



Inducción de los genes *recA*, *umuC* y *sulA* de *E. coli* por irradiación gamma

Fuentes JL¹, Ferrer M¹, Almeida E¹, Prieto E¹ y Llagostera M^{2*},

¹ Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear (CEADEN). Calle 30 n° 502 e/5ta y 7ª. PO Box 6122, Miramar, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba.

² Universitat Autònoma de Barcelona. Departamento de Genètica i de Microbiologia, Edifici Cn. 08193 Bellaterra, Barcelona, España.

Recibido 5 de Mayo de 1998 / Aceptado 14 de Septiembre de 1998

Resumen: En este trabajo se ha estudiado la inducción de tres fusiones de diferentes genes SOS (*recA::lacZ*, *umuC::lacZ* y *sulA::lacZ*) en células de *Escherichia coli* MC1061 sometidas a irradiación gamma. Se ha demostrado que este tratamiento fue capaz de inducir los genes *recA* y *sulA* a un nivel similar, ya que el factor de inducción de ambos genes fue aproximadamente de 4,5. La radiación gamma fue especialmente potente en la inducción del gen *umuC*, el cual presentó aproximadamente un factor de inducción de 27. Los resultados encontrados sugieren que la vía de reparación SOS tendente al error puede estar implicada en los efectos mutagénicos producidos por la irradiación gamma. Además, estos resultados también indican que la cepa *Escherichia coli* MC1061, portadora de la fusión *umuC::lacZ*, puede ser útil en estudios sobre los efectos genéticos de dicha radiación, así como en la búsqueda de posibles agentes radioprotectores.

Palabras clave: irradiación gamma, inducción de los genes SOS *umuC*, *recA* y *sulA*.

Abstract: Induction of *recA*, *umuC* and *sulA* of *E. coli* by gamma-irradiation. The induction of three fusions of SOS genes (*recA::lacZ*, *umuC::lacZ* and *sulA::lacZ*) in *E. coli* MC1061 by gamma irradiation has been studied. This treatment was able to induce *recA* and *sulA* genes to similar levels, because the induction factor of both genes was approximately 4.5. However, gamma irradiation was specially potent in inducing *umuC* gene with an induction factor of 27. Results found suggest that the error-prone pathway can participate in mutagenesis induced by this treatment. In addition, results also indicate that strain MC1061, carrying the *umuC::lacZ* fusion can be useful to study the genetic effects of this irradiation as well as in research of possible radioprotective compounds.

Key words: Gamma irradiation, induction of *umuC*, *recA* and *sulA* genes

Introducción

A pesar de que no se conoce con precisión la naturaleza de las lesiones producidas por la irradiación gamma, se sabe que una de sus consecuencias biológicas es introducir roturas en el DNA (Ward, 1975). Dichas roturas pueden generar una señal inductora de la respuesta SOS bacteriana (Friedberg et al., 1995). La red SOS está integrada por más de 20 genes, es inducible por agentes que provocan lesiones en el DNA y se halla bajo el control de las proteínas LexA y RecA. La expresión de los genes SOS conduce a la manifestación de una serie de respuestas fisiológicas, tales como la amplificación de la proteína *RecA* (gen *recA*), la mutagénesis SOS (genes *umuD* y *umuC*) y la inhibición de la división celular (gen *sulA*), entre otras. Se sabe que la inducción de la respuesta SOS puede dar lugar a estadios intermedios de inducción en los cuales no todos los genes SOS están totalmente desreprimidos. Se ha sugerido que ello puede depender de la intensidad del tratamiento, de la existencia de elementos reguladores adicionales o bien de que no todos los genes SOS presentan la misma cinética de desrepresión (Friedberg et al., 1995).

Con el objetivo de determinar de forma indirecta la capacidad de diferentes compuestos químicos de lesionar el DNA y de inducir el sistema SOS, se han desarrollado diferentes ensayos bacterianos, como el Chromotest (Quillardet y Hofnung, 1984), el *umu-test* (Oda et al., 1985) o el ensayo *RecA-lac* (Nunoshiba and Nishioka, 1991). La base de todos estos ensayos radica en el uso de cepas de *E. coli* que contienen una fusión de operones entre la región de control de un gen SOS, (*sulA* en el SOS Chromotest, *umuC* en el *umu-test* y *recA* en el ensayo *RecA-lac*) y el gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa. Por tanto en todas estas cepas la expresión del gen *lacZ* está bajo el control de un gen SOS, y puede determinarse si un compuesto induce el sistema SOS, monotorizando la síntesis de β -galactosidasa. Se sabe que el SOS Chromotest es sensi-

* A quien dirigir la correspondencia

ble a la irradiación gamma (Quillardet et al., 1989; Kozubek et al., 1990) y también que este tratamiento induce el gen *recA* de la cepa GE94 de *E. coli*, portadora de una fusión *recA::lacZ* (Näslund et al., 1992).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se introdujeron tres fusiones de genes SOS diferentes *-umuC::lacZ*, *recA::lacZ* y *sulA::lacZ* en la cepa MC1061 de *E. coli*, con el objetivo de eliminar al máximo las diferencias en la expresión de los genes SOS motivadas por los distintos fondos genéticos de las cepas de ensayo construidas por diferentes autores (Ysern, 1988; Ysern et al., 1990). Dichas cepas fueron útiles en la determinación del patrón de inducción de genes SOS mediada por los antimicrobianos fluoroquinolonas y por diferentes análogos del agente antitumoral cisplatino (Ysern et al., 1990; Pueyo, 1993). En el trabajo que se presenta se ha determinado el patrón de inducción de genes SOS, así como la supervivencia bacteriana, debido al tratamiento con irradiación gamma de las mencionadas cepas bacterianas.

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Características relevantes	Procedencia
MC1061	F ⁻ , <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> , <i>galV</i> , <i>galK</i> , <i>hsdR</i> , <i>rpsL22</i>	M. Casadaban
UA4537	MC1061/pSK1002	Ysern et al., 1990
UA4567	MC1061 but <i>sulA::lacZ</i>	Ysern et al., 1990
UA4572	MC1061 but <i>recA::lacZ</i>	Ysern et al., 1990

Procedimiento de irradiación

Se crecieron los cultivos bacterianos a 37°C, con agitación y en medio LB, hasta alcanzar una absorbancia de 0,150-0,200 a 600 nm. Seguidamente, alícuotas de 2 ml fueron irradiados con rayos gamma a dosis comprendidas entre 0 y 300 Gy. Los cultivos tratados fueron incubados con agitación durante 2 h a 37°C. Al finalizar este tiempo, se determinó la absorbancia a 660 nm y las unidades de β -galactosidasa.

Determinación de la β -galactosidasa

Este ensayo se realizó siguiendo el método descrito por Miller (1972). Una vez determinadas las unidades de β -galactosidasa, se calculó el factor de inducción (FI), dividiendo la actividad β -galactosidasa obtenida en los cultivos tratados por la que presentaba la misma cepa sin tratamiento alguno.

Ensayos de supervivencia

Después de la irradiación de los cultivos, comentada anteriormente, se sembraron diluciones adecuadas en placas de agar nutritivo y, tras 24 h de incubación a 37°C, se procedió al conteo de las colonias.

Resultados y Discusión

Se ha determinado la supervivencia bacteriana frente a la irradiación gamma así como la inducción de tres genes SOS de *E. coli* mediada por este tratamiento. Los resultados obtenidos indican que la supervivencia de las cepas UA4567 y UA4572, portadoras respectivamente de las fusiones *sulA::lacZ* y *recA::lacZ* fue mayor que la supervivencia que la cepa MC1061 de *E. coli* (Figura 1). En contraste, este efecto no se observó con la cepa UA4537, portadora de la fusión *umuC::lacZ* en el plásmido pSK1002, mostrando dicha cepa una supervivencia similar a la de la cepa salvaje a las diferentes dosis ensayadas. Estos resultados podrían atribuirse al proceso de construcción y de localización de las fusiones. Así, las cepas UA4567 y UA4572, fueron obtenidas por transducción y las fusiones se localizan en el cromosoma, mientras que la cepa UA4537 porta la fusión *umuC::lacZ* en un plásmido multicopia.

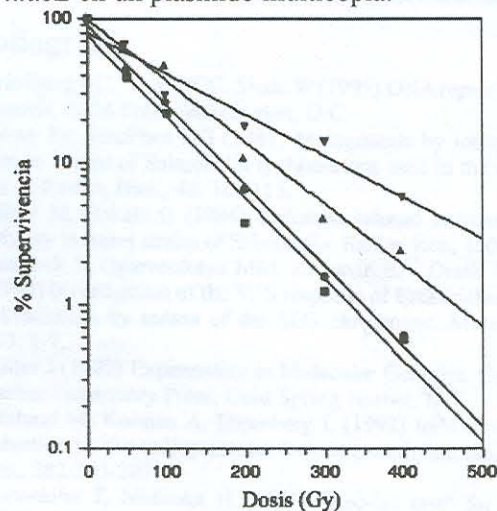


Figura 1. Supervivencia de las cepas MC1061 (●), UA4572 (▼), UA4537 (■), y UA4567 (▲) a la irradiación gamma.

Al analizar el patrón de inducción de genes SOS por tratamiento con rayos gamma, se detectó que los tres genes analizados eran inducibles, si bien se observaron diferencias muy significativas en los niveles de inducción. En la Figura 2 puede observarse que tanto el gen *sulA* como el gen *recA* presentan el nivel de inducción más elevado a dosis de 100 Gy, mientras que la mayor inducción del gen *umuC* se detecta a 200 Gy. El máximo factor de inducción (FI) de los genes *sulA* y *recA* se alcanzó a la dosis de 100 Gy y fue de 4,5, mientras que el máximo FI del gen *umuC* fue de 27 a una dosis de 200 Gy (Figura 3).

Los resultados hallados en este trabajo sobre el patrón de inducción de los genes SOS utilizando las cepas previamente construidas por nosotros parecen indicar que dicho patrón está relacionado con el tipo de daño producido en el DNA por cada tratamiento. En este senti-

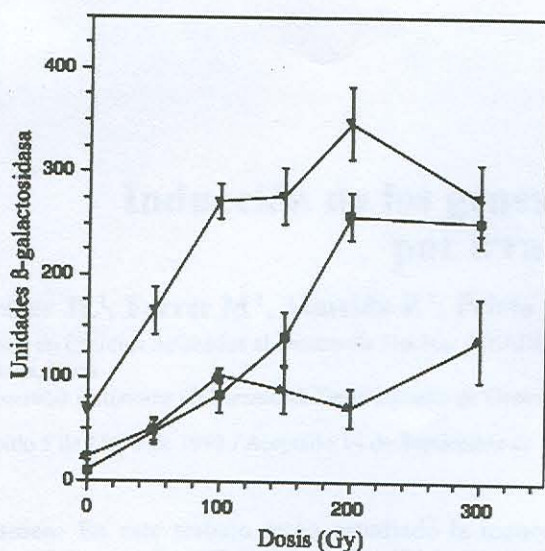


Figura 2. Unidades β -galactosidasa detectadas en las cepas UA4572 (▼), UA4537 (■) y UA4567 (▲) tras irradiarlas con rayos gamma.

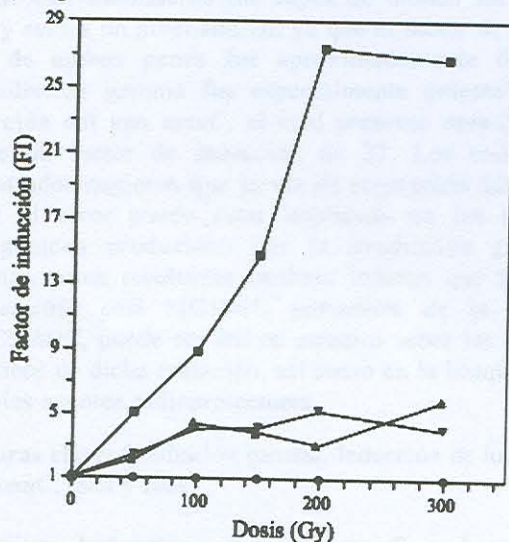


Figura 3. Factor de inducción (FI) de los genes *recA* (▼), *umuC* (■) y *sulA* (▲) debido a la irradiación gamma. El factor de inducción de la cepa MC1061 (●) se muestra como control.

do y utilizando estas cepas, nosotros hemos reportado que el patrón de inducción SOS para la mitomicina fue *umuC*>*sulA*>*recA*, para la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina *sulA*>*umuC*>*recA* y para las fluoroquinolonas o los análogos de cis-platino estudiados se obtuvieron diferentes patrones en función del compuesto analizado (Ysern et al., 1990; Pueyo, 1993). También debe indicarse que la cinética de inducción de los genes SOS, así como los máximos valores de inducción (máximo FI) varían en atención a las cepas utilizadas. Así, en el SOS Chromotest el FI del gen *sulA* alcanza un valor máximo a una dosis de irradiación gamma de 200 Gy (Quillardet et al., 1989).

Por otro lado, y a pesar de que hay discrepancias en los resultados obtenidos por diferentes autores, utilizando el ensayo de Ames se ha demostrado que la irradiación gam-

ma puede inducir mutaciones (Imray and MacPhee, 1981; Isildar and Bakale, 1984; Roos et al., 1985). Nuestros datos acerca de que dicho tratamiento es un potente inductor del gen *umuC* sugieren que la vía de reparación SOS tendente al error, debe estar implicada en la inducción del efecto mutagénico de dicha irradiación.

Finalmente, es de destacar que se ha encontrado que la cepa UA45.37, portadora de la fusión *umuC::lacZ* en el plásmido pSK1002, presenta la misma supervivencia que la cepa salvaje frente a la irradiación gamma y el factor de inducción más elevado. Por ello, pensamos que dicha cepa puede ser útil en el estudio de los efectos genéticos producidos por este tratamiento y también nos puede proveer de un método sensible y rápido en la búsqueda de compuestos químicos con efectos de radioprotección frente a la irradiación gamma.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. M. Casadaban su gentileza al mandarnos la cepa MC1061 utilizada en este trabajo.

Bibliografía

1. Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
2. Imray FP, MacPhee DG (1981) Mutagenesis by ionizing radiation in strains of *Salmonella typhimurium* used in the Ames test. *Int. J. Radiat. Biol.*, 40: 111-115.
3. Isildar M, Bakale G (1984) Radiation-induced mutagenicity and lethality in Ames strains of *Salmonella*. *Radiat. Res.*, 100: 396-411.
4. Kozubek S, Ogievetskaya MM, Krasavin EA, Drasil V, Soska J (1990) Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after g-irradiation by means of the SOS chromotest. *Mutation Res.*, 230: 1-7.
5. Miller J (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
6. Näslund M, Kolman A, Ehrenberg L (1992) Inhibition of *recA* induction by the radioprotector 2-mercaptoethylamine. *Mutation Res.*, 282:203-207.
7. Nunoshiba T, Nishioka H (1991) "Rec-lac test" for detecting SOS-inducing activity of environmental genotoxic substances. *Mutat. Res.*, 254: 71-77.
8. Oda Y, Nakamura S, Oki I, Kato T, Shinagawa H (1985) Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.*, 147: 219-229.
9. Pueyo M (1993) Reparación de las lesiones producidas por cisplatino en *E. coli* y aplicación de test bacterianos al prescreening de derivados de platino con posible actividad antitumoral. PhD., Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.
10. Quillardet P, Hofnung M (1993) The SOS Chromotest, a colorimetric assay for genotoxins: procedures. *Mutation Res.*, 147: 65-78.
11. 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 Res.*, 216:251-257.
12. Roos H, Thomas WH, Kellerer A (1985) Enhanced response of the *Salmonella* mutagenicity test to ionizing radiations. *Radiat. Res.*, 104: 102-108.
13. Ward J.F (1975) Molecular mechanisms of radiation-induced damage to nucleic acids. *Adv. Radiat. Biol.*, 5, 181.
14. Ysern, P. (1988) Aplicación del sistema SOS a la detección de productos genotóxicos. Tesina de licenciatura, Universidad Autònoma de Barcelona.
15. Ysern P, Clerch B, Castaño M, Gibert I, Barbé J, Llagostera M (1990) Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis*, 5: 63-66.