado en previo estudio [Viswanathan y Lovett, 1998]; esto indica una importancia moderada de Exol en la reparación de daños del ADN generados por RUV-B. En la estirpe celular IN900 la inducción de la respuesta SOS para dosis mayores a 0,006 J/cm² fue significativamente menor que en la estirpe salvaje PQ30; sugiriendo que la Exol puede estar implicada en la generación de regiones de cadenas simples que resulten en la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli*. En general, estos resultados están en correspondencia con lo encontrado cuando la estirpe IN900 es irradiada con radiación gamma [Breña-Valle y Serment-Guerrero, 1998; Serment-Guerrero et al., 2008].

Varios estudios han demostrado que la exonucleasa Exol, quien degrada en la dirección 3'-5' [Lehman y Nussbaum, 1964], participa en diferentes mecanismos de recombinación de *Escherichia coli* que reparan el daño genético inducido por la RUV [Kowalczykowski et al., 1994]. Se ha encontrado, que la exonucleasa Exol procesa extremos de cadenas simple de ADN permitiendo que el complejo exonucleolítico RecBCD se una al sitio dañado y de paso a la recombinación homóloga cuando hay roturas de doble cadena del ADN [Kushner et al., 1971; Razavy et al., 1996; Thoms y Wackernagel, 1998; Viswanathan y Lovett, 1998; Thoms et al., 2008].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman hallazgos previos que involucran enzimas exonucleasas como RecJ y Exol en la reparación del daño genético producido por RUV [Viswanathan y Lovett, 1998; Skaar et al., 2002]. Adicionalmente, estos constituyen nuevos aportes sobre el papel de estas exonucleasas en el contexto de la respuesta SOS inducida por RUV-B en

Escherichia coli. Resultan interesantes, los contrastantes resultados en los niveles de inducción de la respuesta SOS, obtenidos con los mutantes IN400 (*recJ*) e IN900 (*xonA*). Estos sugieren que en efecto la exonucleasa RecJ contribuye a la reparación de fotoproductos como previamente indicado [Thoms y Wackernagel, 1998; Viswanathan y Lovett, 1998; Morimatsu y Kowalczykowski 2003; Chow y Courcelle, 2004; Đermić, 2006; Kickstein *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2007; Thoms *et al.*, 2008]; mientras que la exonucleasa ExoI parece estar más implicada en la generación de señal inductora de la respuesta SOS que en eventos de reparación del daño genético en acuerdo a lo encontrado en trabajos con radiación gamma [Breña-Valle y Serment-Guerrero, 1998; Serment-Guerrero *et al.*, 2008]. Bajo RUV-B las exonucleasas RecJ y ExoI no son funcionalmente análogas, contrario a lo encontrado con radiación ionizante [Serment-Guerrero *et al.*, 2008]. Dado que han sido identificadas proteínas homólogas a las exonucleasas dependientes de cadenas simples de ADN en humanos [Pulido-Sánchez *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2012; Szambowska *et al.*, 2013], sería importante estudiar el papel que estas proteínas homólogas en el procesamiento del daño genético inducido por RUV. Adicionalmente se pudo comprobar que la radiación UV-B es un agente genotóxico muy potente a muy bajas dosis (0,001J/cm²) (Figura 2) [González-Púmariega *et al.*, 2009]

5. CONCLUSIONES

La exonucleasa RecJ es de gran importancia para la supervivencia celular, ya que contribuye en la reparación del daño genético inducido por RUV-B. Por el contrario, la exonucleasa ExoI está involucrada en la generación de regiones de cadena simple de ADN que inducen la respuesta SOS en *Escherichia coli*.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda desarrollar estudios sobre la radiosensibilidad y la inducción de la respuesta SOS en estirpes de *Escherichia coli* con deficiencias genéticas para otras actividades exonucleolíticas dependientes de cadena simple como: *sbcCD*, *xseA* y *exoX*; incluyendo dobles mutantes con los genes aquí estudiados.

7. COMPETENCIAS DESARROLLADAS POR EL PASANTE

- Se desarrollaron habilidades y destrezas en la realización de curvas de radiosensibilidad y con el ensayo SOS Chromotest.
- Se adquirió experiencia experimental en el crecimiento bacteriano, manejo de equipos, preparación de los medios de cultivos y soluciones necesarios para el desempeño de cada práctica de laboratorio.
- Se asumió responsablemente el trabajo del laboratorio durante el cumplimiento de los objetivos de la pasantía.

BIBLIOGRAFÍA

1. AL-HADID, Q., ONA, K., COURCELLE, CT., & COURCELLE, J. RecA433 cells are defective in recF-mediated processing of disrupted replication forks but retain recBCD-mediated functions. *Mutation Research*. October, 2008, vol. 645, no.1-2, p. 19-26.
2. ANDERSON, DG., & KOWALCZYKOWSKU, SC. The Translocating RecBCD Enzyme Simulates Recombination by Directing RecA Protein onto ssDNA in a x- Regulated Manner. *Cell*. July, 1997, vol. 90, no. 2, p. 77-86.
3. BACHRATI, CZ., & HICKSON, ID. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma*. June, 2008, vol. 117, no. 3, p. 219-233.
4. BICHARA, M., MEIER, M., WAGNER, J., CORDONNIER, A., & LAMBERT, IB. Postreplication repair mechanisms in the presence of DNA adducts in *Escherichia coli*. *Mutation Research*. June, 2011, vol. 727, no. 3, p. 104-122.
5. BICHARA, M., PINET, I., LAMBERT, IB., & FUCHS, RP. RecA-mediated excision repair: a novel mechanism for repairing DNA lesions at sites of arrested DNA synthesis. *Molecular Microbiology*. July, 2007, vol. 65, no. 1, p. 218-229.
6. BRASH, DE., RUDOLPH, JA., SIMON, JA., LIN, A., MCKENNA, GJ., BADEN, HP., HALPERIN, AJ., & PONTEN, J. A role of sunlight in skincancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. November, 1991, vol. 88, no. 22, p. 10124-10128.
7. BREÑA-VALLE, M., & SERMENT-GUERRERO, J. SOS induction by gamma radiation in *E. coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis*. November, 1998, vol.13, no. 6, p. 637–641.
8. BREYER, WA., & MATTHEWS, BW. Structure of *Escherichia coli* exonuclease I suggests how processivity is achieved. *Nature Structural Biology*. December, 2000, vol. 7, no. 12. P. 1125-1128.

9. BURDETT, V., BAITINGER, C., VISWANATHAN, M., LOVETT, ST., & MODRICH, P. In vivo requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. June, 2001, vol. 98, no. 12, p. 6765-6770.
10. COURCELLE, J., & CHOW, KH. RecBCD and RecJ/RecQ Initiate DNA Degradation on Distinct Substrates in UV-Irradiated *Escherichia coli*. *Radiation Research Society*. October, 2007, vol 168, no. 1, p.499-506.
11. COURCELLE, J., & HANAWALT, PC. RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of the replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*. July, 1999, vol. 262, no. 1, p. 543-551.
12. COURCELLE, J., & HANAWALT, PC. Participation of recombination proteins in rescue of arrested replication forks in UV-irradiated *Escherichia coli* need not involve recombination. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. July, 2001, vol. 98, no.15, p. 8196-8202.
13. COURCELLE, J., DONALDSON, JR., CHOW, KH., & COURCELLE, CT. DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science*. February, 2003, vol. 299, no. 5609, p. 1064-1067.
14. COURCELLE, J., KHODURSKY, A., PETER, B., BROWN, PO., & HANAWALT, PC. Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. *Genetics*. January, 2001, vol. 158, no. 1, p. 41-64.
15. CHOW, KH., & COURCELLE, J. RecO acts with RecF and RecR to protect and maintain replication forks blocked by UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. January, 2004, vol. 279, no. 5, p. 3492-3496.
16. DERMIC, D., ZAHRAKKA, D., & PETRANOVIC, M. Exonuclease Requirements for Recombination of λ -Phage in *recD* Mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*. August, 2006, vol. 173, no. 4, p. 2399-2403.

17. DIANOV, G., SEDGWICK, B., DALY, G., OLSSON, M., LOVETT, S., & LINDAHL, T. Release of 50-terminal deoxyribose-phosphate residues from incised abasic sites in DNA by the *Escherichia coli* RecJ protein. *Nucleic Acids Research*. March, 1994, vol. 22, no. 6, p. 993–998.
18. DILLINGHAM, MS., & KOWALCZYKOWSKI, SC. RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. December, 2008, vol. 72, no. 4, p. 642-671.
19. ECHOLS, H., & GOODMAN, MF. Mutation induced by DNA damage: a many protein affair. *Mutation Research*. March, 1990, vol. 236, no. 1990, p. 301-311.
20. GANESAN, AK. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*. July, 1974, vol. 87, no. 1, p. 103-119.
21. GARCÍA-GONZALEZ, A., VICENS, L., ALICEA, M., & MASSEY, SE. The distribution of recombination repair genes is linked to information content in bacteria. *Gene*. June, 2013, vol. 528, no. 1, p. 296-303.
22. GONZÁLEZ-PÚMARIEGA, M., TAMAYO, MV., & SÁNCHEZ-LAMAR, A. 2009. Ultraviolet Radiation and its Incidence in the Human Health. *Theoria*. December, 2009, vol. 18, no. 2, p. 69-80.
23. HAN, ES., COOPER, DL., PERSKY, NS., SUTERA, VA., WHITAKER, RD., MONTELLO, ML., & LOVETT, ST. RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic acid research*. January, 2006, vol. 34, no. 4, p. 1084-1091.
24. HANADA, K., UKITA, T., KOHNO, Y., SAITO, K., KATO, JI., & IKEDA, H. RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. April, 1997, vol. 94, no. 1, p. 3860-3865.
25. HELLER, RC., & MARIANS, KJ. Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature*. February, 2006, vol. 439, no. 7076, p. 557-562.

26. HIGASHITANI, N., HIGASHITANI, A., & HORIUCHI, K. SOS induction in *Escherichia coli* by single-stranded DNA of mutant filamentous phage: monitoring by cleavage of LexA repressor. *Journal of Bacteriology*. June, 1995, vol. 177, no. 12, p. 3610–3612.
27. HISHIDA, T., HAN, YW., SHIBATA, T., KUBOTA, Y., ISHINO, Y., IWASAKI, H., & SHINAGAWA, H. Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes & Development*. December, 2013, vol. 18, no.1, p. 1886-1897.
28. HUISMAN, O., & D´ARI, R. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E.coli*. *Nature*. April, 1981, vol. 290, no. 5809, p. 797-799.
29. JANION, C. Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*. September, 2008, vol. 4 no. 6, p. 338-344.
30. KICKSTEIN, E., HARMS, K., & WACKERNAGEL, W. Deletions of *recBCD* or *recD* influence genetic transformation differently and are lethal together with a *recJ* deletion in *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology*. March, 2007, vol. 153, no. 1, p. 2259-2270.
31. KOWALCZYKOWSKI, SC., DIXON, DA., EGGLESTON, AK., LAUDER, SD., & REHRAUER, WM. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. September, 1994, vol. 58, no. 3, p. 401-465.
32. KOZMIN, SG., PAVLOV, YI., KUNKEL, TA., & SAGE, E. Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol η and Pol ζ in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic Acids Research*. June, 2003, vol. 31, no. 15, p. 4541-4552.
33. KRISHNA, S., MASLOV, S., & SNEPPEN, K. UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* SOS Response: A Quantitative Model. *PLOS Computational Biology*. March, 2007, vol. 3, no. 3, p. 451-462.

34. KUSHNER, SR., NAGAISHI, H., TEMPLIN, A., & CLARK, AJ. Genetic Recombination in *Escherichia coli*: The Role of Exonuclease I. Proceedings of the National Academy of Science. April, 1971, vol. 68, no. 4, p. 824-827.
35. LEHMAN, JR., & NUSSBAUM, AL. The Deoxyribonucleases of *Escherichia coli*. V. on the Specificity of Exonuclease I (Phosphodiesterase). The Journal of Biological Chemistry. August, 1964, vol. 219, no. 8, p. 2628-2636.
36. LIEBERMAN, HB., & WITKIN, EM. DNA degradation, UV sensitivity and SOS-mediated mutagenesis in strains of *Escherichia coli* deficient in single-strand DNA binding protein: effects of mutations and treatments that alter levels of Exonuclease V or recA protein. April, 1983, vol. 190, no. 1, p. 92-100.
37. LOVETT, ST., & CLARK, AJ. Genetic Analysis of the *recJ* Gene of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology. January, 1984, vol. 157, no. 1, p. 190-196.
38. LOVETT, ST., & KOLODNER, RD. Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Science. January, 1989, vol. 86, no. 1, p. 2627-2631.
39. MAKAROVA, KS., KOONIN, EV., & KELMAN Z. The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. Biology Direct. July, 2012, vol. 7, no. 7, p. 1-10.
40. MATSUMURA, Y., & ANANTHASWAMY, HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. Toxicology and Applied Pharmacology. August, 2002, vol. 195, no. 2004, p. 298-308.
41. McGLYNN, P., & LLOYD, RG. Rescue of stalled replication forks by RecG: Simultaneous translocation on the leading and lagging strand templates support an active DNA unwinding model of fork reversal and Holliday junction formation. Proceedings of the National Academy of Sciences. July, 2002, vol. 98, no.15, p. 8227-8234.

42. MICHEL, B., BOUBAKRI, H., BAHAROGLU, Z., LEMASSON, M., & LESTINI, R. Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair*. March, 2007, vol. 6, no. 1 p. 967-980.
43. MITCHELL, DL. The relative Cytotoxicity Of (6-4) Photoproducts and Cyclobutane Dimers in Mammalian Cells. *Photochemistry and Photobiology*. July, 1988, vol. 48, no. 1, p. 51-57.
44. MORIMATSU, K., & KOWALCZYKOWSKI, SC. RecFOR proteins load RecA onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Molecular Cell*. May, 2003, vol. 11, no. 5, p. 1337-1347.
45. MORIMATSU, K., WU, Y., & KOWALCZYKOWSKI, SC. RecFOR Proteins Target RecA to a DNA Gap with Either DNA or RNA at the 5' Terminus: Implication for Repair of stalled Replication Forks. *The Journal of Biological Chemistry*. August, 2012, vol. 287, no. 42, p. 35621-35630.
46. OPPERMAN, T., MURLI, S., SMITH, BT., & WALKERS, GC. A model for a *umuDC*- dependent prokaryotic DNA damage checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Science*. August, 1999, vol. 96, no. 112, p. 9218-9223.
47. PERDIZ, D., GRÓF, P., MEZZINA, M., NIKAIDO, O., MOUSTACCHI, E. Y SAGE, E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of dewar photoproducts in solar mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. May, 2000, vol. 275, no. 35, p. 26732-26742.
48. PERSKY, NS., & LOVETT, ST. Mechanisms of recombination: lessons from *E.coli*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. December, 2008, vol. 43, no. 6, p. 347-370.
49. PHILLIPS, GJ., PRASHER, DC., & KUSHNER, SR. Physical and Biochemical Characterization of cloned *sbcB* and *xonA* Mutation from *Escherichia coli* K-12. May, 1988, vol. 170, no. 5, p. 2089-2094.

50. PULIDO-SANCHEZ, L., & PONTING, CP. Cdc45: the missing RecJ ortholog in eukaryotes? *Bioinformatics*. June, 2011, vol. 27, no. 14, p. 1885-1888.
51. QUILLARDET, P., ROUFFAUD, MA., & BOUIGE, P. DNA array analysis of the gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. June, 2003, vol. 154, no. 2003, p. 559-572.
52. RANDHAWA, MA. Letter to Editor: Calculation of LD₅₀ Values from the Method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. March, 2009, vol. 21, no. 3, p. 184-185.
53. RANGARAJAN, S., WOODGATE, R., & GOODMAN, MF. Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins. *Molecular Microbiology*. February, 2002, vol. 43, no. 3, p. 617-628.
54. RAZAVY, H., SZIGETY, SK., & ROSENBERG, SM. Evidence for Both 3' and 5' Single-Strand DNA Ends in Intermediates in Chi-Stimulated Recombination *In Vivo*. *Genetics*. February, 1995, vol. 142, no. 1, p. 333-339.
55. RUDOLPH, CJ., UPTON, AL., & LLOYD, RG. Maintaining replication fork integrity in UV-irradiated *Escherichia coli* cells. *DNA Repair*. July, 2008, vol. 7, no. 1, p. 1589-1602.
56. SERMENT-GUERRERO, J., BREÑA-VALLE, M., & ESPINOSA-AGUIRRE, J. In vivo role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis*. April, 2008, vol. 23, no. 4, p.317–323.
57. SINHA, RP., & HÄDER, DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. March, 2002, vol. 1, no. 4, p. 225-236.
58. SKAAR, EP., LAZIO, MP., & SEIFERT, HS. Roles of the recJ and recN Genes in Homologous Recombination and DNA Repair Pathways of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*. February, 2002, vol. 184, no. 4, p. 919-927.

59. SVOBODOVÁ, A., PSOTOVÁ, J., & WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage. *Biomedical Papers*. October, 2003, vol. 147, no. 2 , p. 137-145.
60. SZAMBOWSKA, A., TESSMER, I., KURSULA, P., USSKILAT, C., PRUS, P., POSPIECH, H., & GROSSE, F. DNA binding properties of human Cdc45 suggest a function as molecular wedge for DNA unwinding. *Nucleic Acids Research Advances*. November, 2013, vol. 1, no. 1 p.1-12.
61. THOMS, B., & WACKERNAGEL, W. Interaction of RecBCD Enzyme with DNA at Double-Strand Breaks Produced in UV-Irradiated *Escherichia coli*: Requirement for DNA End Processing. *Journal of Bacteriology*. November, 1998, vol. 180, no. 21, p. 5639-5645.
62. THOMS, B., BORCHERS, I., & WACKERNAGEL, W. 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*. January, 2008, vol. 190, no. 1, p. 179-192.
63. TSATSOU, F., TRAKATELLI, M., PATSATSI, A., KALOKASIDIS, K., & SOTIRIADIS, D. Extrinsic aging UV-mediated skin carcinogenesis. *Dermato-Endocrinology*. December, 2012, vol. 4, no.3, p.285-297.
64. VISWANATHAN, M., & LOVETT, ST. Single-Strand DNA-Specific Exonucleases in *Escherichia coli*: Roles in Repair and Mutation Avoidance. *Genetics*. May, 1998, vol. 149, no. 1, p. 7-16.
65. VISWANATHAN, M., & LOVETT, ST. Exonuclease X of *Escherichia coli* a novel 3'-5' DNase and DnaQ superfamily member involved in DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry*. October, 1999, vol. 274, no. 42, p. 30094-30100.
66. VLASIC, I., IVANCIC-BACE, I., IMESEK, M., MIHALJEVIC, B., & BRCIK-KOSTIC, K. RecJ nuclease is required for SOS induction after introduction of double-strand break in a RecA loading deficient *recB* mutant of *Escherichia coli*. *Biochimie*. April, 2008, vol. 90, no. 9, p.1347-1355.

67. VLASIC, I., SIMATOVIC, A., & BRCIC-KOSTIC, K. Genetic Requirements for High Constitutive SOS Expression in *recA730* Mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. July, 2011, vol. 193, no. 18, p. 4643-4651.
68. WALKER, GC. Inducible DNA Repair Systems. *Annual Review of Biochemistry*. December, 1985, vol. 54, no. 1, p. 425-457.
69. WAKAMATSU, T., KITAMURA, Y., KOTERA, Y., NAKAGAWA, N., KURAMITSU, S., & RYOJI, M. Structure of RecJ Exonuclease Defines Its Specificity for Single-stranded DNA. *The Journal of Biological Chemistry*. February, 2010, vol. 285, no. 13, p. 9762-9769.
70. WANG, TCV., & SMITH, KC. Mechanisms for *recF*-Dependent and *recB*-Dependent Pathways of Postreplication Repair in UV-Irradiated *Escherichia coli uvrB*. *Journal of Bacteriology*. December, 1983, vol. 156, no. 3, p. 1093-1098.
71. WITKIN, EM. Ultraviolet Mutagenesis and Inducible DNA Repair in *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*. December, 1976, vol. 40, no. 4, p. 869-907.
72. YAMAGATA, A., KAKUTA, Y., MASUI, R., & FUKUYAMA, K. The crystal structure of exonuclease RecJ bounded to Mn²⁺ ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. April, 2002, vol. 99, no. 9, p. 5908-5912.
73. ZAIDI, MR., DAY, CP., & MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal of Investigative Dermatology*. May, 2008, vol. 128, no. 177, p. 2381-2391.

ANEXOS

Anexo A. ANOVA de una vía.

CEPAS	DOSIS		
	gl	F	P
FI IN400	10	51,290	***
FI IN900	10	99,869	***
FI PQ30	10	76,451	***

* $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$; NS: No Significativo.

Anexo B. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa IN400.

DOSIS	FI IN400	1	2	3
	Media			
C-	-0,032594		****	
0,001 J/cm ²	1,3404755			****
0,003 J/cm ²	1,734755	****		
0,004 J/cm ²	1,805257	****		
0,009 J/cm ²	1,893934	****		
0,011 J/cm ²	1,966346	****		
0,015 J/cm ²	1,979380	****		
0,013 J/cm ²	1,983827	****		
0,007 J/cm ²	1,990371	****		
0,019 J/cm ²	1,990513	****		
0,017 J/cm ²	2,086555	****		

Anexo C. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa IN900.

DOSIS	FI IN900	1	2	3	4	5
	Mediana					
C-	-0,005733				****	
0,001 J/cm ²	0,754335					****
0,003 J/cm ²	1,260378			****		
0,006 J/cm ²	1,450466		****	****		
0,011 J/cm ²	1,594548	****	****			
0,008 J/cm ²	1,601761	****	****			
0,013 J/cm ²	1,698588	****	****			
0,016 J/cm ²	1,756375	****				
0,021 J/cm ²	1,775753	****				
0,018 J/cm ²	1,782967	****				
0,023 J/cm ²	1,842021	****				

Anexo D. Test de Tukey para el factor de inducción de la cepa PQ30.

DOSIS	FI PQ30	1	2	3	4	5	6	7
	Mediana							
C-	-0,023781							****
0,001 J/cm ²	0,793937					****		
0,002 J/cm ²	1,109259					****	****	
0,003 J/cm ²	1,223687			****			****	
0,005 J/cm ²	1,443932			****	****			
0,004 J/cm ²	1,512598			****	****			
0,006 J/cm ²	1,729991	****			****			
0,007 J/cm ²	1,913853	****	****					
0,008 J/cm ²	1,933766	****	****					
0,010 J/cm ²	2,005704	****	****					
0,012 J/cm ²	2,172264		****					