

**RADIOSENSIBILIDAD E INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR
TRATAMIENTO CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA B EN CÉLULAS DE
Escherichia coli DEFICIENTES PARA LA REPARACIÓN DEL DAÑO
GENÉTICO**

CÉSAR AUGUSTO PRADA MEDINA

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

**RADIOSENSIBILIDAD E INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR
TRATAMIENTO CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA B EN CÉLULAS DE
Escherichia coli DEFICIENTES PARA LA REPARACIÓN DEL DAÑO
GENÉTICO**

CÉSAR AUGUSTO PRADA MEDINA

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Biólogo**

Director:

JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, Ph. D.

Codirector:

JORGE HUMBERTO SERMENT GUERRERO, BIÓLOGO, Ph. D.

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

2014

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la valiosa oportunidad de haber compartido mi vida con tantas personas, sin las experiencias que me permitieron, este trabajo jamás hubiera sido desarrollado. En especial a mi familia, amigos, maestros y compañeros que a lo largo de mi carrera enriquecieron mi desarrollo intelectual.

Gracias al profesor Jorge L. Fuentes por la oportunidad brindada y por su acompañamiento incondicional durante el desarrollo de este trabajo. Sus comentarios oportunos y su actitud de vida hacen parte de las enseñanzas que no quedaron en este documento, pero si en mi vida. Asimismo, agradezco el apoyo y los comentarios siempre acertados del profesor Jorge Serment-Guerrero.

Mil gracias a la ayuda desinteresada de mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental. En especial a Nathalia Quintero y Tatjana Aristizabal, sus contribuciones a este trabajo fueron esenciales. El excelente ambiente de trabajo en el laboratorio fue fundamental para culminar este proyecto, gracias.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. METODOLOGÍA	18
2.1 ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	18
2.2 CONDICIONES DE CULTIVO	19
2.3 CONDICIONES DE IRRADIACIÓN	19
2.4 SOBREVIVENCIA CELULAR FRENTE A R-UVB	19
2.5 INDUCCIÓN SOS POR R-UVB	20
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSIÓN	28
5. CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	45

LISTA DE GRÁFICAS

Pág.

Gráfica 1. Supervivencia celular de las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre) irradiadas con R-UVB. Los datos para las estirpes IN400 e IN900 fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014). 23

Gráfica 2. Factor de inducción SOS por tratamiento con R-UVB de las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre). Los datos para las estirpes IN400 e IN900 fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014). 25

Gráfica 3. Regulación de la inducción de la respuesta SOS por tratamiento con R-UVB y el rol de cada uno de los genes estudiados que participan de esta regulación. 36

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estirpes celulares de <i>E. coli</i> que se utilizaron en este trabajo.	18
Tabla 2. Dosis letal media de R-UVB (DL50) de las estirpes de <i>E. coli</i> IN237 (<i>recO</i>), IN250 (<i>recN</i>), IN400 (<i>recJ</i>), IN520 (<i>exoX</i>), IN602 (<i>recB</i>), IN650 (<i>recD</i>), IN700 (<i>fpg</i>), IN900 (<i>xonA</i>), OG100 (<i>oxyR</i>), PQ37 (<i>uvrA</i>) y PQ30 (silvestre).	22
Tabla 3. Factor de inducción SOS para las diferentes dosis de R-UVB evaluadas a las estirpes de <i>E. coli</i> IN237 (<i>recO</i>), IN250 (<i>recN</i>), IN400 (<i>recJ</i>) [†] , IN520 (<i>exoX</i>), IN602 (<i>recB</i>), IN650 (<i>recD</i>), IN700 (<i>fpg</i>), IN900 (<i>xonA</i>) [†] , OG100 (<i>oxyR</i>), PQ37 (<i>uvrA</i>) y PQ30 (silvestre).	26

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Factor de inducción SOS para las diferentes dosis de R-UVB evaluadas a las estirpes de <i>E. coli</i> IN237 (<i>recO</i>), IN250 (<i>recN</i>), IN400 (<i>recJ</i>) [†] , IN520 (<i>exoX</i>), IN602 (<i>recB</i>), IN650 (<i>recD</i>), IN700 (<i>fpg</i>), IN900 (<i>xonA</i>) [†] , OG100 (<i>oxyR</i>), PQ37 (<i>uvrA</i>) y PQ30 (silvestre).	46
ANEXO B. Inducción SOS de las estirpes PQ37 (<i>uvrA</i>), IN237 (<i>recO</i>) e IN250 (<i>recN</i>) frente a los mutágenos de referencia 4-Nitroquinolina-1-Óxido (4NQO) y Mitomicina C (MMC).	48

RESUMEN

TÍTULO: RADIOSENSIBILIDAD E INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR TRATAMIENTO CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA B EN CÉLULAS DE *Escherichia coli* DEFICIENTES PARA LA REPARACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO.

AUTOR: CÉSAR AUGUSTO PRADA MEDINA **

PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli*, Regulación Respuesta SOS, Radiación Ultravioleta B (R-UVB).

DESCRIPCIÓN:

La exposición a la radiación ultravioleta tipo B (R-UVB) induce en *Escherichia coli* una respuesta celular frente a estrés genotóxico conocida como la respuesta SOS. Las rutas que permiten la inducción de esta respuesta a partir de los daños genéticos producidos por la R-UVB no son conocidas a cabalidad. En este trabajo se evaluó la importancia de diferentes proteínas, que participan en la reparación del daño genético y la tolerancia al estrés oxidativo, en la regulación de la respuesta SOS y la sobrevivencia celular frente a R-UVB en células de *E. coli*. Para ello, usamos diferentes estirpes celulares que tienen inactivados los genes que codifican tales proteínas: IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), PQ37 (*uvrA*) y OG100 (*oxyR*); y la estirpe PQ30, que presenta todos los genes funcionales y de la que derivan las otras estirpes. Todas la estirpes cuentan con la fusión genética *sulA::lacZ* que permite cuantificar la inducción de la respuesta SOS. Los genes *recO*, *recJ*, *recB* y *uvrA* resultaron los más importantes para la sobrevivencia de células tratadas con R-UVB. Los genes *recO* y *recN* resultaron los más importantes para la inducción de la respuesta SOS frente a R-UVB; mientras que el gen *recD* tiene un papel secundario en este proceso. Los genes *recB*, *xonA*, *exoX*, *oxyR* y *fpg* no mostraron ser importantes para la inducción de la respuesta SOS en *E. coli*. Estos resultados sugieren nuevos roles para los productos de los genes *recJ* y *recN*, además, de un nuevo aspecto de la forma como la respuesta SOS es regulada frente a la R-UVB.

* Proyecto de investigación.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Jorge Luis Fuentes-Lorenzo, Microbiólogo, Ph.D. Codirector: Jorge Humberto Serment-Guerrero, Biólogo, Ph.D

ABSTRACT

TITLE: RADIOSENSITIVITY AND SOS RESPONSE INDUCTION BY ULTRAVIOLET B RADIATION (UVB) IN *Escherichia coli* STRAINS DEFECTIVE IN DNA REPAIR MECHANISMS.*

AUTHOR: CÉSAR AUGUSTO PRADA MEDINA**

KEY WORDS: *Escherichia coli*, SOS response regulation, Ultraviolet B Radiation (UVB).

DESCRIPTION:

Escherichia coli reacts to ultraviolet B radiation (UVB) producing a cellular response against genotoxic stress, this is known as SOS response. Pathways that permit SOS induction from the UVB-induced DNA damage are not known completely. In this paper, was evaluated the importance of different proteins, that participate in DNA repair and provide oxidative stress tolerance, in the SOS response regulation and cell survival, of UVB irradiated *E. coli* cells. We use mutant *E. coli* strains with inactivation of the genes that encode the mentioned proteins: IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), PQ37 (*uvrA*) and OG100 (*oxyR*); all mutant strains are derivative from strain PQ30, which has fully functional genes. Furthermore, all strains have the genetic marker *sulA::lacZ* that allowed us to quantify the SOS induction. The most important *E. coli* genes for survival against UVB were *recO*, *recJ*, *recB* and *uvrA*. Products of *recO* and *recN* genes showed to be essential to SOS induction by UVB irradiation, while *recD* gene has a secondary role in this process. *recB*, *xonA*, *exoX*, *oxyR* and *fpg* genes were not important for SOS induction of *E. coli* by UVB irradiation. These results suggest new roles for proteins encoded by *recJ* and *recN* genes, also, indicate a new aspect of SOS response regulation by UVB.

* Investigation.

** Faculty of Sciences, Program of Biology. Director: Jorge Luis Fuentes-Lorenzo, Microbiologist, Ph.D. Codirector: Jorge Humberto Serment-Guerrero, Biologist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los efectos biológicos de la radiación ultravioleta (RUV) son cada día más importantes debido a los efectos genotóxicos perjudiciales que tiene la sobreexposición a la radiación solar sobre los organismos vivos (Kozmin et al. 2003; Svobodova et al. 2006; González-Púmariega et al. 2009). La R-UVB se considera el componente de la radiación solar de mayor relevancia biológica (Perdiz et al. 2000). Ésta 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 (Peak et al. 1984; Mitchell 1988). Adicionalmente, la R-UVB puede producir especies reactivas del oxígeno, causando daños oxidativos en las bases nitrogenadas y roturas del esqueleto azúcar fosfato¹. A pesar de que la R-UVB es mayormente filtrada por la capa de ozono y solo constituye ~5% de la RUV que alcanza la superficie terrestre, el efecto carcinogénico de la radiación solar es mayormente asociado con este componente². En este contexto, los estudios sobre los mecanismos que reparan el daño genético producido por la R-UVB constituyen la base para establecer una estrategia de fotoprotección efectiva.

Las bacterias constituyen modelos efectivos para el estudio de los efectos biológicos de la RUV debido a su simplicidad, sus pocos requerimientos experimentales y porque sus mecanismos de reparación del daño genético producido por este mutágeno han sido conservados a lo largo de la evolución de los organismos vivos del planeta³. En el modelo bacteriano *Escherichia coli*, la exposición a RUV induce una respuesta celular de estrés genotóxico conocida

¹ Beehler et al. 1992; Zhang et al. 1997

² Perdiz et al. 2000; Matsumura y Ananthaswamy 2002; Zaidi et al. 2008; Tsatsou et al. 2012

³ Morita R, Nakane S, Shimada A, et al. (2010) Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. Journal of nucleic acids 2010:179594. doi: 10.4061/2010/179594

como respuesta SOS (Witkin 1976). Durante esta respuesta, se inducen un grupo de aproximadamente 40 genes⁴, regulados bajo el circuito de las proteínas RecA/LexA⁵; entre cuyas funciones se encuentran: la reparación del daño genético, la restauración de la replicación del genoma, el aumento de la variabilidad genética y el control de la división celular⁶.

La proteína LexA es el regulador negativo (represor) de todos los genes SOS⁷. Esta proteína se une en forma de dímeros a la secuencia operadora localizada dentro de la región promotora de cada gen SOS; incluyendo los genes *recA* y *lexA*⁸. De esta forma, el represor LexA impide la unión de la RNA polimerasa; y por tanto, la transcripción de los genes SOS. El análisis de las secuencias operadora/promotora de los diferentes genes SOS reveló que éstos comparten una secuencia consenso de unos 20 pares de bases (5´-TACTG(TA)₅CAGTA-3´), conocida como “caja SOS”⁹. La afinidad del represor LexA por esta secuencia varía de un gen a otro¹⁰. La proteína RecA es el regulador positivo del circuito, ésta muestra una alta afinidad por regiones de cadena simple en el ADN (ADNsc)¹¹. Se cree que las regiones de ADNsc constituyen la señal inductora de la respuesta SOS¹². Las regiones de ADNsc son generadas como consecuencia de la replicación discontinua del ADN dañado¹³ o por actividad exonucleasa de los complejos RecBCD y RecFOR¹⁴. Cuando la proteína RecA se une a estas regiones de simple cadena, forma un nucleofilamento helicoidal de RecA (complejo RecA-ADNsc) que promueve la auto-digestión intramolecular del

⁴ Courcelle et al. 2001; Quillardet et al. 2003

⁵ Higashitani et al. 1995

⁶ Crowley y Courcelle 2002; Krishna et al. 2007; Janion 2008

⁷ Brent y Ptashne 1981

⁸ Little JW, Mount DW (1982) The SOS regulatory system of Escherichia coli. Cell 29:11–22.

⁹ Walker 1984

¹⁰ Lewis et al. 1994

¹¹ Salles y Defais 1984; Higashitani et al. 1992

¹² Devoret 2001

¹³ Sassanfar y Roberts 1990; Yeeles et al. 2013

¹⁴ Chow y Courcelle, 2007; Schalow et al. 2011; Vlašić et al. 2011

represor LexA¹⁵; liberando así la caja SOS del represor y permitiendo se inicie la transcripción de los genes SOS. Una vez son removidos los daños en el ADN, los niveles de regiones ADNsc se reducen y por ende los del complejo RecA-ADNsc; permitiendo así que la proteína LexA de nueva síntesis se una a las secuencias operadora/promotora de los diferentes genes SOS^{16, 17}

El daño genético producido por la R-UVB en *Escherichia coli* es reparado principalmente mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos llevado a cabo por el complejo UvrABC/D; el cual elimina los CPD y los 6-4PP del ADN¹⁸. Adicionalmente, diferentes estudios han mostrado que las nucleasas que degradan ADNsc, juegan diferentes roles en los mecanismos de recombinación y de reparación del daño genético inducido por la RUV¹⁹. Por ejemplo, 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 *E. coli*,^{20, 21, 22, 23}

Recientes estudios han aportado nuevo conocimiento sobre el impacto que tienen los CPD en los procesos de replicación del genoma²⁴. Se ha mostrado que los CPD producidos por RUV durante la replicación del ADN en la cadena rezagada

¹⁵ Weinstock et al. 1979; Little y Mount 1982; Little 1991

¹⁶ Little JW, Mount DW (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11–22.

¹⁷ Butala M, Klose D, Hodnik V, et al. (2011) Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic acids research* 39:6546–57. doi: 10.1093/nar/gkr265

¹⁸ Sinha y Häder 2002; Kisker et al. 2013

¹⁹ Kushner et al. 1971; Lieberman y Witkin 1983; Phillips et al. 1988; Kowalczykowski et al. 1994; Viswanathan y Lovett 1999

²⁰ Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, et al. (2001) Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 276:31053–8. doi: 10.1074/jbc.M105481200

²¹ Thoms B, Borchers I, 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* 190:179–92. doi: 10.1128/JB.01052-07

²² Đermić 2006

²³ Thoms, Borchers, Wackernagel, Op. Cit

²⁴ Yeeles et al. 2013

impiden la síntesis completa de los fragmentos de Okazaki generando ADNsc que son reparados por la vía de recombinación RecFOR (Kuzminov 1999). Por el contrario, si los CPD se forman en la cadena líder bloquean la actividad polimerasa del replisoma en la cadena líder pero no en la rezagada; generando ADNsc en la cadena líder delante del CPD. La restauración de la horquilla de replicación obstruida requiere del procesamiento por parte de las proteínas RecJ, RecQ y el complejo exonucleolítico RecFOR^{25, 26}

Previos estudios^{27, 28} han mostrado que diferentes genes implicados en el metabolismo del ADN pueden ser importantes para la reparación del daño genético y para la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* tratada con radiación gamma. En este trabajo, se evaluó la importancia relativa que tienen estos genes para la sobrevivencia celular y la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* tratadas con R-UVB. Para ello usamos diferentes estirpes celulares de *E. coli* deficientes para los mencionados genes.

²⁵ Courcelle J, Hanawalt PC (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics*: MGG 262:543–51.

²⁶ Courcelle J, Donaldson JR, Chow K-H, Courcelle CT (2003) DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science (New York, NY)* 299:1064–7. doi: 10.1126/science.1081328

²⁷ Breña-Valle M, Serment-Guerrero J (1998) SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis* 13:637–41

²⁸ Serment-Guerrero et al. 2008

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la importancia relativa de diferentes mecanismos de reparación del daño genético sobre la sobrevivencia celular y la inducción de la respuesta SOS en células de *E. coli* tratadas con R-UVB.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir la sobrevivencia celular frente a R-UVB en las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recM*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre).

Describir la inducción de la respuesta SOS (*sulA::lacZ*) en un rango de dosis subletal de R-UVB en las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recM*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre).

2. METODOLOGÍA

2.1 ESTIRPES DE *E. coli*

Todas las estirpes de *E. coli* utilizadas poseen en su cromosoma una copia del gen *lacZ* fusionado al gen SOS, *sulA*, por lo tanto, es posible cuantificar la inducción SOS midiendo la actividad de la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*. Además, todas las estirpes mutantes o deficientes para cada uno de los genes que se estudiaron derivan de la estirpe PQ30, que tiene funcionales todos los genes estudiados, por lo que fue considerada como la estirpe silvestre. El genotipo y la fuente de las estirpes de *E. coli* utilizadas, se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes celulares de *E. coli* que se utilizaron en este trabajo.

Estirpes	Genotipo	Fuente
PQ30 (silvestre)	F-, <i>thr, leu, his, pyrD, thi, trp::MuC+</i> , <i>sr1300::Tn10, rpoB, sulA::MuD(Ap</i> <i>lacZ)cts, lacΔU169, galE, galY, phoC</i>	(Quillardet y Hofnung 1985)
IN237 (<i>recO</i>)	Igual a PQ30 pero <i>recO::Tn5</i>	(Breña-Valle y Serment-Guerrero 1998)
IN250 (<i>recN</i>)	Igual a PQ30 pero <i>tyrA::Tn10, recN</i>	(Breña-Valle y Serment-Guerrero 1998)
IN400 (<i>recJ</i>)	Igual a PQ30, pero <i>recJ284::Tn10</i>	(Breña-Valle y Serment-Guerrero 1998)
IN520 (<i>exoX</i>)	Igual a PQ30 pero Δ <i>exoX::kan</i>	(Serment-Guerrero et al. 2008)
IN602 (<i>recB</i>)	Igual a PQ30 pero <i>recB21, zga::Tn10</i>	(Breña-Valle y Serment-Guerrero 1998)
IN650 (<i>recD</i>)	Igual a PQ30 pero <i>recD1013</i>	(Serment-Guerrero et al. 2008)
IN700 (<i>fpg</i>)	Igual a PQ30 pero <i>fpg-1::kan</i>	(Serment-Guerrero et al. 2008)
IN900 (<i>xonA</i>)	Igual a PQ30, pero Δ <i>xonA300::cam</i>	(Serment-Guerrero et al. 2008)
OG100 (<i>oxyR</i>)	Igual a PQ30 pero Δ <i>oxyR, btuB</i> ,	(Quillardet et al. 1989)

Estirpes	Genotipo	Fuente
	<i>sr1300::Tn10</i>	
PQ37 (<i>uvrA</i>)	Igual a PQ30 pero <i>uvrA</i> , <i>rfa</i>	(Quillardet y Hofnung 1985)

2.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Las diferentes estirpes de *E. coli* fueron cultivadas en medio líquido Luria Bertani (AMRESCO, EE.UU.) e incubadas a 37°C con agitación. El medio fue suplementado con los antibióticos Ampicilina (50 µg/mL) y/o Tetraciclina (17 µg/mL) según cada estirpe. Para la obtención de cultivos en fase exponencial, se incubó una dilución 1:10 de un cultivo en fase estacionaria (16 h, 37°C, 300 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0,4 ($DO_{600nm} = 0,4$)²⁹.

2.3 CONDICIONES DE IRRADIACIÓN

Se irradiaron fracciones de cultivo en fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.4$) dentro de cajas Petri de vidrio. La capa de cultivo en las cajas Petri fue de ~1.1 mm para todas las irradiaciones. Las células en las cajas Petri se irradiaron en una cabina de irradiación BS-02 (Opystel Dr Gröbel, Alemania) equipada con cuatro lámparas de R-UVB y con un controlador de irradiación tipo UV-MAT (Opystel Dr Gröbel, Alemania).

2.4 SOBREVIVENCIA CELULAR FRENTE A R-UVB

Fracciones de cultivo en fase exponencial fueron irradiadas en Petri de 9 cm de diámetro. Diluciones en base diez (usando 0.7% NaCl) de cultivos irradiados y no irradiados fueron sembradas en medio Luria Bertani conteniendo 15g/L de Agar Bacteriológico (OXOID, Inglaterra) y suplementado con antibióticos. Posterior a 24

²⁹ Quillardet y Hofnung 1985

h de incubación a 37°C, se cuantificó la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de los cultivos irradiados y no irradiados. Se evaluaron 5 dosis para cada estirpe en un rango que permitió observar fracciones de sobrevivencia mayores y menores a 0.5. Se sembraron tres diluciones (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) por dosis por triplicado. Al menos tres experimentos independientes se llevaron a cabo con cada estirpe.

La Dosis Letal Media (DL_{50}), o dosis de radiación a la cual la población celular se reduce a la mitad, fue calculada para cada de una de las estirpes a partir de tres experimentos independientes según lo indicado por Bliss (1935). Las DL_{50} de las estirpes mutantes fueron comparadas con la de la estirpe silvestre usando la prueba de Tukey implementada en el paquete *stats* del programa R (R-Core-Team 2013). El logaritmo de la fracción media de sobrevivientes y su error estándar fue graficado para todas las estirpes mediante el paquete *ggplot2* del programa R (R-Core-Team 2013).

2.5 INDUCCIÓN SOS POR R-UVB

La inducción de la respuesta SOS fue cuantificada de acuerdo a la metodología propuesta por Quillardet y Hofnung (1985). Fracciones de cultivo en fase exponencial diluido 1:10 en medio Luria Bertani fueron irradiadas en cajas Petri de 5 cm de diámetro. Las células irradiadas (200µl) fueron incubadas a 37°C durante 2 h antes de cuantificar la actividad enzimática de las proteínas β-galactosidasa y Fosfatasa Alcalina. El factor de inducción SOS (FI) fue calculado como sigue:

$$FI = \frac{\frac{\beta gal + UVB}{FA + UVB}}{\frac{\beta gal}{FA}}$$

Donde $\beta gal+UVB$: actividad de la proteína β -galactosidasa en cultivos irradiados, $FA+UVB$: actividad de la proteína Fosfatasa Alcalina en cultivos irradiados, βgal : actividad de la proteína β -galactosidasa en cultivos no irradiados y FA : actividad de la proteína Fosfatasa Alcalina en cultivos no irradiados. Por experimento, se evaluaron 10 dosis diferentes de R-UVB con 4 réplicas. Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada estirpe. Se consideró como criterio de genotoxicidad de los tratamientos (dosis) lo siguiente: no genotóxico $FI \leq 0.5$, inconcluso $0.5 > FI \leq 2.0$ y, genotóxico $FI > 2.0$ y una clara relación dosis respuesta³⁰.

El valor medio del FI por dosis fue comparado con el control negativo (cultivo no irradiado) para cada estirpe, y entre las estirpes mutantes y la silvestre; usando la prueba de Tukey implementada en el paquete *stats* del programa R (R-Core-Team 2013). El factor de inducción SOS en relación a la dosis de R-UVB fue graficado para cada estirpe indicando el error estándar del valor medio de FI usando el paquete *ggplot2* del programa R (R-Core-Team 2013).

³⁰ Kevekordes et al. 1999

3. RESULTADOS

En general, todas las estirpes estudiadas fueron en algún grado más radiosensibles que la estirpe silvestre (Gráfica 1, Tabla 2). Conforme a los valores de DL₅₀, la radiosensibilidad frente R-UVB de las estirpes fue como sigue: IN237 (*recO*) > PQ37 (*uvrA*) > IN602 (*recB*) > IN400 (*recJ*) > IN900 (*xonA*) ≈ IN700 (*fpg*) > IN650 (*recD*) > OG100 (*oxyR*) > IN520 (*exoX*) > IN250 (*recN*) > PQ30 (silvestre). Sin embargo, solo las estirpes mutantes IN237, IN400, IN602 y PQ37 mostraron valores de DL₅₀ significativamente inferiores al de la estirpe silvestre; indicando la importancia de los productos de los genes *recO*, *recJ*, *recB* y *uvrA* para la reparación de los daños genéticos producidos por la R-UVB.

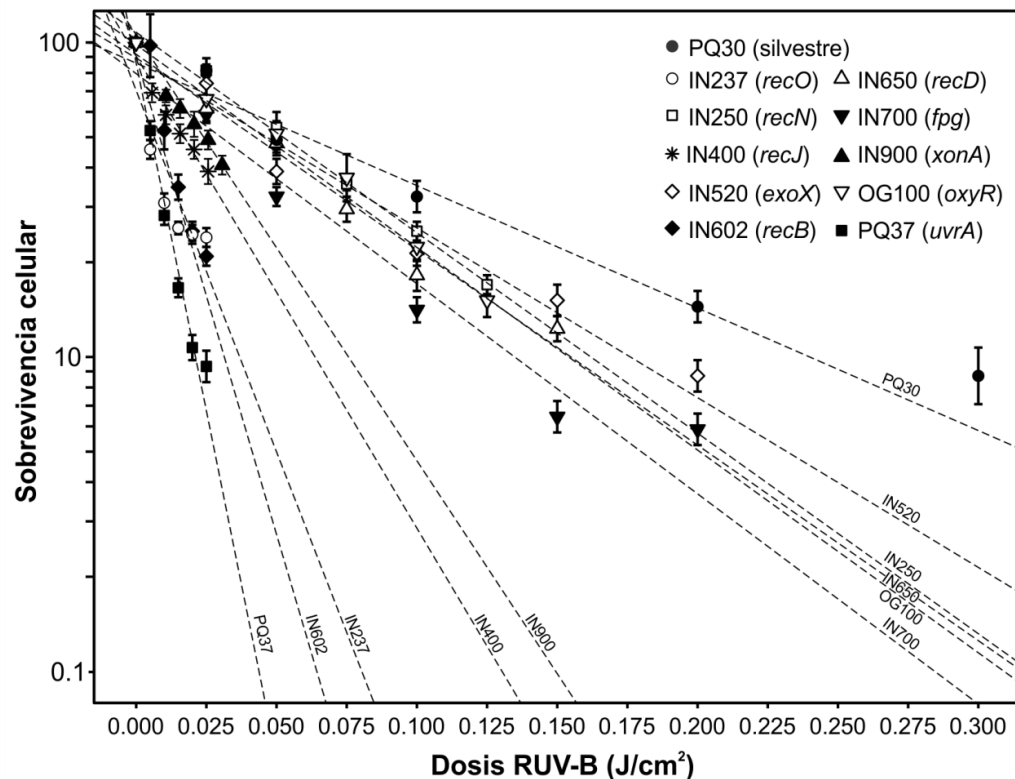
Tabla 2. Dosis letal media de R-UVB (DL50) de las estirpes de E. coli IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre).

Estirpe	DL ₅₀ R-UVB (J/cm ²) ± error estándar
PQ30 (silvestre)	0.062 ± 0.015
IN237 (<i>recO</i>)	0.003 ± 0.001 ^{***}
IN250 (<i>recN</i>)	0.056 ± 0.009
IN400 (<i>recJ</i>)	0.016 ± 0.004 [*]
IN520 (<i>exoX</i>)	0.044 ± 0.002
IN602 (<i>recB</i>)	0.014 ± 0.004 [*]
IN650 (<i>recD</i>)	0.040 ± 0.006
IN700 (<i>fpg</i>)	0.033 ± 0.006
IN900 (<i>xonA</i>)	0.033 ± 0.014
OG100 (<i>oxyR</i>)	0.041 ± 0.008
PQ37 (<i>uvrA</i>)	0.005 ± 0.001 ^{**}

Diferencias en el valor de DL₅₀ respecto a la estirpe silvestre (PQ30) usando una prueba Tukey (^{*}, p < 0.1, ^{**}, p < 0.05, ^{***}, p < 0.01). Los datos para las estirpes IN400 y IN900 fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014).

Las estirpes celulares duplicaron los niveles basales de inducción SOS a partir de la dosis 0.003 J/cm², con la excepción de las estirpes IN237 e IN250 (Anexo 1). La estirpe IN250 duplicó los niveles basales de inducción SOS solo a partir de la dosis 0.010 J/cm²; mientras que la estirpe IN237 no alcanzó a duplicar el nivel basal para ninguna de las dosis ensayadas (Anexo 1). Estos resultados indican que en estas dos estirpes básicamente no se induce la respuesta SOS frente al tratamiento con R-UVB. Resulta interesante, que la estirpe IN250 induce significativamente la respuesta SOS cuando es tratada con el mutágeno Mitomicina C (MMC) (Anexo 2).

Gráfica 1. Sobrevivencia celular de las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recM*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre) irradiadas con R-UVB. Los datos para las estirpes IN400 e IN900 fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014).



Los niveles de inducción de la respuesta SOS en las estirpes mutantes podían presentar tres posibles escenarios, *i)* los niveles de inducción en las estirpes mutantes fuesen superiores a los de la estirpe silvestre, *ii)* los niveles de inducción en las estirpes mutantes fueran inferiores a los de la estirpe silvestre y, *iii)* los niveles de inducción en las estirpes mutantes fuesen similares a los de la estirpe silvestre.

Los resultados obtenidos muestran los tres escenarios (Gráfica 2, Tabla 3). Las estirpes IN400 y PQ37 presentaron niveles de inducción SOS significativamente superiores a la estirpe silvestre en el rango de dosis menor a 0.006 J/cm^2 ; indicando que en el contexto de la respuesta SOS las proteínas RecJ y UvrA son esenciales para la reparación del daño genético inducido por R-UVB. Por el contrario, las estirpes IN237, IN250, y en menor medida la IN650, presentaron niveles de inducción de la respuesta SOS significativamente inferiores a los de la estirpe silvestre para todas las dosis evaluadas. Estos resultados sugieren que, en especial, los productos génicos RecO y RecN deben jugar un papel importante para la inducción de la respuesta SOS en *E. coli*. Por último, las estirpes IN520, IN602, IN700, IN900 y OG100 presentaron niveles de inducción SOS muy similares a los de la estirpe silvestre. Estos resultados nos indican que, en el contexto de la respuesta SOS, estos genes no son particularmente importantes para la reparación del daño genético y la inducción SOS por tratamiento con R-UVB.

Gráfica 2. Factor de inducción SOS por tratamiento con R-UVB de las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*), IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre). Los datos para las estirpes IN400 e IN900 fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014).

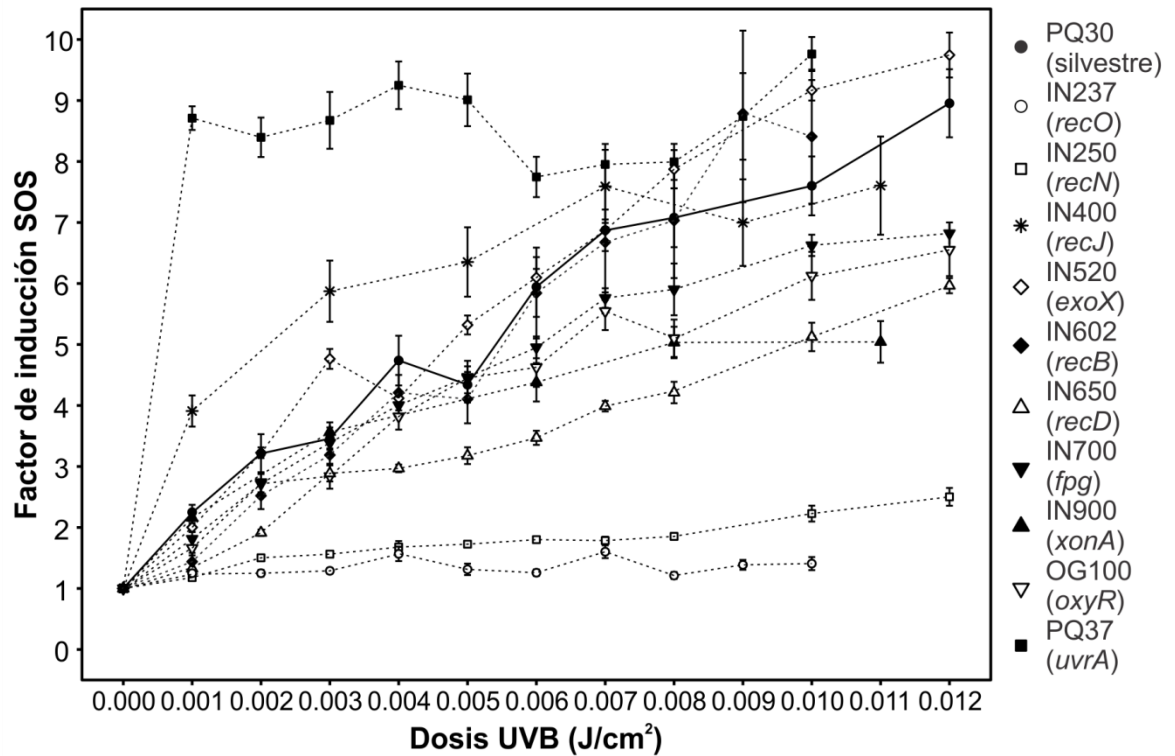


Tabla 3. Factor de inducción SOS para las diferentes dosis de R-UVB evaluadas a las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recM*), IN400 (*recJ*)[†], IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*)[†], OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre).

Factor de inducción SOS ± error estándar											
Dosis	PQ30	IN237	IN250	IN400 [†]	IN520	IN602	IN650	IN700	IN900 [†]	OG100	PQ37
R-UVB (J/cm ²)	(silvestre)	(<i>recO</i>)	(<i>recN</i>)	(<i>recJ</i>)	(<i>exoX</i>)	(<i>recB</i>)	(<i>recD</i>)	(<i>fpg</i>)	(<i>xonA</i>)	(<i>oxyR</i>)	(<i>uvrA</i>)
0.000	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
0.001	2.25 ± 0.12	1.25 ± 0.06***	1.18 ± 0.04***	3.91 ± 0.26***	2.00 ± 0.07	1.44 ± 0.15***	1.33 ± 0.02***	1.81 ± 0.11	2.16 ± 0.11	1.66 ± 0.12*	8.71 ± 0.19***
0.002	3.21 ± 0.32	1.25 ± 0.05***	1.18 ± 0.04***	-	3.23 ± 0.09	2.52 ± 0.22	1.91 ± 0.05***	2.71 ± 0.16	-	2.74 ± 0.17	8.40 ± 0.32***
0.003	3.46 ± 0.18	1.29 ± 0.05***	1.56 ± 0.03***	5.87 ± 0.50***	4.76 ± 0.16**	3.19 ± 0.35	2.89 ± 0.13	3.39 ± 0.09	3.57 ± 0.16	2.84 ± 0.20	8.67 ± 0.47***
0.004	4.74 ± 0.41	1.57 ± 0.12***	1.68 ± 0.10***	-	4.12 ± 0.10	4.21 ± 0.29	2.97 ± 0.06***	4.00 ± 0.14	-	3.82 ± 0.22	9.25 ± 0.39***
0.005	4.35 ± 0.30	1.31 ± 0.09***	1.73 ± 0.04***	6.35 ± 0.57***	5.32 ± 0.16	4.11 ± 0.40	3.18 ± 0.14	4.45 ± 0.10	-	4.47 ± 0.27	9.01 ± 0.43***
0.006	5.94 ± 0.49	1.26 ± 0.05***	1.80 ± 0.05***	-	6.10 ± 0.14	5.84 ± 0.75	3.47 ± 0.12***	4.95 ± 0.18	4.38 ± 0.32*	4.63 ± 0.32	7.75 ± 0.33**
0.007	6.87 ± 0.34	1.60 ± 0.10***	1.79 ± 0.06***	7.59 ± 0.60	6.87 ± 0.18	6.68 ± 0.95	3.99 ± 0.09***	5.76 ± 0.16	-	5.55 ± 0.31	7.95 ± 0.34
0.008	7.08 ± 0.48	1.21 ± 0.06***	1.85 ± 0.06***	-	7.87 ± 0.31	7.03 ± 0.94	4.21 ± 0.18***	5.90 ± 0.42	5.03 ± 0.26**	5.10 ± 0.31**	7.99 ± 0.30

Factor de inducción SOS ± error estándar											
Dosis	PQ30	IN237	IN250	IN400†	IN520	IN602	IN650	IN700	IN900†	OG100	PQ37
R-UVB (J/cm ²)	(silvestre)	(<i>recO</i>)	(<i>recN</i>)	(<i>recJ</i>)	(<i>exoX</i>)	(<i>recB</i>)	(<i>recD</i>)	(<i>fpg</i>)	(<i>xonA</i>)	(<i>oxyR</i>)	(<i>uvrA</i>)
0.009	-	1.39 ± 0.08	-	7.00 ± 0.71	-	8.79 ± 1.46	-	-	-	-	8.74 ± 0.71
0.010	7.60 ± 0.48	1.41 ± 0.11***	2.23 ± 0.13***	-	9.17 ± 0.17	8.41 ± 1.10	5.12 ± 0.23***	6.63 ± 0.17	-	6.13 ± 0.39	9.76 ± 0.28**
0.011	-	-	-	7.60 ± 0.81	-	-	-	-	5.04 ± 0.34	-	-
0.012	8.95 ± 0.56	-	2.50 ± 0.15***	-	9.75 ± 0.37	-	5.96 ± 0.12***	6.82 ± 0.18	-	6.55 ± 0.43***	-

Diferencias en el factor de inducción para cada dosis respecto a la estirpe silvestre (PQ30) usando una prueba Tukey (*, p < 0.1, **, p < 0.05, ***, p < 0.01).

† Los datos para estas estirpes fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014).

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, mostramos que los productos de los genes *recO*, *recB*, *uvrA* y *recJ* son importantes para la sobrevivencia celular de *E. coli* frente a la exposición a R-UVB. Los resultados, corroboran la importancia de los mecanismos de recombinación vía RecFOR y RecBCD, del sistema de reparación por escisión de nucleótidos UvrABC/D y de la exonucleasa RecJ en la reparación del daño genético producido por la RUV^{31, 32, 33, 34, 35, 36}

En el contexto de la respuesta SOS, solo los genes *uvrA* y *recJ* mostraron ser importantes en la reparación del daño genético producido por la R-UVB. Como indicamos, el producto del gen *uvrA* hace parte del sistema de Reparación por Escisión de Nucleótido, quien se encarga de la reparación de alteraciones estructurales del ADN como los CPD causados por la R-UVB (Kisker et al. 2013). Dímeros de la proteína UvrA son los encargados del reconocimiento del daño y la aglutinación de las proteínas UvrB y UvrC que retiran la sección monocatenaria

³¹ Kolodner R, Fishel RA, Howard M (1985) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutations on plasmid recombination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163:1060–1066

³² Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 63:751–813, table of contents.

LEHMAN IR, NUSSBAUM AL (1964) THE DEOXYRIBONUCLEASES OF *ESCHERICHIA COLI*. V. ON THE SPECIFICITY OF EXONUCLEASE I (PHOSPHODIESTERASE). *The Journal of biological chemistry* 239:2628–36.

³³ Courcelle et al. 2006

³⁴ Dillingham MS, Kowalczykowski SC (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 72:642–71, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00020-08

³⁵ Thoms B, Borchers I, 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* 190:179–92. doi: 10.1128/JB.01052-07

³⁶ Kisker C, Kuper J, Van Houten B (2013) Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5:a012591. doi: 10.1101/cshperspect.a012591

del ADN que presentaba la alteración^{37,38}. Lo anterior sugiere que la persistencia de los CPD causados por la R-UVB y removidos por el complejo UvrABC, es la responsable de los altos niveles de inducción SOS de la estirpe PQ37. Por otra parte, no existen reportes previos sobre la participación del producto del gen *recJ* (Exonucleasa RecJ) en la reparación del daño genético en el contexto de la respuesta SOS. La Exonucleasa RecJ degrada ADN de simple cadena 5' → 3' RecJ (Lovett y Kolodner 1989). Inicialmente se indicó su importancia en la recombinación y la reparación de los daños producidos por RUV en estirpes de *E. coli* *recBC*, *sbcB* (Horii y Clark 1973). Adicionalmente, la Exonucleasa RecJ ha sido relacionada con el procesamiento de la horquilla de replicación detenida por los daños genéticos producidos por la R-UVC (Courcelle y Hanawalt 1999; Courcelle et al. 2003). Según estos autores, la Exonucleasa RecJ y la Helicasa RecQ degradan la cadena rezagada naciente de ADN. Así, la Exonucleasa RecJ es esencial en el procesamiento de la horquilla de replicación obstruida para que el daño pueda ser reparado y la replicación restaurada. Esto explica por qué la estirpe IN400 (*recJ*) presenta niveles de inducción SOS superior a la estirpe silvestre. Una obstrucción de la horquilla de replicación debe mantener la respuesta SOS inducida hasta tanto ésta sea desbloqueada con la reparación del daño genético que permita la restauración de la replicación. Considerando que la proteína RecJ tiene un gen homólogo en humanos (Sanchez-Pulido y Ponting 2011), sería interesante estudiar el papel de esta proteína homóloga en la reparación del daño genético producido por RUV.

El estudio de la inducción de la respuesta SOS en las estirpes mutantes indicó, que dos estirpes, IN237 (*recO*) y IN250 (*recN*) no inducen tal respuesta cuando las células son tratadas con R-UVB. El gen *recO* fue reconocido inicialmente por su importancia en la vía de recombinación RecF (Kolodner et al. 1985) y por su alta

³⁷ Jaciuk M, Nowak E, Skowronek K, et al. (2011) Structure of UvrA nucleotide excision repair protein in complex with modified DNA. *Nature structural & molecular biology* 18:191–7. doi: 10.1038/nsmb.1973

³⁸ Kisker, Kuper, Van Houten. Op. Cit

sensibilidad frente a la R-UVC^{39,40}. Este gen codifica un polipéptido de 26.000 Mr⁴¹ que, acoplado a los productos de los genes *recF* y *recR*, cataliza la unión de la proteína RecA a ADNsc desplazando a la proteína SSB; y además, la unión del complejo ADNsc-RecA a una secuencia de ADN bicatenaria complementaria⁴². Dado que el complejo ADNsc-RecA cataliza la autodigestión del represor LexA, la ausencia del gen *recO* limita la inducción de la respuesta SOS frente a diferentes agentes genotóxicos^{43,44,45,46} (Anexo 2). Asimismo, el complejo ADNsc-RecA es el primer intermediario de los procesos de recombinación homóloga, y éstos son los que permiten la reparación de las discontinuidades del ADN producidas por la replicación del ADN dañado con R-UVB^{47,48}. Previo a este trabajo no se había evaluado la importancia del gen *recN* en la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* por tratamiento con RUV. Nuestros resultados sugieren que la proteína RecN es muy importante para la inducción de la respuesta SOS frente a la R-UVB. Trabajos previos han mostrado, que estirpes defectivas para *recN* no incrementan su sensibilidad frente a la R-RUV, pero sí cuando son tratadas con Mitomicina C y radiación gamma; mógatenos que principalmente producen roturas de doble

³⁹ Kolodner R, Fishel RA, Howard M (1985) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutations on plasmid recombination in Escherichia coli. J Bacteriol 163:1060–1066.

⁴⁰ Lloyd RG, Porton MC, Buckman C (1988) Effect of *recF*, *recD*, *recN*, *recO* and *ruv* mutations on ultraviolet survival and genetic recombination in a *recD* strain of Escherichia coli K12. 09:317–324.

⁴¹ Morrison PT, Lovett ST, Gilson LE, Kolodner R (1989) Molecular analysis of the Escherichia coli *recO* gene. Journal of bacteriology 171:3641–9.

⁴² Umezu et al 1993

⁴³ Hegde S, Sandler SJ, Clark AJ, Madiraju M V (1995) *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in Escherichia coli. Molecular & general genetics : MGG 246:254–8.

⁴⁴ Whitby MC, Lloyd RG (1995) Altered SOS induction associated with mutations in *recF*, *recO* and *recR*. Molecular & general genetics : MGG 246:174–9.

⁴⁵ Keller et al. 2001

⁴⁶ Serment-Guerrero J, Breña-Valle M, Espinosa-Aguirre JJ (2008) In vivo role of Escherichia coli single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. Mutagenesis 23:317–23. doi: 10.1093/mutage/gen017

⁴⁷ Rupp WD, Howard-flanders P (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an Excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. Journal of Molecular Biology 31:291–304. doi: 10.1016/0022-2836(68)90445-2

⁴⁸ Kuzminov. Op. Cit

cadena en el ADN^{49,50}. Adicionalmente, el producto del gen *recN* ha sido identificado como una proteína aglutinadora que hace parte de las principales rutas de reparación de roturas de doble cadena de ADN junto con el complejo RecBCD^{51,52}. Estirpes deficientes para *recN* tratadas con radiación gamma, presentan niveles de inducción SOS superiores a la estirpe silvestre⁵³, indicando su participación en la reparación de las roturas de doble cadena en el ADN. El presente hallazgo indica la necesidad del producto del gen *recN* para la inducción de la respuesta SOS en células tratadas con R-UVB y brinda nuevo conocimiento sobre cómo la repuesta SOS es regulada frente al tratamiento con R-UVB. Curiosamente, aunque la ausencia del gen *recN* no afecta significativamente la sobrevivencia celular pero si limitó significativamente la inducción SOS frente a R-UVB. (Gráfica 2, Tabla 3). El hecho de que la deficiencia para el gen *recN* bloquea la inducción de la respuesta SOS, pero no afecte la sobrevivencia celular en células irradiadas con R-UVB sugiere que RecN, además de su función en los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena, cumple una función moduladora durante la inducción de la respuesta SOS. En este contexto, resulta interesante que justo *recN* es el único gen SOS que presenta tres operadores para el represor LexA⁵⁴, mostrando niveles basales de inducción SOS muy bajos y siendo unos de los últimos genes SOS en inducirse durante la respuesta SOS. Así, su función en células irradiadas con R-UVB debe estar limitada a fases tardías de la respuesta SOS conocidas por estar asociadas con funciones como

⁴⁹ Pieksley SM, Attfield P V, Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in Escherichia coli K12 requires a functional recN product. Molecular & general genetics : MGG 195:267–274.

⁵⁰ Sargentini NJ, Smith KC (1986) Quantitation of the involvement of the recA, recB, recC, recF, recJ, recN, lexA, radA, radB, uvrD, and umuC genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in Escherichia coli. Radiation research 107:58–72.

⁵¹ Meddows TR, Savory AP, Grove JI, et al. (2005) RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. Molecular microbiology 57:97–110. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04677.x

⁵² Keyamura K, Sakaguchi C, Kubota Y, et al. (2013) RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. The Journal of biological chemistry 288:29229–37. doi: 10.1074/jbc.M113.485474

⁵³ Breña-Valle M, Serment-Guerrero J (1998) SOS induction by gamma-radiation in Escherichia coli strains defective in repair and/or recombination mechanisms. Mutagenesis 13:637–41.

⁵⁴ Finch PW, Chambers P, Emmerson PT (1985) Identification of the Escherichia coli recN gene product as a major SOS protein. Journal of bacteriology 164:653–8.

inhibición de la división celular y mutagénesis SOS; pero no con la reparación del daño genético^{55, 56, 57}. Si RecN regula o no procesos como la división celular y la mutagénesis SOS debe ser demostrado en futuros estudios. Sin embargo, el presente trabajo apoya la hipótesis que, además de la reparación del daño genético, la inducción de variabilidad bajo estrés genotóxico es una importante función durante la respuesta SOS⁵⁸. La proteína RecN hace parte de una familia de proteínas implicadas en el mantenimiento estructural del cromosoma. Representantes de esta familia se pueden encontrar en los tres dominios del árbol de la vida, y también en los seres humanos, donde se ha mostrado que son importantes para la reparación de roturas de doble cadena del ADN⁵⁹. Sería muy interesante evaluar el rol de estas proteínas humanas frente al daño causado por la RUV.

El producto del gen *recD* mostró ser importante para la inducción de la respuesta SOS frente a R-UVB pero en menor medida que los productos génicos RecO y RecN. Por el contrario, los productos de los genes *recB*, *oxyR*, *xonA*, *exoX* y *fpg* no fueron importantes para la inducción de la respuesta SOS por irradiación con R-UVB. Los productos de los genes *recB* y *recD* junto con el producto del gen *recC* conforman el complejo exonucleolítico RecBCD⁶⁰.

Éste fue inicialmente reconocido por su actividad exonucleolítica y posteriormente por su importancia para la recombinación, la reparación de roturas de doble cadena y la estabilización de la horquilla de replicación^{61, 62}. La supresión de los

⁵⁵ Crowley y Courcelle 2002

⁵⁶ Krishna et al. 2007

⁵⁷ Janion 2008

⁵⁸ Hersh et al. 2004

⁵⁹ Pellegrino et al. 2012

⁶⁰ Dillingham, Kowalczykowski. Op. Cit.

⁶¹ Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 63:751–813, table of contents.

LEHMAN IR, NUSSBAUM. Op. Cit.

⁶² Dillingham, Kowalczykowski. Op. Cit.

genes *recB* y *recC* inhiben la actividad del complejo RecBCD. Adicionalmente, la ausencia de los genes *recB* y *recC* aumentan los niveles de fragmentación cromosómica en células de *E. coli* irradiadas con UVC. Por el contrario, la inactivación del gen *recD* solo reduce a la mitad la actividad del complejo exonucleolítico y no incrementa la fragmentación cromosómica en células tratadas con RUV⁶³. Resulta interesante, que nuestros resultados indican que la inactivación del gen *recB* aumenta significativamente la radiosensibilidad frente a R-UVB, lo que no ocurre con la estirpe deficiente para el gen *recD*. De igual manera, *recD* es parcialmente requerida para la inducción de la respuesta SOS, mientras el gen *recB* no lo es. Esto sugiere que las funciones de estos genes en el contexto de la respuesta SOS son independientes. Adicionalmente, esto pone de manifiesto la importancia del complejo RecBCD en el procesamiento de las roturas de doble cadena consecuencia del tratamiento con R-UVB, aunque este procesamiento no aporta a la inducción de la respuesta SOS, como si lo hace frente a las roturas de doble cadena inducidas por radiación ionizante⁶⁴. La ausencia del gen *recD* no tuvo un efecto significativo en la sobrevivencia celular frente a R-UVB, pero si en alguna medida importante para la inducción SOS. Esto sugiere que el producto del gen *recD* además de participar del complejo RecBCD, que no aporta a la inducción SOS frente a R-UVB, participa en otra u otras rutas que si lo hacen. El producto del gen *recD* presenta actividad helicasa⁶⁵, por lo que su ausencia podría limitar la disponibilidad de ADNsc posterior a la irradiación.

⁶³ Ibid

⁶⁴ Tavera L, Breña M, Pérez M, et al. (2003) Response to alpha and gamma radiations of Escherichia coli strains defective in repair or protective mechanisms. Radiation Measurements 36:591–595. doi: 10.1016/S1350-4487(03)00207-5

⁶⁵ Taylor AF, Smith GR (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. Nature 423:889–93. doi: 10.1038/nature01674

El producto del gen *oxyR* es un activador transcripcional de un grupo de genes involucrados en la tolerancia al estrés oxidativo⁶⁶, la inactivación de este gen disminuye la sobrevivencia de *E. coli* frente a H₂O₂⁶⁷. Se ha sugerido que parte de los efectos deletéreos de la R-UVB son consecuencia de su capacidad para catalizar la formación de especies reactivas del oxígeno^{68, 69}. La estirpe OG100 fue tan radiosensible como la estirpe silvestre, sugiriendo que el daño oxidativo causado por la R-UVB no tiene un efecto significativo sobre la sobrevivencia celular en *E. coli* para nuestras condiciones. Por su parte, la Exonucleasa I (ExoI) codificada por el gen *xonA* es una exonucleasa 3' → 5' con preferencia por ADNsc⁷⁰. Aunque ExoI mostró ser importante para la inducción de la respuesta SOS frente a radiación gamma (Serment-Guerrero et al. 2008), no mostró serlo frente a R-UVB. El producto del gen *exoX* es la exonucleasa 3' → 5' ExoX⁷¹. *E. coli* cuenta con varias exonucleasas 3' → 5', por lo que sus funciones son redundantes^{72, 73}. Al igual que el producto del gen *xonA*, la actividad exonucleolítica 3' → 5' del producto del gen *exoX* no mostró ser importante para la inducción SOS, por lo tanto, la función exonucleolítica 3' → 5' no es necesaria para la inducción de la respuesta SOS por tratamiento con R-UVB. El producto del gen *fpg*, la Formamido Pirimidina Glisilasa participa en la reparación por

⁶⁶ Dubbs JM, Mongkolsuk S (2012) Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *Journal of bacteriology* 194:5495–503. doi: 10.1128/JB.00304-12

⁶⁷ Goerlich O, Quillardet P, Hofnung M (1989) Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology* 171:6141–7.

⁶⁸ Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, et al. (1997) Identification of Possible Reactive Oxygen Species Involved in Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative DNA Damage. *Free Radical Biology and Medicine* 23:980–985. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00126-3

⁶⁹ Santos AL, Gomes NCM, Henriques I, et al. (2012) Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 117:40–6. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.016

⁷⁰ LEHMAN IR, NUSSBAUM. Op. cit

⁷¹ Wang T, Sun H-L, Cheng F, et al. (2013) Recognition and processing of double-stranded DNA by ExoX, a distributive 3'-5' exonuclease. *Nucleic acids research* 41:7556–65. doi: 10.1093/nar/gkt495

⁷² Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, et al. (2001) Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 276:31053–8. doi: 10.1074/jbc.M105481200

⁷³ Đermić 2006

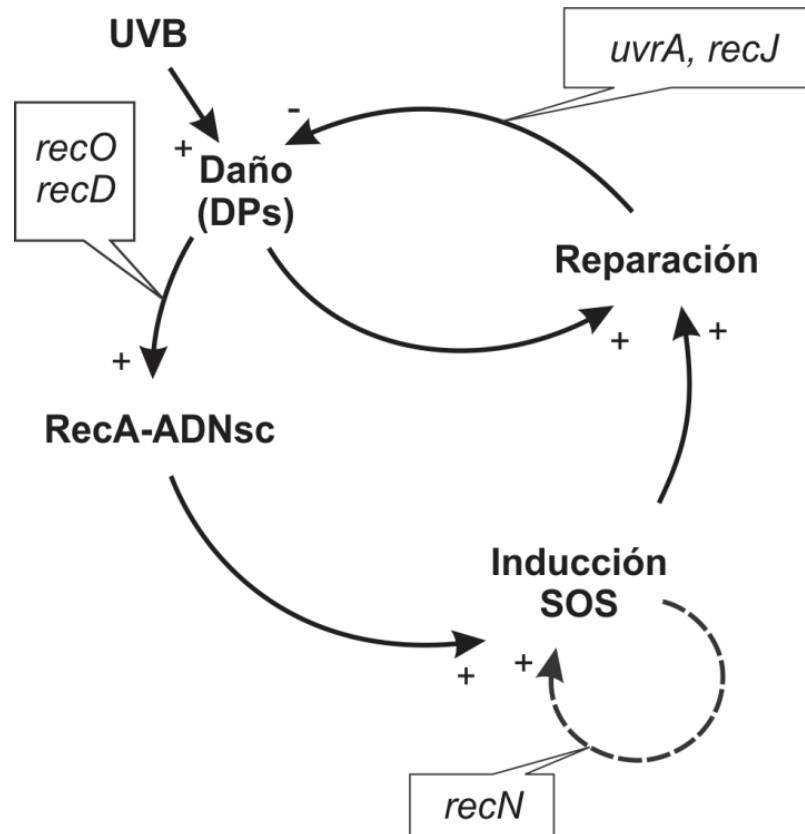
escisión de las bases nitrogenadas oxidadas del ADN⁷⁴. La no sensibilidad frente a la R-UVB de la estirpe *fpg* deficiente está en correspondencia con lo encontrado por Boiteux y Huisman (1989) y sugiere que la oxidación de bases nitrogenadas no aporta significativamente en la letalidad de la R-UVB. Además, la actividad glicosilasa parece no tener importancia en la inducción de la respuesta SOS frente a la R-UVB, por lo que la persistencia de bases nitrogenadas oxidadas no constituye una señal para la inducción SOS, en correspondencia con esta idea, estirpes *fpg* deficientes mostraron niveles de sobrevivencia e inducción SOS similares a la estirpe silvestre frente a radiación gamma.⁷⁵

Finalmente, la regulación de la respuesta SOS por tratamiento con R-UVB y la participación de los genes estudiados que mostraron ser parte de esta regulación se muestran en la Gráfica 3. Los efectos letales y la inducción SOS debidos a la irradiación con R-UVB pueden ser explicados principalmente por su capacidad para formar CPD en el ADN. Las rutas en las que participan los productos génicos UvrA y RecJ participan de la remoción de los daños que inducen la respuesta SOS, los productos de los genes *recO* y *recD* participan en las rutas que permiten la formación del complejo inductor de la respuesta SOS (RecA-ADNsc), siendo la ruta en la que participa RecO la más importante, asimismo, el producto del gen SOS *recN* es esencial para la inducción de la respuesta SOS por R-UVB, por lo que sugiere un nuevo aspecto de la regulación de la inducción de esta respuesta en *E. coli*.

⁷⁴ Schallow BJ, Courcelle CT, Courcelle J (2011) Escherichia coli Fpg glycosylase is nonredundant and required for the rapid global repair of oxidized purine and pyrimidine damage in vivo. Journal of molecular biology 410:183–93. doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.004

⁷⁵ Serment-Guerrero, Breña-Valle, Espinosa-Aguirre. Op. Cit.

Gráfica 3. Regulación de la inducción de la respuesta SOS por tratamiento con R-UVB y el rol de cada uno de los genes estudiados que participan de esta regulación.



5. CONCLUSIONES

- Las rutas en las que participan los productos de los genes *recO*, *recJ*, *recB* y *uvrA* mostraron ser las más importantes en la sobrevivencia de *E. coli* frente a la irradiación con R-UVB.
- En el contexto de la respuesta SOS de *E. coli*, los productos de los genes *uvrA* y *recJ* mostraron ser los más importantes para la reparación del daño genético producido por la R-UVB.
- Las rutas en las que participan los productos de los genes *recO* y *recN* son las más importantes para la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* por tratamiento con R-UVB; mientras que el producto del gen *recD* tiene un papel secundario en este proceso.
- Los productos de los genes *recB*, *oxyR*, *xonA*, *exoX* y *fpg* no mostraron ser importantes para la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* por tratamiento con R-UVB.
- Finalmente el rol de los genes estudiados en la regulación de la respuesta SOS frente al tratamiento con R-UVB se muestra en la Gráfica 3.

BIBLIOGRAFÍA

Aristizabal-Tessmer ET (2014) Efecto de la radiación ultravioleta tipo B sobre la sobrevivencia y la inducción de la respuesta SOS en estirpes bacterianas deficientes para las nucleasas RecJ y Exol. Pasantía de investigación, Universidad Industrial de Santander.

Beehler BC, Przybyszewski J, Box H, et al. (1992) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis* 13: 2003–2007.

BLISS CI (1935) THE CALCULATION OF THE DOSAGE-MORTALITY CURVE. *Annals of Applied Biology* 22:134–167. doi: 10.1111/j.1744-7348.1935.tb07713.x

Boiteux S, Huisman O (1989) Isolation of a formamidopyrimidine-DNA glycosylase (fpg) mutant of *Escherichia coli* K12. *Molecular & general genetics*: MGG 215:300–5.

Breña-Valle M, Serment-Guerrero J (1998) SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis* 13:637–41.

Butala M, Klose D, Hodnik V, et al. (2011) Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic acids research* 39:6546–57. doi: 10.1093/nar/gkr265

Courcelle J, Donaldson JR, Chow K-H, Courcelle CT (2003) DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. *Science (New York, NY)* 299:1064–7. doi: 10.1126/science.1081328

Courcelle J, Hanawalt PC (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : MGG 262:543–51.

Dermić D (2006) Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics* 172:2057–69. doi: 10.1534/genetics.105.052076

Dillingham MS, Kowalczykowski SC (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 72:642–71, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00020-08

Dubbs JM, Mongkolsuk S (2012) Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *Journal of bacteriology* 194:5495–503. doi: 10.1128/JB.00304-12

Finch PW, Chambers P, Emmerson PT (1985) Identification of the *Escherichia coli* *recN* gene product as a major SOS protein. *Journal of bacteriology* 164:653–8.

Goerlich O, Quillardet P, Hofnung M (1989) Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology* 171:6141–7.

González-Púmariega M, Tamayo MV, Sánchez-Lamar Á (2009) La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria* 18:69–80.

Hegde S, Sandler SJ, Clark AJ, Madiraju M V (1995) *recO* and *recR* mutations delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : MGG 246:254–8.

Horii Z-I, Clark AJ (1973) Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* k12: Isolation and characterization of mutants. *Journal of Molecular Biology* 80:327–344. doi: 10.1016/0022-2836(73)90176-9

Jaciuk M, Nowak E, Skowronek K, et al. (2011) Structure of UvrA nucleotide excision repair protein in complex with modified DNA. *Nature structural & molecular biology* 18:191–7. doi: 10.1038/nsmb.1973

Keyamura K, Sakaguchi C, Kubota Y, et al. (2013) RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 288:29229–37. doi: 10.1074/jbc.M113.485474

Kisker C, Kuper J, Van Houten B (2013) Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5:a012591. doi: 10.1101/cshperspect.a012591

Kolodner R, Fishel RA, Howard M (1985) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutations on plasmid recombination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163:1060–1066.

Kozmin SG, Pavlov YI, Kunkel TA, Sage E (2003) Roles of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerases Pol ϵ and Pol ζ in response to irradiation by simulated sunlight. *Nucleic acids research* 31:4541–52.

Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR 63:751–813, table of contents.

LEHMAN IR, NUSSBAUM AL (1964) THE DEOXYRIBONUCLEASES OF ESCHERICHIA COLI. V. ON THE SPECIFICITY OF EXONUCLEASE I (PHOSPHODIESTERASE). *The Journal of biological chemistry* 239:2628–36.

Little JW, Mount DW (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11–22.

Lloyd RG, Porton MC, Buckman C (1988) Effect of *recF*, *recD*, *recN*, *recO* and *ruv* mutations on ultraviolet survival and genetic recombination in a *recD* strain of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* 09:317–324.

Lovett ST, Kolodner RD (1989) Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:2627–31.

Meddows TR, Savory AP, Grove JI, et al. (2005) *RecN* protein and transcription factor *DksA* combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Molecular microbiology* 57:97–110. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04677.x

Morita R, Nakane S, Shimada A, et al. (2010) Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of nucleic acids* 2010:179594. doi: 10.4061/2010/179594

Morrison PT, Lovett ST, Gilson LE, Kolodner R (1989) Molecular analysis of the *Escherichia coli recO* gene. *Journal of bacteriology* 171:3641–9.

Pieksley SM, Attfield P V, Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional recN product. *Molecular & general genetics* : MGG 195:267–274.

Quillardet P, Frelat G, Nguyen VD, Hofnung M (1989) Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. *Mutation research* 216:251–7.

Quillardet P, Hofnung M (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation research* 147:65–78.

Rupp WD, Howard-flanders P (1968) Discontinuities in the DNA synthesized in an Excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation. *Journal of Molecular Biology* 31:291–304. doi: 10.1016/0022-2836(68)90445-2

Sanchez-Pulido L, Ponting CP (2011) Cdc45: the missing RecJ ortholog in eukaryotes? *Bioinformatics* (Oxford, England) 27:1885–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btr332

Santos AL, Gomes NCM, Henriques I, et al. (2012) Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 117:40–6. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.016

Sargentini NJ, Smith KC (1986) Quantitation of the involvement of the recA, recB, recC, recF, recJ, recN, lexA, radA, radB, uvrD, and umuC genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiation research* 107:58–72.

Schalow BJ, Courcelle CT, Courcelle J (2011) Escherichia coli Fpg glycosylase is nonredundant and required for the rapid global repair of oxidized purine and pyrimidine damage in vivo. *Journal of molecular biology* 410:183–93. doi: 10.1016/j.jmb.2011.05.004

Serment-Guerrero J, Breña-Valle M, Espinosa-Aguirre JJ (2008) In vivo role of Escherichia coli single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis* 23:317–23. doi: 10.1093/mutage/gen017

Svobodova A, Walterova D, Vostalova J (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 150:25–38.

Tavera L, Breña M, Pérez M, et al. (2003) Response to alpha and gamma radiations of Escherichia coli strains defective in repair or protective mechanisms. *Radiation Measurements* 36:591–595. doi: 10.1016/S1350-4487(03)00207-5

Taylor AF, Smith GR (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. *Nature* 423:889–93. doi: 10.1038/nature01674

Thoms B, Borchers I, 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* 190:179–92. doi: 10.1128/JB.01052-07

Viswanathan M, Burdett V, Baitinger C, et al. (2001) Redundant exonuclease involvement in Escherichia coli methyl-directed mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 276:31053–8. doi: 10.1074/jbc.M105481200

Wade JT, Reppas NB, Church GM, Struhl K (2005) Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the Escherichia coli genome and identifies unconventional target sites. *Genes & development* 19:2619–30. doi: 10.1101/gad.1355605

Wang T, Sun H-L, Cheng F, et al. (2013) Recognition and processing of double-stranded DNA by ExoX, a distributive 3'-5' exonuclease. *Nucleic acids research* 41:7556–65. doi: 10.1093/nar/gkt495

Whitby MC, Lloyd RG (1995) Altered SOS induction associated with mutations in recF, recO and recR. *Molecular & general genetics* : MGG 246:174–9.

Zhang APP, Pigli YZ, Rice P a (2010) Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature* 466:883–6. doi: 10.1038/nature09200

Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, et al. (1997) Identification of Possible Reactive Oxygen Species Involved in Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative DNA Damage. *Free Radical Biology and Medicine* 23:980–985. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00126-3

ANEXOS

ANEXO A. Factor de inducción SOS para las diferentes dosis de R-UVB evaluadas a las estirpes de *E. coli* IN237 (*recO*), IN250 (*recN*), IN400 (*recJ*)[†], IN520 (*exoX*), IN602 (*recB*), IN650 (*recD*), IN700 (*fpg*), IN900 (*xonA*)[†], OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*) y PQ30 (silvestre).

Factor de inducción ± error estándar											
Dosis UVB (J/cm ²)	PQ30 (silvestre)	IN237 (<i>recO</i>)	IN250 (<i>recN</i>)	IN400 [†] (<i>recJ</i>)	IN520 (<i>exoX</i>)	IN602 (<i>recB</i>)	IN650 (<i>recD</i>)	IN700 (<i>fpg</i>)	IN900 [†] (<i>xonA</i>)	OG100 (<i>oxyR</i>)	PQ37 (<i>uvrA</i>)
0.000	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
0.001	2.25 ± 0.12	1.25 ± 0.06	1.18 ± 0.04	3.91 ± 0.26**	2.00 ± 0.07**	1.44 ± 0.15	1.33 ± 0.02	1.81 ± 0.11*	2.16 ± 0.11	1.66 ± 0.12	8.71 ± 0.19***
0.002	3.21 ± 0.32***	1.25 ± 0.05	1.18 ± 0.04***	-	3.23 ± 0.09***	2.52 ± 0.22	1.91 ± 0.05***	2.71 ± 0.16***	-	2.74 ± 0.17***	8.40 ± 0.32***
0.003	3.46 ± 0.18***	1.29 ± 0.05	1.56 ± 0.03***	5.87 ± 0.50***	4.76 ± 0.16***	3.19 ± 0.35	2.89 ± 0.13***	3.39 ± 0.09***	3.57 ± 0.16***	2.84 ± 0.20***	8.67 ± 0.47***
0.004	4.74 ± 0.41***	1.57 ± 0.12***	1.68 ± 0.10***	-	4.12 ± 0.10***	4.21 ± 0.29*	2.97 ± 0.06***	4.00 ± 0.14***	-	3.82 ± 0.22***	9.25 ± 0.39***
0.005	4.35 ± 0.30***	1.31 ± 0.09	1.73 ± 0.04***	6.35 ± 0.57***	5.32 ± 0.16***	4.11 ± 0.40	3.18 ± 0.14***	4.45 ± 0.10***	-	4.47 ± 0.27***	9.01 ± 0.43***
0.006	5.94 ± 0.49***	1.26 ± 0.05	1.80 ± 0.05***	-	6.10 ± 0.14***	5.84 ± 0.75***	3.47 ± 0.12***	4.95 ± 0.18***	4.38 ± 0.32***	4.63 ± 0.32***	7.75 ± 0.33***
0.007	6.87 ± 0.34***	1.60 ± 0.10***	1.79 ± 0.06***	7.59 ± 0.60***	6.87 ± 0.18***	6.68 ± 0.95***	3.99 ± 0.09***	5.76 ± 0.16***	-	5.55 ± 0.31***	7.95 ± 0.34***
0.008	7.08 ± 0.48***	1.21 ± 0.06	1.85 ± 0.06***	-	7.87 ± 0.31***	7.03 ± 0.94***	4.21 ± 0.18***	5.90 ± 0.42***	5.03 ± 0.26***	5.10 ± 0.31***	7.99 ± 0.30***

Factor de inducción ± error estándar											
Dosis UVB (J/cm ²)	PQ30 (silvestre)	IN237 (<i>recO</i>)	IN250 (<i>recN</i>)	IN400† (<i>recJ</i>)	IN520 (<i>exoX</i>)	IN602 (<i>recB</i>)	IN650 (<i>recD</i>)	IN700 (<i>fpg</i>)	IN900† (<i>xonA</i>)	OG100 (<i>oxyR</i>)	PQ37 (<i>uvrA</i>)
0.009	-	1.39 ± 0.08**	-	7.00 ± 0.71***	-	8.79 ± 1.46***	-	-	-	-	8.74 ± 0.71***
	7.60 ± 0.48***	1.41 ± 0.11**	2.23 ± 0.13***	-	9.17 ± 0.17***	8.41 ± 1.10***	5.12 ± 0.23***	6.63 ± 0.17***	-	6.13 ± 0.39***	9.76 ± 0.28***
0.011	-	-	-	7.60 ± 0.81***	-	-	-	-	5.04 ± 0.34***	-	-
	8.95 ± 0.56***	-	2.50 ± 0.15***	-	9.75 ± 0.37***	-	5.96 ± 0.12***	6.82 ± 0.18	-	6.55 ± 0.43***	-

Diferencias en el factor de inducción en relación al control negativo (Dosis 0.000) para cada estirpe usando una prueba Tukey (*, p < 0.1, **, p < 0.05, ***, p < 0.01).

† Los datos para estas estirpes fueron usados con permiso de Aristizabal-Tesmer (2014).

ANEXO B. Inducción SOS de las estirpes PQ37 (*uvrA*), IN237 (*recO*) e IN250 (*recN*) frente a los mutágenos de referencia 4-Nitroquinolina-1-Óxido (4NQO) y Mitomicina C (MMC).

	Factor de inducción SOS ± Error estándar		
	PQ37 (<i>uvrA</i>)	IN237 (<i>recO</i>)	IN250 (<i>recN</i>)
Control negativo	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.06
4NQO (2.34 µM)	11.63 ± 0.96	2.52 ± 0.95	2.84 ± 0.56
MMC (0.6 µg/ml)	4.57 ± 0.22	2.34 ± 0.31	12.80 ± 5.09

La cuantificación de la inducción SOS se realizó de acuerdo a la metodología de (Quillardet and Hofnung 1985). Se realizó un experimento con cuatro réplicas para cada tratamiento. La concentración de los mutágenos en el cultivo líquido es presentada. Estos resultados sugieren que independiente del tipo de daño, el producto del gen *recO* es muy importante para la inducción de la respuesta SOS, por su parte, el producto del gen *recN* parece ser muy importante en la inducción de la respuesta SOS frente a daños genéticos que distorsionan la doble hélice de ADN como los CPD causados por la R-UVB o las alteraciones causadas por 4NQO, pero no frente a las roturas de doble cadena.