

MODULACIÓ DE LA INDUCCIÓ DEL SISTEMA DE REPARACIÓ D'EMERGÈNCIA (SOS) A *ESCHERICHIA COLI* PER LA REGIÓ AMINO-TERMINAL DE LA PROTEÏNA RecA.

JORDI BARBÉ, MONTSERRAT SALA, MONTSERRAT LLAGOSTERA
i RICARD GUERRERO*

*Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra (Barcelona). * Departament de Microbiologia. Universitat de Barcelona.*

SUMMARY

The amino-terminal fragment of the RecA protein was cloned in pUA27 plasmid and introduced in different repair mutants of *Escherichia coli*. The UV-mediated induction of several SOS functions was then studied. Results show that the truncated RecA protein plays an important role in the UV-damaged DNA when the level of the chromosomal RecA protein is low. Furthermore, RecA protein inhibited the protease activity of the wild type RecA protein causing a decrease in the SOS system induction. All these data suggest that hybrid tetramers between both truncated and wild type RecA proteins may be formed, and as a consequence the ATPase capacity and active conformation of the wild type RecA protein are blocked.

INTRODUCCIÓ

La inhibició de la replicació normal del DNA per l'acció d'agents físics o químics indueix l'expressió de diverses funcions cel·lulars que constitueixen l'anomenat sistema de reparació d'emergència (o SOS). Aquest sistema està regulat per dues proteïnes, la proteïna RecA, que s'activa a una conformació proteàsica per un senyal inductor, i la proteïna LexA, que reprimeix una sèrie de gens que constitueixen el sis-

tema SOS (RADMAN, 1975; WITKIN, 1976).

Fins l'actualitat s'han descrit 32 activitats cel·lulars integrants de la resposta SOS. S'han identificat 17 gens que controlen 17 activitats cel·lulars i que a la vegada estan sota el control directe de l'activitat de la proteasa RecA, la qual està reprimida per la proteïna LexA. A més, s'han descrit d'altres gens induïbles per tractaments que lesionen el DNA, encara que no s'han identificat ni les seves funcions ni els pro-

TAULA 1
Mutacions en el gen *recA* d'*Escherichia coli* estudiades en aquest treball

Soca	Genotip	Mutació	Fenotip
GY4752	<i>ΔrecA</i>	Deleció	Deficient en recombinació i hidròlisi del repressor LexA
GY2798	<i>recA441 recA453</i>	Mutació puntual en la regió estructural i en l'operador	Incapaç d'amplificar la síntesi de proteïna RecA
DM2211	<i>recA_o98</i>	Mutació en l'operador	Síntesi constitutiva de proteïna RecA
AB1157	Salvatge	Salvatge	Salvatge
GY754	<i>recA13</i>	Mutació puntual en la regió estructural	Deficient en recombinació i hidròlisi del repressor LexA
IC41	<i>recA430</i>	Mutació puntual en la regió estructural	Deficient en hidròlisi del repressor LexA

ductes que codifiquen (KENYON i WALKER, 1980).

Durant el creixement normal d'una població bacteriana, la proteïna RecA està present en les cèl·lules en un nivell basal, i no mostra activitat proteàsica, essent la seva síntesi reprimida per la proteïna LexA. Quan en una cèl·lula es lesiona el DNA o s'atura la replicació, es genera el senyal inductor que activa reversiblement l'activitat proteàsica específica de la proteïna RecA. En aquesta situació, RecA és capaç de trencar la proteïna repressora LexA i també unes altres poques proteïnes, com el repressor del profag Lambda. La proteïna RecA activada trenca el repressor LexA per un enllaç peptídic alanina-glicina, situat prop de la meitat de la proteïna, produint dos fragments polipeptídics. Quan té lloc aquesta reacció, s'observa un descens en els nivells intracel·lulars de proteïna LexA, alhora que augmenta l'expressió dels diferents gens SOS, i, com a conseqüència, es posa de manifest la resposta SOS.

Existeixen proves de que, sota certes condicions, els tractaments inductors d'a-

quest sistema provoquen l'expressió de fenotips SOS parcials (WITKIN, 1976). Així, els treballs de diferents autors han demostrat que la resposta SOS no és un fenomen de "tot o res", sinó que pot tenir lloc una expressió diferencial de les funcions que la componen (HUTCHINSON i STEIN, 1980; GUERRERO i BARBÉ, 1982). Aquest fenomen està d'acord amb el model proposat per WALKER (1984) en el què es suposa que existeix una gradació en la intensitat de la inducció del sistema.

Quan la cèl·lula comença a recobrar-se del tractament inductor, degut per exemple a la reparació del DNA, s'elimina el senyal inductor i les molècules de RecA tornen a l'estat d'inactivació pel que fa a la seva funció proteàsica. En absència d'aquesta proteasa, augmenta el nivell intracel·lular de proteïna LexA, la qual reprimeix els gens del sistema SOS i la cèl·lula retorna al seu estat inicial de no inducció.

En la figura 1 es presenta un esquema del model de sistema SOS més acceptat actualment, el qual es basa en que el senyal inductor consisteix en discontinuïtats en les cadenes de DNA i/o en oligonuclòtids

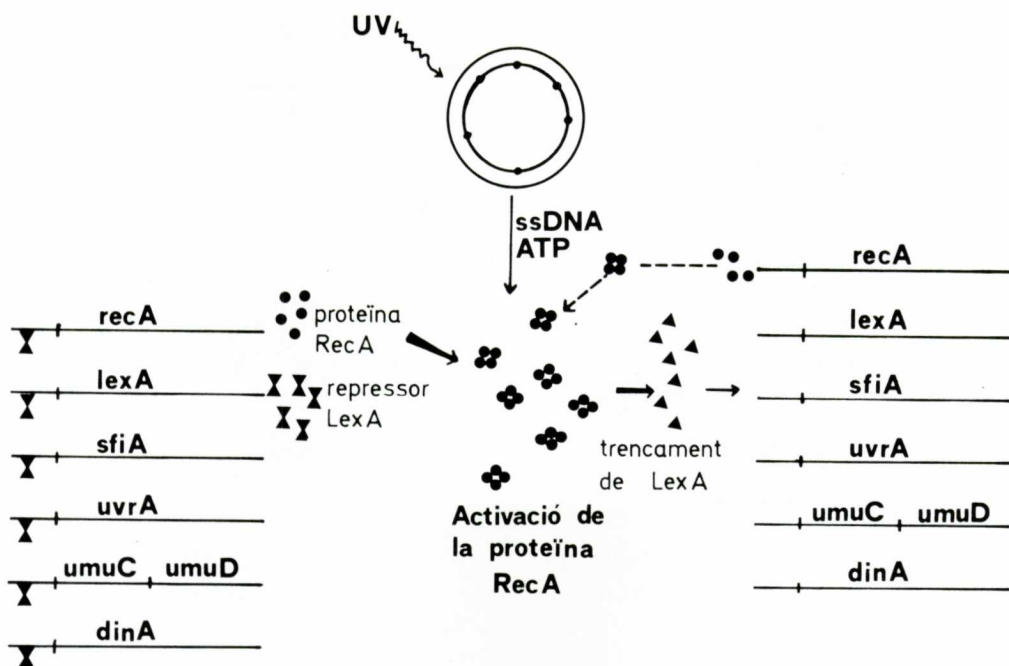


Fig. 1. Model per a l'expressió de les diferents funcions del sistema SOS a *Escherichia coli* mitjançant l'activació de la proteïna RecA. Vegeu l'explicació en el text.

inespecífics provinents de la degradació del DNA (OISHI *et al.*, 1979). Els treballs realitzats fins ara, indiquen que la inducció de les funcions d'aquest sistema de reparació comporta l'amplificació i l'activació de la proteïna RecA. S'ha suggerit que aquesta activació va acompanyada d'un canvi conformational de la molècula de proteïna RecA (ROBERTS i DEVORET, 1983). En aquest sentit, estudis realitzats *in vivo* mostren que la proteïna RecA actua en forma multimèrica, amb interaccions funcionals entre diferents monòmers (YARRANTON i SEDGWICK, 1982; REBOLLO *et al.*, 1984; YANCEY i PORTER, 1984). Aquestes dades coincideixen amb els resultats trobats en estudis *in vitro*, on la proteïna RecA s'associa espontàniament donant lloc a llargs filaments (FLORY i RADDING, 1982), que semblen tenir un paper important en el fenomen de recombinació (HO-

WARD-FLANDERS *et al.*, 1984). Malgrat aquestes dades, no existeixen resultats concloents que expliquin com es regula *in vivo* l'activitat de la proteïna RecA mitjançant la interacció entre dita proteïna, el DNA i algun cofactor, i si la modulació de la seva activitat pot ésser, al menys en part, la responsable de l'expressió diferencial de les funcions SOS. Tampoc s'ha esbrinat encara el paper que podrien tenir els diferents tipus de cofactors existents en aquesta modulació i regulació.

En aquest sentit, s'ha demostrat que la naturalesa del tractament inductor i la intensitat de la degradació del DNA produïda per l'activitat de l'enzim RecBC, són paràmetres importants per la manifestació del patró d'expressió d'aquest sistema (GUERRERO i BARBÉ, 1982; BARBÉ *et al.*, 1983a, b, c, d, 1985). De la mateixa manera, s'ha trobat que el tractament d'*E. coli*

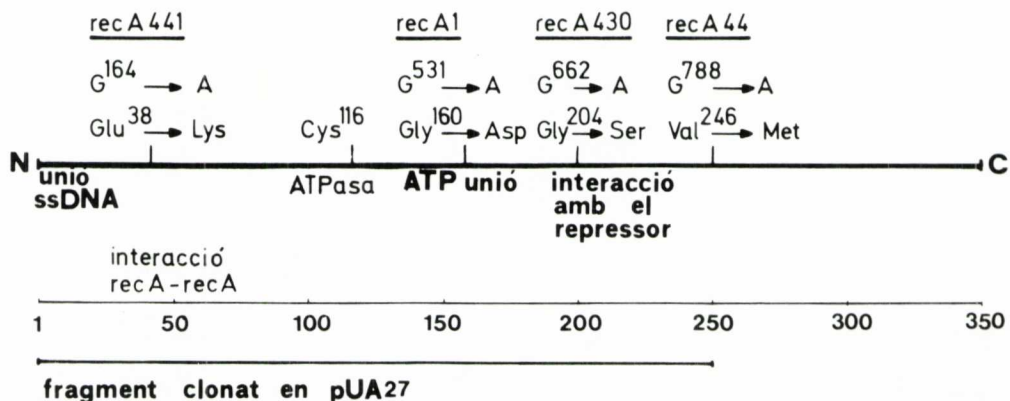


Fig. 2. Mapa funcional de la proteïna RecA. (Modificat de Kawashima *et al.*, 1984).

amb radiació ultraviolada produeix una duplicació del nivell d'ATP durant els primers 20 minuts i que posteriorment, aquest nivell decau ràpidament a valors inferiors als de les cèl·lules no irradiades (BARBÉ *et al.*, 1983a). El fet de que el descens d'ATP no es produeixi en els mutants *recA*, *lexA*, *ssb* i *recF*, indica que està regulat pel sistema RecA-LexA, i per tant relacionat amb el sistema SOS. Així mateix, s'ha observat que aquest ATP prové de la metabolització dels productes de degradació del DNA per mitjà d'una fosforilació a nivell de substrat. D'aquesta manera, la cèl·lula pot disposar de l'energia necessària per induir l'activitat proteàsica de RecA.

Un altre centre d'interès és conèixer quines regions de la proteïna RecA estan implicades en la seva activitat proteàsica, tant pel que fa al propi fenomen d'activació, com a l'activitat pròpiament dita. Aquest aspecte ha estat estudiat fonamentalment mitjançant l'estudi de mutants en el gen *recA*. En la figura 2 es mostra un mapa del gen *recA*, on es situen algunes de les mutacions obtingudes. Hom pot veure que la major part són mutacions puntuals localitzades en la regió estructural o en l'operador del gen i que totes elles estan

distribuïdes dintre el 73 % de la regió amino-terminal (KAWASHIMA *et al.*, 1984). Estudis genètics realitzats amb aquests mutants han permès de localitzar les diferents funcions de la proteïna RecA. Així, s'ha pogut establir que la regió amino-terminal és la responsable de la interacció de la proteïna RecA amb el DNA de cadena senzilla, amb l'ATP i amb el repressor, intervenint també en la formació d'agregats amb d'altres proteïnes RecA i donant lloc d'aquesta manera a la que sembla la conformació més activa capaç d'induir l'expressió de les diferents funcions SOS.

Els treballs realitzats fins a l'actualitat en aquest darrer sentit, suggereixen que la regió C-terminal és aliena a la funcionalitat de la proteïna RecA. Per tal de conèixer el paper que juga aquest fragment en l'activació de la proteïna RecA, en el treball que es presenta s'ha procedit a estudiar la funcionalitat de una proteïna RecA truncada, és a dir carent de la regió C-terminal. Per això, s'ha clonat la regió amino-terminal en un plasmidi multicòpia i s'ha introduït en diferents mutants del gen *recA*. L'estudi de l'expressió de diferents funcions SOS en les situacions analitzades, ha permès d'esbrinar la importància del fragment C-terminal de la proteïna RecA en la inducció

del sistema SOS i en la funcionalitat de la proteïna RecA.

MATERIAL I MÈTODES

Soques bacterianes, bacteriòfags i plasmidis utilitzats

Les soques bacterianes utilitzades s'indiquen en la taula 2. El bacteriòfag utilitzat fou λ vir i els plasmidis pDR1453 i pMC874 procedents de M. Blanco i M. Casadaban respectivament.

Medis i condicions de creixement

Els tractaments amb llum ultraviolada es realitzaren en cultius crescuts a 37 C en medi mínim AB (MILLER, 1972), glucosa (0,2 %) com a font de carboni i suplementat amb casaminoàcids (0,4 %). El medi ric emprat va ésser LB (MILLER, 1972). Els sucres, aminoàcids i vitamines provenien de Merck Co.; els altres productes utilitzats eren de Sigma Biochemical Corp., a excepció d'alguns antibiòtics, que provenien de Antibióticos, S.A.

Irradiació ultraviolada de suspensions bacterianes

La irradiació es realitzà amb un tub germicida Silvania GY1578 de baixa pressió, i la dosi emprada es mesurà amb un dosímetre Latarjet. Per tal d'eliminar l'efecte de pantalla que poden realitzar els suplementes durant la irradiació, es centrifugaren els cultius (2×10^8 cèl·lules/ml) i es resuspengueren en medi AB o en Ringer. Tots aquests processos es realitzaren en presència de llum groga per tal d'evitar la fotoreactivació.

Tècniques de DNA

El mètode d'extracció de plasmidis fou el descrit per BIRBOIM i DOLY (1979). La

purificació es realitzà per ultracentrifugació en gradient de clorur de cesi. Pel als experiments de restricció s'emprà el mètode de MANIATIS *et al.*, (1982). Per a la purificació dels fragments de restricció s'utilitzaren gels d'agarosa de baix punt de fusió (0,8 %). La reacció de lligam del vector de clonació amb els fragments de DNA es realitzà afegint 1 unitat de lligasa T4 per 10 μ l de reacció a 14 °C durant 12 h. Per a la transformació de les diferents soques amb DNA plasmídic s'emprà el mètode descrit per MANIATIS *et al.* (1982).

Obtenció de soques lisogèniques per fags defectius

Per a l'obtenció de soques lisogèniques amb el bacteriòfag λ d (*recA::lacZ*) es feren créixer bacteris en medi LB amb maltosa (0,4 %) fins arribar a la fase exponencial, es centrifugaren i es resuspengueren en MgSO₄ 0,01M. Seguidament, s'infectà el cultiu amb un lisat de λ vir i λ d(*recA::lacZ*) a una MOI de 0,1-1. Després de 30 min d'adsorció, se sembrà en plaques de LB amb ampicil·lina. La presència del fag defectiu en els clons Ap^R va ésser comprovada en plaques de X-gal.

Inducció de l'enzim β -galactosidasa

Per estudiar l'efecte del plasmidi pUA27 sobre l'expressió del gen *recA* (fusionat a l'operó *lac*) es realitzà un assaig enzimàtic de la β -galactosidasa, seguint el mètode descrit per MILLER (1972). L'activitat β -galactosidasa fou determinada per mitjà dels càlculs indicats per BARBÉ *et al.*, (1985).

Inhibició de la divisió cel·lular

Per conèixer les variacions en la distribució dels volums d'una població bacteriana s'utilitzà un comptador de partícules Coulter ZBI amb un porus de 30 μ m de

TAULA 2
Soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball

Soca	Genotip	Fenotip	Procedència
AB1157	<i>supE4 thr1 leu6 proA2 tsx33 his4 argE2 thil lacY1 galK2 ara14 xy115 mt11 rpsL22</i>	Thr ⁻ Leu ⁻ Pro ⁻ Bl ⁻ Lac ⁻ Gal ⁻ Ara ⁻ Xyl ⁻ Str ^R	M. Blanco
GY4752/ pDR1453	<i>argA lysA lacX74 gal12134 (srl-recA)/pDR1453</i>	Tc ^R Arg ⁻ Lys ⁻ Lac ⁻ Gal ⁻ Bio ⁻	M. Blanco
M182/ pMC874	$\Delta(lacIP024)$ <i>galk gal1U rpsL22/pMC874</i>	Km ^R Gal ⁻ Lac ⁻	M. Casadaban
UA	<i>argA lysA lacX74 gal12134</i> * $\Delta(srl-recA)$	Arg ⁻ Lys ⁻ Lac ⁻ Gal ⁻ Bio ⁻ RecA ⁻	Aquest laboratori
GY754	Com AB1157, però <i>recA13</i>	Com AB1157, RecA ⁻	M. Blanco
GY2798	<i>thr leu thi pro argE3 lac gal rpsL22 sup37 recA441 recA453</i>	Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Pro ⁻ Arg ⁻ Lac ⁻ Gal ⁻ RecA ⁻	M. Blanco
DM2211	<i>recA098 argE3</i>	Str ^R Arg ⁻	W. Wackernagel
GC2375	AB1157 [$\lambda d(recA::lacZ)$]	Com AB1157, però lisogènica per λ portador de la fusió <i>recA-lacZ</i> . Ap ^R	R.D. Ari
IC	AB1157, però <i>recA430</i>	Com AB1157. Defectiva en l'expressió del sistema SOS	M. Blanco
UA4169	GY4752/pUA27	Com GYA4752, però amb pUA27	Aquest treball
UA4171	GY754/pUA27	Com GY754, però amb pUA27	Aquest treball
UA4172	AB1157/pUA27	Com AB1157, però amb pUA27	Aquest treball
UA4189	GY2798/pUA27	Com GY2798, però amb pUA27	Aquest treball
UA4190	IC41/pUA27	Com IC41, però amb pUA27	Aquest treball
UA4191	DM2211/pUA27	Com DM2211, però amb pUA27	Aquest treball
UA4188	GY2798 [$\lambda(recA::lacZ)$]	Com GY2798, però lisogènica per λ portador de la fusió <i>recA-lacZ</i> . Amp ^R	Aquest treball
UA4187	DM2211 [$\lambda d(recA::lacZ)$]	Com DM2211, però lisogènica per λ portador de la fusió <i>recA-lacZ</i> . Amp ^R	Aquest treball
UA4192	UA4188/pUA27	Com UA4188, però amb pUA27	Aquest treball
UA4193	UA4187/pUA27	Com UA4187, però amb pUA27	Aquest treball
UA4195	GC2375/pUA27	Com GC2375, però amb pUA27	Aquest treball

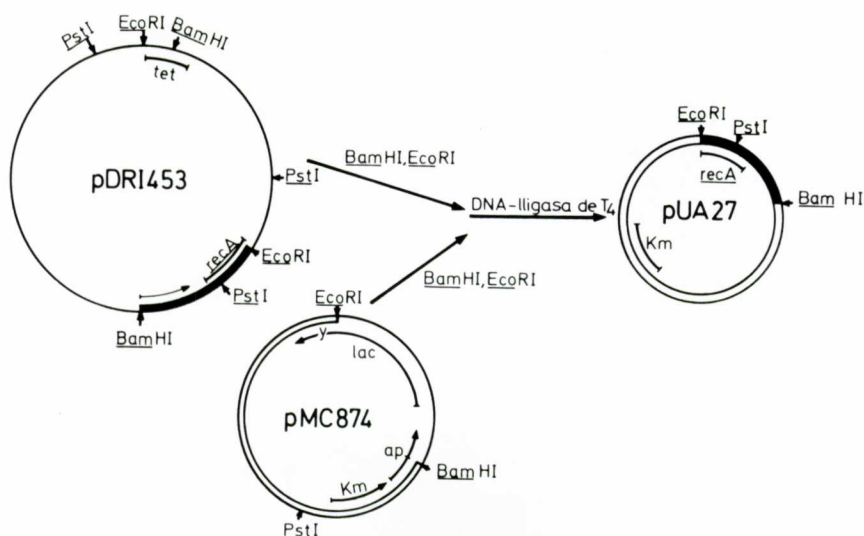


Fig. 3. Esquema del procés seguit per a la construcció del plasmidi pUA27 a partir dels plasmidis pDR1453 i pMC874.

diàmetre, acoblat a un analitzador de canals Coulter.

Un cop tractats els cultius bacterians, les mostres es fixaren amb formaldehid (1 %) i es guardaren a 4 °C fins al seu processament. Per això, es diluïren en ISOTON fins obtenir un nombre de partícules comprès entre 1.000 i 50.000. El valor de l'obertura i amplificació de corrent fou de 1 i 1/2 en tots els experiments, la grandària de canal 3 i els intervals de volums oscil·laren al voltant de 0,2 μm^3 .

RESULTATS

Clonació de la regió amino-terminal del gen *RecA*

A partir del plasmidi pDR1453 que conté el gen *recA*, es va realitzar una doble restricció amb els enzims *Bam*HI i *Eco*RI obtenint-se un fragment de 1,8 Kb, on es localitza la regió de control del gen *recA*, així com el 73 % de la regió estructural (SANCAR *et al.*, 1980). Tot seguit, aquest fragment es va lligar amb el plasmidi

pMC874 que havia estat prèviament restringit pels enzims *Eco*RI i *Bam*HI, obtenint-se el plasmidi pUA27.

La clonació d'aquest fragment de 1,8 Kb en els esmentats punts de restricció del plasmidi pMC874 fa que es perdi la regió de resistència a l'ampicilina. En la figura 3 es mostra la construcció del plasmidi pUA27, on es pot apreciar que aquest té un pes molecular de $5,3 \times 10^6$ dàltons.

El plasmidi va ser introduït per transformació en la soca DH1 (*RecA*⁻ *GyrA*⁻), es va comprovar el patró de restricció i seguidament es van transformar diferents mutants en el gen *recA*, així com una soca salvatge d'*Escherichia coli*.

Influència del plasmidi pUA27 en l'expressió del sistema SOS en diferents soques d'*Escherichia coli*

Efecte de la radiació ultraviolada sobre la viabilitat cel·lular

Estudis anteriors han demostrat que les soques *RecA*⁺, portadores del gen *recA* en

el plasmidi pDR1453, mostren la mateixa sensibilitat a la radiació ultraviolada que les soques sense plasmidi. Això indica que els nivells elevats de proteïna RecA no confereixen una resistència extra a la radiació ultraviolada (OGAWA *et al.*, 1978; CLARK *et al.*, 1978).

Per tal de conèixer l'efecte de la presència d'una proteïna RecA truncada sobre la viabilitat de diferents mutants i sobre una soca salvatge d'*Escherichia coli*, es van analitzar la sensibilitat a la radiació ultraviolada de les soques GY4752 ($\Delta recA$), GY2798 (*recA441 recA453*), GY754 (*recA13*), IC41 (*recA430*), DM2211 (*recA98*) i AB1157 (RecA⁺), i les seves corresponents soques derivades portadores del plasmidi pUA27.

En la figura 4 es presenta la supervivència d'aquestes soques després de ser irradiades amb llum ultraviolada a diferents dosis. Els resultats obtinguts mostren que la presència del plasmidi disminueix en gran manera la supervivència de la soca salvatge i del mutant d'amplificació de RecA (*recA98*), encara que en aquesta darrera soca la disminució no és tan marcada. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts amb els mutants *recA441 recA453* i $\Delta recA$, on s'observa que l'existència del plasmidi pUA27 comporta un augment de la supervivència. Pel contrari, en les soques *recA13* i *recA430*, portadores del plasmidi pUA27, no es detecta cap canvi en la seva resistència a la llum ultraviolada.

Efecte de la radiació ultraviolada sobre la divisió cel·lular

El procés de divisió cel·lular està controlat negativament per diversos gens tals com *sfiA* i *sfiB* (GEORGE *et al.*, 1975), que a la vegada són regulats per les proteïnes RecA i LexA. En condicions normals, el repressor LexA és hidrolitzat per la proteasa RecA després de la inducció del sistema

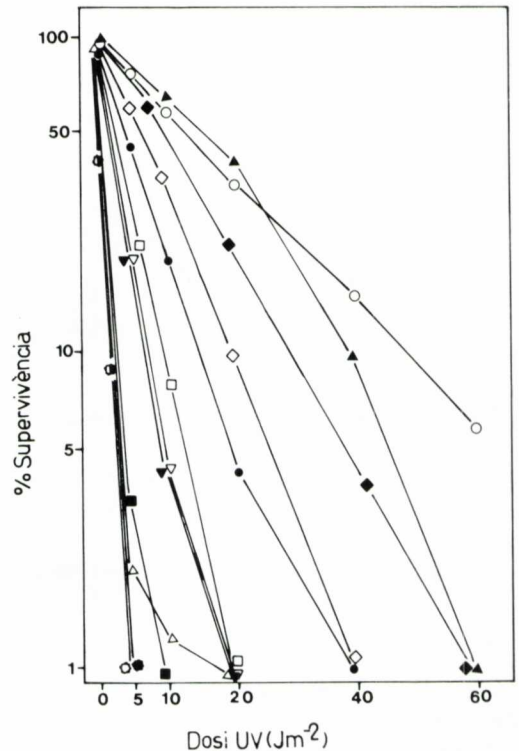


Fig. 4. Sensibilitat a la radiació ultraviolada de les soques d'*E. coli* GY2798 (*recA441 recA453*) (●), UA4189 (*recA441 recA453/pUA27*) (○), IC41 (*recA430*) (▼), UA4190 (*recA430/pUA27*) (▽), GY754 (*recA13*) (★), UA4171 (*recA13/pUA27*) (◻), GY4752 ($\Delta recA$) (■), UA4169 ($\Delta recA/pUA27$) (□), AB1157 (RecA⁺) (▲), UA4172 (RecA⁺/pUA27) (△), DM2211 (*recA98*) (◆) i UA4191 (*recA98/pUA27*) (◇).

SOS, donant lloc a l'expressió dels gens *sfiA* i *sfiB*, la qual cosa produeix la inhibició de la divisió cel·lular.

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en estudiar l'efecte de la radiació ultraviolada en la inducció d'aquesta funció SOS en les soques d'*Escherichia coli* *recA441 recA453*, $\Delta recA$, *recA98*, *recA13*, *recA430* i RecA⁺, així com la influència del plasmidi pUA27. En les figures 5 i 6 es pot veure respectivament que no hi ha variacions significatives en el volum cel·lular dels mutants *recA13* o *recA430* després de ser tractats amb llum ultraviolada, malgrat siguin portadors del

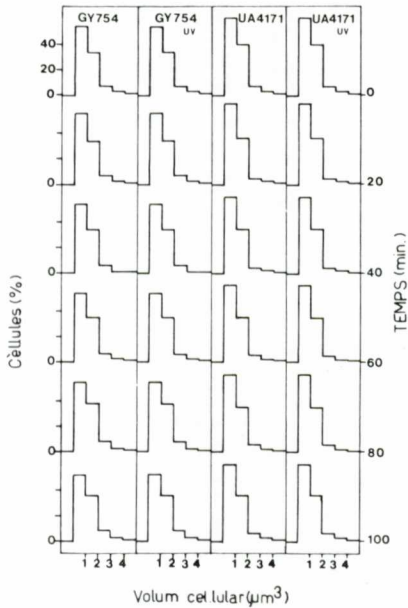


Fig. 5. Efecte de la radiació ultraviolada sobre l'evolució del volum cel·lular en les soques GY754 (*recA13*) i UA4171 (*recA13/pUA27*) d'*E. coli* tractades amb llum ultraviolada (20 J m^{-2}).

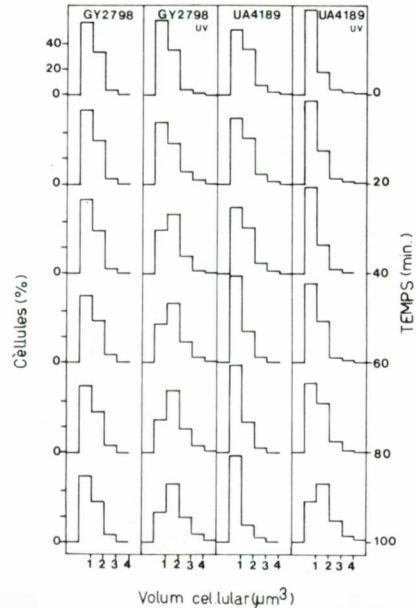


Fig. 7. Evolució de la distribució del volum cel·lular al llarg del temps en les soques d'*E. coli* GY2798 (*recA441 recA453*) i UA4189 (*recA441 recA453/pUA27*) tractades amb radiació ultraviolada (20 J m^{-2}).

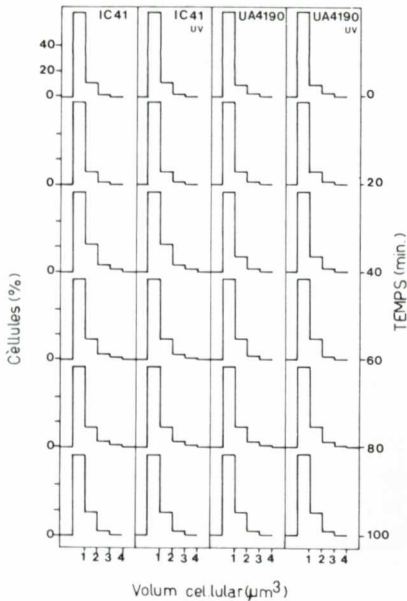


Fig. 6. Efecte de la radiació ultraviolada sobre l'evolució de la distribució del volum cel·lular de les soques IC41 (*recA430*) i UA4190 (*recA430/pUA27*) d'*E. coli*.

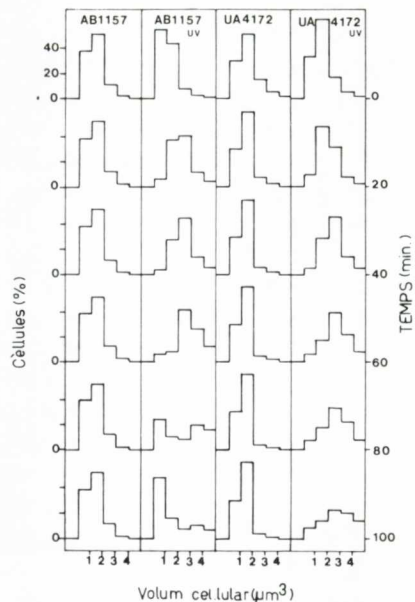


Fig. 8. Evolució de la distribució del volum cel·lular de les soques AB1157 (RecA⁺) i UA4172 (RecA⁺/pUA27) després del tractament amb radiació ultraviolada (20 J m^{-2}).

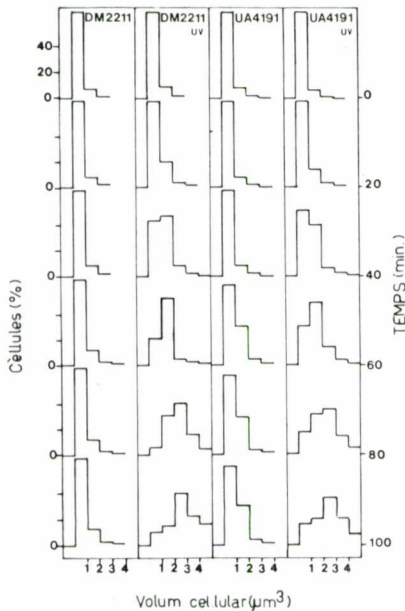


Fig. 9. Evolució de la distribució del volum cel·lular dels mutants d'*E. coli* DM2211 (*recAo98*) i UA4191 (*recAo98/pUA27*), després del tractament amb radiació ultraviolada (20 J m^{-2}).

plasmidi pUA27. D'altra banda, els cultius de les soques *recA441 recA453* (Figura 7), *recAo98* (fig. 9) i *RecA*⁺, tractats amb llum ultraviolada, mostren una petita disminució en el volum cel·lular quan són portadors del plasmidi pUA27. Així mateix, pot observar-se (figures 7, 8 i 9) que la filamentació originada pel tractament amb irradiació ultraviolada apareix entre els 20 i 40 minuts després de la radiació, mentre que en les soques isogèniques amb el plasmidi pUA27, l'augment del volum cel·lular es manifesta als 60-80 minuts del tractament. Tanmateix, en el mutant $\Delta recA$, portador del plasmidi pUA27, s'observa un augment en el volum cel·lular entre els 20-40 minuts després del tractament inductor (fig. 10), malgrat que la soca original no mostra canvis significatius de volum. En conseqüència, es pot concloure que la presència del plasmidi pUA27 dóna lloc a una resposta retardada i de nivell

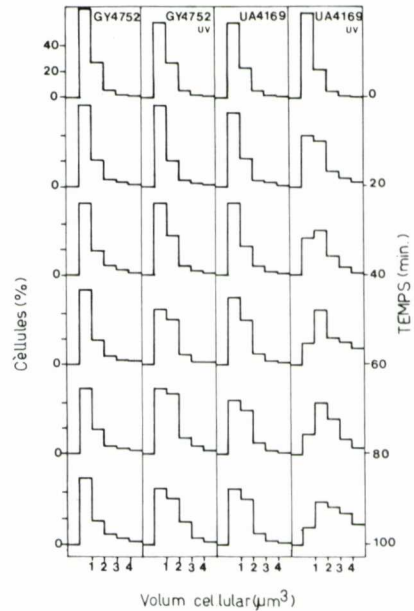


Fig. 10. Representació en el temps del volum cel·lular de les soques GY4752 ($\Delta recA$) i UA4169 ($\Delta recA/pUA27$), després del tractament amb radiació ultraviolada (20 J m^{-2}).

inferior en totes les soques que tenen un nivell basal de proteïna RecA d'origen cromosòmic, mentre que l'existència del plasmidi en el mutant de delecció induïx la inhibició de la divisió cel·lular, resposta que no presenta la soca isogènica sense plasmidi.

Efecte de la radiació ultraviolada en l'expressió del gen recA

La síntesi massiva de proteïna RecA és una de les funcions que forma part de la resposta SOS i és l'objecte d'aquest apartat. Per a l'estudi de l'expressió del gen *recA* com a conseqüència del tractament amb radiació ultraviolada es va utilitzar el mètode de la fusió d'operons. Aquest procediment es basa en la construcció prèvia d'una molècula híbrida entre la regió promotora del gen a estudiar i una regió de DNA que codifiqui una proteïna com ara

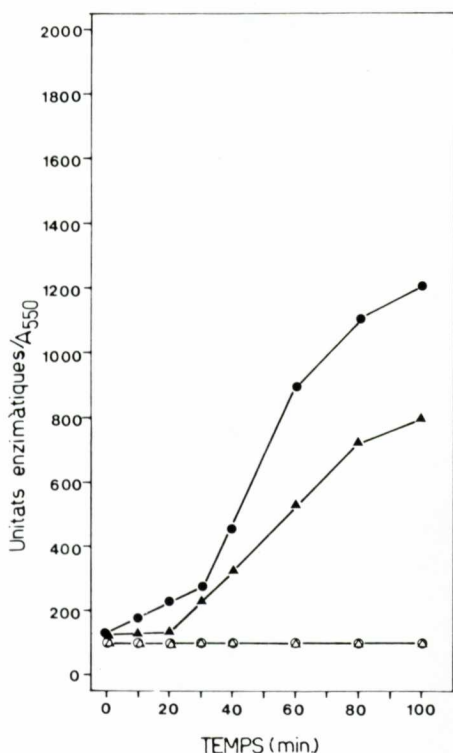


Fig. 11. Evolució de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa com a conseqüència de la inducció del gen *recA* en els cultius de les soques UA4188 (*recA441 recA453*) (●) i UA4192 (*recA441 recA453/pUA27*) (▲) després del tractament amb radiació ultraviolada (20 J m^{-2}). Es mostra com a control l'expressió del gen *recA* en aquestes soques UA4188 (○) i UA4192 (△) sense cap tractament.

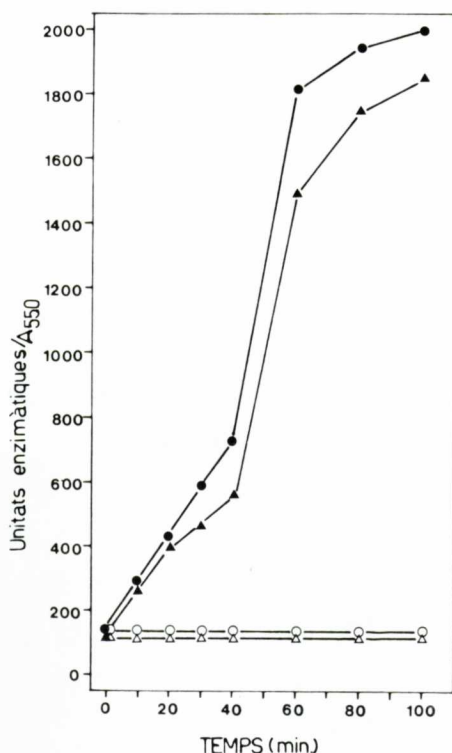


Fig. 12. Evolució de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa com a conseqüència de la inducció del gen *recA* en els cultius de les soques UA4187 (*recAo98*) (●) i UA4193 (*recAo98/pUA27*) (▲) després del tractament amb radiació ultraviolada. Com a control es presenta l'expressió del gen *recA* en aquestes mateixes soques UA4187 (○) i UA4192 (△) sense cap tractament.

la β -galactosidasa, fàcilment quantificable. D'aquesta manera, amb un assaig colorimètric pot valorar-se l'expressió d'aquest gen SOS.

Per a la quantificació de l'expressió del gen *recA* en els mutants *recA441 recA453* i *recAo98* es va realitzar la lisogenització d'aquestes soques amb el bacteriòfag λ d(*recA::lacZ*) provinent de la soca salvatge GC2375, amb la qual també es va realitzar l'anàlisi.

A les figures 11, 12 i 13 es recullen els resultats obtinguts, i es pot apreciar que les soques amb el plasmidi presenten un nivell inferior d'expressió, en comparació amb

les soques sense plasmidi, després del tractament amb llum ultraviolada.

Tots els resultats obtinguts coincideixen en que les soques portadores del plasmidi pUA27 manifesten un nivell de resposta SOS inferior a la obtinguda amb les soques isogèniques carents d'aquest plasmidi, amb l'excepció del mutant de delecció, en el que s'observa que la presència de l'esmentat plasmidi dóna lloc a una major resposta que l'obtinguda en la soca no portadora de pUA27. Cal ressaltar que la presència del plasmidi en els mutants defectius *recA13* i *recA430* no modifica el comportament de les soques no portadores de pUA27.

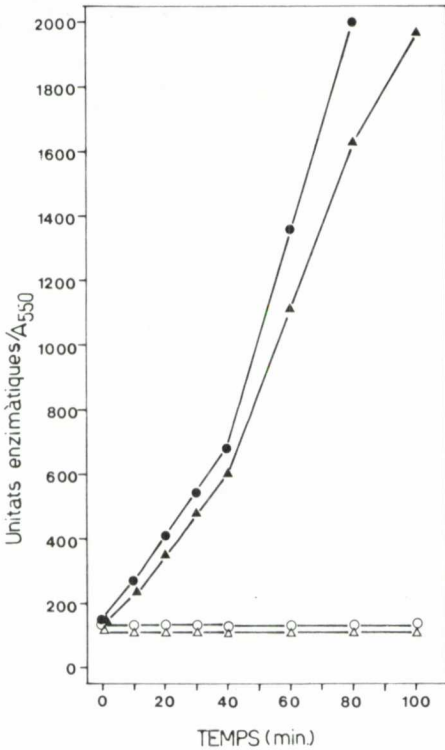


Fig. 13. Evolució de la síntesi de l'enzim β -galactosidasa com a conseqüència de la inducció del gen *recA* en els cultius de les soques UA4195 (▲) i GC2375 (●) després del tractament amb radiació ultraviolada. Com a control es presenta l'expressió del gen *recA* en aquestes mateixes soques $RecA^+$ (○) i $RecA^+/pUA27$ (△) sense cap tractament.

DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts en estudiar l'efecte dels plasmidi pUA27 en la sensibilitat a la radiació ultraviolada de la soca salvatge i dels mutants *recAo98*, *recA441*, *recA453*, $\Delta recA$, *recA13* i *recA430* d'*Escherichia coli*, posen de manifest que el polipèptid constituït pel 73 % de la proteïna RecA és capaç d'intervenir en la reparació de les lesions produïdes en el DNA per la radiació ultraviolada, sempre i quan els nivells de proteïna RecA d'origen cromosòmic siguin molt baixos o inexistents. Aquest és el cas del mutant *recA441* *recA453*, en el qual no

té lloc l'amplificació de la síntesi de la proteïna RecA (REBOLLO *et al.*, 1984), i del mutant $\Delta recA$, que no pot sintetitzar-la. Ara bé, malgrat que aquesta proteïna defectiva sigui capaç d'unir-se a la cadena senzilla de DNA disminuint la seva degradació, l'existència d'una altra proteïna RecA d'origen cromosòmic fa que es creï una competència entre ambdues molècules RecA, la qual cosa originarà una disminució de l'eficiència d'ambdues proteïnes RecA en la protecció del genoma. Aquesta explicació es veu reflectida en els resultats obtinguts amb els mutants *recAo98*, *recA430*, *recA13*, i amb la soca salvatge. Així, la funcionalitat de la proteïna RecA present en els mutants *recA13* i *recA430* és nul·la, però la seva presència impideix que la proteïna codificada pel plasmidi pUA27 pugui actuar normalment.

L'exemple més clar de l'existència de competència entre els dos tipus de proteïna és el de la soca salvatge amb el plasmidi, on hi ha una disminució de la supervivència en front la radiació ultraviolada, de tal manera que aquesta soca presenta un comportament similar a un mutant $RecA^-$. En canvi, amb el mutant *recAo98*, que presenta una síntesi constitutiva de proteïna $RecA^-$ i en conseqüència uns nivells basals de proteïna RecA d'origen cromosòmic molt elevats, es troba que la soca portadora del plasmidi presenta una major concentració de proteïna salvatge que defectiva després del tractament amb radiació ultraviolada. Aquesta pot ser la raó de que en aquesta soca la disminució de la supervivència no sigui tant sobtada i dràstica com s'observa en la soca salvatge. Malgrat això ha d'existir algun tipus de competència entre ambdues proteïnes RecA en aquesta soca superproductora, ja que la soca portadora de pUA27 és més sensible a la radiació ultraviolada que la soca isogènica sense plasmidi.

Els resultats obtinguts en analitzar l'expressió de diferents funcions SOS demos-









	Tetràmers	
	actius	inactius
RecA ⁺ /pUA27		
recA ₀₉₈ /pUA27		
recA _{441 recA453} /pUA27		
ΔrecA/pUA27		
recA ₄₃₀ /pUA27		
recA ₁₃ /pUA27		

Fig. 14. Model dels tetràmers que s'obtenen en els diferents mutants i en la soca salvatge d'*E. coli* portadora del plasmidi pUA27. Es poden obtenir tetràmers mixtos formats per proteïna salvatge (●) o proteïna defectiva (○) i la proteïna codificada pel plasmidi pUA27 (⊕).

tren que l'existència del plasmidi pUA27 en els mutants *recA13* i *recA430* és incapaç de desencadenar l'expressió del sistema SOS després de la irradiació amb llum ultraviolada. Ans al contrari, en la soca portadora de la deleció en el gen *recA* s'observa que la distribució del volum cel·lular depèn de la presència del plasmidi pUA27. No obstant això, en les soques *recA098*, *recA441 recA453*, i RecA⁺, portadores de pUA27, encara que hi ha expressió del sistema de reparació d'emergència, la resposta és retardada en el temps i es dona a un nivell inferior.

Per complementar l'estudi d'aquest plasmidi portador del fragment amino-terminal del gen *recA* d'*Escherichia coli*, es va estudiar la seva expressió, degut al tractament amb radiació ultraviolada, en les soques GC2375 (RecA⁺), UA4167 (*recA098*) i UA4188 (*recA441 recA453*), lisogèniques per λd(*recA::lacZ*) i es va comparar amb les soques isogèniques portadores del plasmidi pUA27. En tots els casos s'observà que la presència del plasmidi originava una menor expressió de la fusió *recA::lacZ*. Aquest fet pot ésser degut, com en el cas de la filamentació i de la supervivència, a l'existència de tetràmers inactius incapaç

ços de hidrolitzar el repressor LexA.

Tot aquest conjunt de dades reafirma la hipòtesi de que la combinació dels dos tipus de proteïna redueix la inducció del sistema SOS i ens ha permès de representar els diferents tipus de tetràmers que s'obtiniran segons la variabilitat de proteïna RecA que hagi en el citoplasma (figura 14). Així, es pot concloure que la proteïna defectiva que conté el 73 % de RecA podria ser activada i trencar el repressor LexA, amb la consegüent expressió dels gens SOS, encara que l'existència simultània de proteïna RecA salvatge disminueixi l'expressió d'aquests gens. D'aquesta forma, la soca salvatge i el mutant d'amplificació constitutiva de la síntesi de proteïna RecA, amb el plasmidi pUA27, presentaran tetràmers mixtos que seran menys actius en la hidròlisi de la proteïna LexA. En conseqüència, el plasmidi pUA27 en el mutant *recA098*, on els nivells basals de proteïna RecA són més elevats que en la soca salvatge, donaria lloc a una menor disminució de la resposta SOS, ja que existirien més tetràmers actius.

L'existència del plasmidi pUA27 en el mutant Δ*recA* li confereix una més gran resistència a la radiació ultraviolada degut a que no existeix proteïna RecA d'origen cromosòmic i per tant a que no es crearan tetràmers mixtos. Pel contrari, en el mutant *recA441 recA453*, incapaç d'amplificar la síntesi de proteïna RecA però que presenta petits nivells basals de proteïna d'origen cromosòmic, existirà competència negativa i per tant una menor expressió de les funcions SOS. En qualsevol cas, les nostres dades també demostren que el 27 % de la regió C-terminal de la proteïna RecA no és del tot aliena a la inducció del sistema SOS i recolzen les hipòtesis prèvies d'altres autors (HOWARD-FLANDERS *et al.*, 1984; KAWASHIMA *et al.*, 1984) en relació a la importància de la cooperativitat de les molècules de proteïna RecA en el procés de trencament del repressor LexA.

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per un ajut a la recerca de la CIRIT de la Generalitat de Catalunya i un altre del FIS de la Seguretat Social.

BIBLIOGRAFIA

- BARBÉ, J., VILLAVARDE, A. i GUERRERO, R. (1983a) Evolution of cellular ATP concentration after UV-mediated induction of SOS system in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117:556-561.
- BARBÉ, J., VERICAT, J.A. i GUERRERO, R. (1983b) Discriminated induction of SOS functions in *Escherichia coli* by alkylating agents. *J. Gen. Microbiol.* 129:2079-2089.
- BARBÉ, J., VERICAT, J.A. i GUERRERO, R. (1983c) *recA*-dependent inhibition of cell respiration is not induced by mitomycin C in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 120:1-5.
- BARBÉ, J., VILLAVARDE, A. i GUERRERO, R. (1983d) Indirect induction of SOS functions in *Salmonella typhimurium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:471-484.
- BARBÉ, J., VERICAT, J.A., CAIRO, J. i GUERRERO, R. (1985) Further characterization of SOS system induction in *recBC* mutants of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 146:23-32.
- BIRBOIM, H.C. i DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1524.
- CLARK, A.J., VOLKERT, M.R. i MARGOSSIAN, J.L. (1978) A role for *recF* in repair of UV damage to DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:887-892.
- FLORY, J. i RADDING, C.M. (1982) Visualization of RecA protein and its association with DNA a priming effect of single-strand-binding protein. *Cell* 28:747-756.
- GEORGE, J., CASTELLAZZI, M. i BUTTIN, G. (1975) Prophage induction and cell division in *Escherichia coli*. III Mutations *sfiA* and *sfiB* restore division in *tif* and *lon* strains and permit the expression of mutator properties of *tif*. *Molec. gen. Genet.* 140:309-332.
- GUERRERO, R. i BARBÉ, J. (1982) Expression of *recA*-gene dependent SOS functions in *Salmonella typhimurium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 48:159-167.
- HOWARD-FLANDERS, P., WEST, S. i STASIAK, A. (1984) Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature* 309:215-220.
- HUTCHINSON, F. i STEIN, J. (1980). Mutagenesis of phage: Weigle mutagenesis is induced by coincident lesion in the double helical DNA of the host genome. *Molec. gen. Genet.* 181:458-463.
- KAWASHIMA, H., HORII, T., OGAWA, T. i OGAWA, H. (1984) Functional domains of *Escherichia coli* RecA protein deduced from the mutational sites in the gene. *Molec. gen. Genet.* 193:288-292.
- KENYON, C.J. i WALKER, G.C. (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2819-2823.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. i SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MILLER, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- OGAWA, T., WABIKO, M., TSURIMOTO, T., HORII, T., MASUKATA, H. i OGAWA, H. (1978) Characteristics of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vivo*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:909-915.
- OISHI, M., SMITH, C.L. i FRIEFELD, B. (1979) Molecular events and molecules that lead to induction of prophage and SOS functions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:879-907.
- RADMAN, M. (1975) SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. En P.C. Hanawalt i R.B. Setlow (eds). Molecular mechanisms for repair of DNA. Parts A i B. Plenum Press, New York.
- REBOLLO, J.E., MOREAU, P.L., BLANCO, M. i DEVORET, R. (1984) Restoration of RecA protein activity by genetic complementation. *Molec. gen. Genet.* 195:83-89.
- ROBERTS, J.W. i DEVORET, R. (1983) Lysogenic induction. En: R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl i R.A. Weisberg (eds.). Lambda II. pp. 123-144. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- SANCAR, A.C., STACHELECK, W., KONIGSBERG, W. i RUPP, W.D. (1980) Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2611-2615.
- WALKER, G.C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48:60-92.
- WITKIN, E.N. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40:869-907.
- YANCEY, B.D. i PORTER, R.D. (1984) Negative complementation of RecA protein by *recA1* polypeptide: *in vivo* recombination requires a multimeric form of RecA protein. *Molec. gen. Genet.* 193:53-57.
- YARRANTON, G.T. i SEDGWICK, S.G. (1982) Cloned truncated *recA* gene in *E. coli* II. Effects of truncated gene products on *in vivo* *recA*⁺ protein activity. *Molec. gen. Genet.* 185:99-104.