

REGULACIÓ DEL SISTEMA DE REPARACIÓ D'EMERGÈNCIA (SOS) D'*Escherichia coli* PER LA CONCENTRACIÓ INTRACEL·LULAR D'ATP

ANTONI VILLAVERDE, JORDI BARBÉ i RICARD GUERRERO

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

SUMMARY

Changes in the intracellular concentration of ATP in *Escherichia coli* cells expressing the SOS system after UV-irradiation were studied. Under these conditions, there is a dose-dependent increase in the concentration of this nucleotide which is synthesized by metabolization of the degradation products of the UV-damaged DNA through the activity of RecBC exonuclease. The ATP produced is then hydrolysed in the process of LexA repressor cleavage by the activated RecA protein.

Furthermore, results obtained in UV-irradiated cultures growing in the presence of adenine (which increases the cellular pool of ATP), and in several ATP-synthase mutants, show that ATP availability after UV-irradiations is an important factor in the modulation of RecA protease activity, and as a consequence of the SOS genes transcription. Thus, cellular ATP concentration is limiting for the SOS system expression in cells UV-irradiated up to 40 J m^{-2} , and in the *recA441* (*tif*) mutant growing at 42°C , in which the RecA441 protein is spontaneously activated.

INTRODUCCIÓ

La irradiació amb llum ultraviolada i el tractament amb productes mutagènics i/o carcinogènics té com a efecte en *Escherichia coli* l'expressió d'una gamma d'activitats fisiològiques molt àmplia, algunes de les quals són responsables de la reparació de les lesions i del manteniment de la viabilitat cel·lular. Totes aquestes funcions induïbles es troben sota el control d'un mateix mecanisme cel·lular, l'expressió coordinada del qual rep el nom de sistema de

reparació d'emergència, o bé sistema SOS (WITKIN, 1976; WALKER, 1984; D'ARI, 1985).

Des que hom va proposar les primeres hipòtesis sobre l'existència d'un sistema induïble degut a la lesió del DNA (DEFAIS *et al.*, 1971; RADMAN, 1974, 1975), s'ha desenvolupat molt el coneixement dels mecanismes que intervenen i determinen l'expressió de les funcions que el componen i dels gens que en són responsables, el que ha permès en l'actualitat disposar d'un model integral que explica els diferents

fenòmens que tenen lloc durant l'expressió del sistema SOS. En primer lloc, els gens directament responsables de la inducció pleiotròpica de les funcions SOS són el gen *recA* i el gen *lexA*. Feia temps que es coneixia que el producte del gen *recA* participava activament en els processos de recombinació genètica (CLARK, 1973; MC ENTÉE *et al.*, 1979), i que la seva elevada afinitat pel DNA de cadena senzilla era la característica determinant de l'assimilació del DNA de cadena senzilla a la seva regió homòloga en el DNA de cadena doble. D'altra banda, es coneixia l'existència d'una proteïna X, la síntesi de la qual era amplificada quan s'aturava la replicació del DNA o bé quan aquesta molècula era degradada, i que tenia gran afinitat per les regions de cadena senzilla del DNA (GUDAS, 1976; GUDAS I PARDEE, 1976). El 1977, MC ENTÉE va identificar la proteïna X com el producte del gen *recA*, amb la qual cosa es vinculaven els fenòmens de recombinació i els sistemes induïbles de reparació del DNA. No obstant això, el paper específic dels gens *recA* i *lexA* (que es coneixia regulaven l'expressió de les funcions SOS) no va ésser determinat fins que no es va demostrar que la proteïna RecA actua com a proteasa específica de la proteïna LexA (HORII *et al.*, 1981; LITTLE *et al.*, 1980), i que, *in vivo*, l'expressió del sistema necessita d'aquesta activitat proteolítica (MEYN *et al.*, 1977). A més, la identificació del producte del gen *lexA* (LITTLE i HARPER, 1979) i l'estudi del seu comportament va permetre identificar aquesta proteïna com el repressor dels gens responsables de l'expressió de les funcions SOS (KENYON i WALKER, 1980, 1981; KENYON *et al.*, 1982), i del gen *recA* i del mateix gen *lexA* (LITTLE *et al.*, 1981). Així, l'activitat proteàsica de la proteïna RecA és capaç de dur a terme la hidròlisi de la proteïna LexA i del repressor del fag lambda, en un domini estructuralment relacionat d'ambdues molècules (ROBERTS *et al.*, 1977; LIT-

TLE, 1984). Aquesta activitat proteolítica de la proteïna RecA necessita *in vitro* la presència d'ATP i de polinucleòtids (ROBERTS *et al.*, 1977, 1978; CRAIG i ROBERTS, 1980, 1981), fet pel qual aquests dos factors semblen tenir un paper molt important en la inducció del sistema *in vivo*. El trencament del repressor LexA per la proteïna RecA provoca un descens en la concentració citoplasmàtica del repressor LexA actiu, i el corresponent desplaçament de l'equilibri cap a la dissociació dels repressors dels seus llocs en els operadors dels gens i, per tant, la transcripció dels mateixos gens, inclosos *recA* i *lexA* (MOUNT *et al.*, 1983).

En els darrers deu anys ha augmentat el nombre de respostes cel·lulars en les quals s'ha demostrat que estan regulades pel sistema RecA-LexA. En la revisió de WITKIN de 1976 es descriuen 14 fenotips específics induïbles que pertanyen al sistema, mentre que en la revisió de WALKER de 1984 ja són 32 les funcions SOS reconegudes. En 17 d'elles, l'expressió de la funció depèn d'un gen específic directament reprimit per la proteïna LexA, i per tant sota el control de l'activitat de la proteïna RecA. A més, han estat descrits *loci* induïbles per tractaments genotòxics, dels quals encara no s'ha identificat el producte gènic ni se n'ha determinat la funció. Aquest és el cas dels gens *dinA*, *B*, *D* i *F*, trobats per KENYON i WALKER (1980) mitjançant l'anàlisi d'insercions a l'atzar en el genòfor d'*E. coli* de bacteriòfags Mu portadors de la regió estructural del gen *lacZ*. Algunes d'aquestes soques lisogenitzades per Mu sintetitzen β -galactosidasa quan s'indueix el sistema SOS, si el fag s'ha inserit en fase dintre un gen regulat per LexA. Aquest mètode, a més del de radioimmunoassaig, ha estat un dels més utilitzats per avaluar l'amplificació de la transcripció dels diferents gens reprimits per la proteïna LexA.

Algunes de les funcions SOS, com ara la inhibició de la respiració cel·lular (SWEN-

SON i SCHENLEY, 1974a,b) i la inhibició de la restricció fàgica (DAY, 1977), depenen de la proteïna RecA, però no s'ha trobat cap gen específic que determini la seva expressió. Altres funcions com ara la inhibició de l'activitat de l'exonucleasa V (SATTA *et al.*, 1979) i la resistència induïble a la radiació (POLLARD *et al.*, 1981), depenen directament de l'amplificació de la síntesi de la proteïna RecA.

Sobre els tractaments inductors del sistema SOS s'ha demostrat (QUILLARDET *et al.*, 1982) que molts productes químics amb activitat genotòxica són capaços de provocar la inducció del sistema. En tots els exemples sembla que les estructures degradatives del DNA produïdes durant la reparació de les lesions actuen com a senyals inductors del sistema SOS, mitjançant l'activació de la proteïna RecA.

No obstant això, hi ha proves que en algunes circumstàncies els tractaments inductors donen lloc a l'expressió de fenotips SOS parcials (WITKIN, 1976). Recentment, diferents treballs han demostrat que la resposta SOS no és un fenomen de "tot o res", sinó que pot haver-hi una expressió diferencial de les funcions que el componen (HUTCHISON i STEIN, 1980; GUERREIRO i BARBÉ, 1982). Aquest fenomen pot ser explicat segons el model que va proposar WALKER (1984), en el que hom suposa una gradació en la intensitat d'inducció del sistema. Si aquesta inducció és parcial, l'activitat de la proteasa RecA està limitada i no pot hidrolitzar tot el repressor LexA que es troba en el citoplasma. En aquestes condicions, només són desreprimits els gens que tenen una regió reguladora amb poca afinitat per la proteïna LexA, ja que s'ha demostrat (BRENT i PTASHNE, 1981; EBINA *et al.*, 1983) que hi ha afinitats diferencials entre aquesta proteïna i els operadors dels diferents gens SOS. A més, algunes d'aquestes regions reguladores presenten més d'un lloc d'interacció amb el repressor (SCHARR *et al.*, 1985;

WALKER, 1984), fet que disminueix la seva capacitat d'ésser induïts.

Un dels aspectes de l'expressió del sistema SOS al qual hom ha dedicat una atenció especial ha estat el mecanisme d'activació de la proteïna RecA, així com l'activitat de la proteasa RecA sobre el repressor LexA i el del fag lambda. Per això, ha estat molt freqüent l'ús de la proteïna RecA purificada, i l'estudi dels requeriments que *in vitro* són necessaris perquè aquesta proteïna dugui a terme la seva activitat proteolítica. SANCAR *et al.* (1980) han clonat i seqüenciat el gen *recA*, analitzant les regions de simetria i els pseudo-segments d'inserció que presenta aquest gen, aportant alguns suggeriments sobre els dominis funcionals de la proteïna RecA. KAWASHIMA *et al.*, (1984), mitjançant l'anàlisi dels diferents fenotips que presenten les mutacions *recA441*, *recA1* i *recA430*, i de les alteracions en la seqüència polipeptídica de les proteïnes codificades per aquests gens, han proposat un mapa funcional de la proteïna RecA. En aquest mapa es contemplen les regions d'interacció de la proteïna amb el DNA de cadena senzilla, amb altres monòmers de proteïna RecA i amb l'ATP, així com les regions responsables del reconeixement i la digestió del repressor LexA. Més tard, RUSCHE *et al.* (1985), han determinat les característiques funcionals de polipeptíds derivats de la digestió de la proteïna RecA.

Per altra banda, nombrosos estudis suggereixen que la proteïna RecA actua *in vivo* en forma multimèrica, amb una interacció funcional entre els diferents monòmers (YARRANTON i SEDWICK, 1982; REBOLLO *et al.*, 1984; YANCEY i PORTER, 1984). Aquestes dades estan d'acord amb la troballa que *in vitro* la proteïna RecA s'associa espontàniament formant filaments (FLORY i RADDING, 1982), que semblen tenir una gran importància en la recombinació (HOWARD-FLANDERS *et al.*, 1984).

A més, s'han dut a terme diversos treballs sobre la modulació de l'activitat de la proteasa RecA *in vitro* segons el tipus de cofactor utilitzat. Des d'aquest punt de vista s'ha demostrat (PHIZIKY i ROBERTS, 1981) que un anàleg estructural de l'ATP no hidrolitzable, el γ -S-ATP, permet una eficiència molt més gran en l'activitat proteolítica de la proteïna RecA en presència de DNA desnaturalitzat que l'ATP i el dATP. No obstant això, aquest últim és encara molt més efectiu que l'ATP, la qual cosa ha fet que aquests i altres autors (COHEN *et al.*, 1983) proposessin que el desoxiribonucleòtid és el cofactor natural de la proteïna RecA *in vivo*.

A més, la interacció entre la proteïna RecA i el DNA és molt estable quan el cofactor utilitzat és el γ -S-ATP (CRAIG i ROBERTS, 1981; BRYANT *et al.*, 1985). Aquestes dades suggereixen l'existència d'un mecanisme de regulació de l'activitat de la proteïna RecA per la interacció d'aquesta amb el seu cofactor, segurament mitjançant el canvi de conformació que es produeix en la proteïna. Malgrat tot, no hi ha dades sobre com la interacció de la proteïna amb el DNA i el seu cofactor natural poden regular *in vivo* l'activitat proteàsica, i si aquesta possible modulació pot intervenir o ser responsable de l'expressió diferencial de les funcions SOS.

Treballs previs duts a terme en el nostre laboratori han demostrat que la naturalesa del tractament inductor, així com la intensitat de la degradació del DNA produïda per l'activitat de l'enzim RecBC, són factors importants que determinen el patró d'expressió diferencial del sistema (GUERRERO i BARBÉ, 1982; BARBÉ *et al.*, 1983a, b, c, 1985; VERICAT *et al.*, 1984).

Així doncs, i d'acord amb aquesta línia de recerca, s'ha estudiat en el treball que es presenta la importància de la concentració d'ATP *in vivo* en l'activitat de la proteïna RecA i en l'expressió del sistema, dedicant una atenció especial als efectes reguladors

que la disponibilitat d'aquest nucleòtid té sobre la intensitat de l'expressió de les funcions SOS.

MATERIAL I MÈTODES

Soques bacterianes i medis de cultiu

Les soques bacterianes utilitzades en aquest treball es recullen a la Taula I. Totes són derivades d'*Escherichia coli* K12.

Els medis de cultiu emprats foren el medi LB (MILLER, 1972), i el medi mínim AB (CLARK i MAALØE, 1967), aquest últim suplementat amb casaminoàcids al 0,5 %, amb glucosa al 0,2 % i amb els antibiòtics corresponents.

Irradiació amb llum ultraviolada

Els cultius creixien en medi AB suplementat fins una concentració aproximada de 2×10^8 c.f.u./ml. En aquest moment es centrifugaven a 8.000 r.p.m. durant 10 minuts, i el sobrenedant es resuspensia en medi AB sense suplementar. La irradiació es duia a terme sobre una mostra del cultiu d'un milímetre de gruix estesa en una placa de Petri de vidre, en agitació constant. Després de la irradiació, s'afegia el mateix volum de medi AB suplementat al doble de concentració, i s'incubaven els cultius una altra vegada en agitació.

La potència de la irradiació era de $0,5 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, i va ser determinada amb un dosímetre Latarjet. Totes les manipulacions van ser dutes a terme sota llum groga per evitar la fotoreactivació.

Determinació de la concentració intracel·lular d'ATP

S'afegien mostres del cultiu d'1 ml, a 3 ml de tampó Tris/HCl a pH 7.75, i es

TAULA I
Soques d'*Escherichia coli* emprades en aquest treball

Soca	Genotip	Fenotip relevant	Procedència
AB1157	F ⁻ , <i>supE44 thr1 leu6 proA2 argE3 thi1 lacY1 galK2 ara14 xyl15 mtl1 tsx33 rpol22 rpsL</i>	RecA ⁺	M. Blanco
IC53	AB1157, <i>his recB21 recC22</i>	Deficient en l'exonucleasa V	M. Blanco
AB1186	AB1157 <i>uvrA6</i>	Deficient en la correndonucleasa II	M. Blanco
AB2463	AB1157, <i>recA13</i>	Deficient en la recombinació i en la inducció del sistema SOS	M. Blanco
IC41	AB1157 <i>recA430</i>	Deficient en la inducció del sistema SOS	M. Blanco
AB2497	AB1157 <i>lexA1</i>	Repressor LexA no hidrolitzable. Repressió permanent del sistema SOS	M. Blanco
GW1000	AB1157 <i>Pro⁺ Δlac(U169) galK2 ilv (ts) recA441 sfiA11 / pSE140 [Km^r (umuC::lacZ)]</i>	Inducció espontània del sistema SOS a 42 °C, fusió <i>umuC-lacZ</i>	S. Ellegde
GC2375	AB1157 [<i>λd (recA::lacZ)cI ind1</i>]	RecA ⁺ , fusió <i>recA-lacZ</i>	R. D'Ari
GY4786	AB1157 [<i>λd(sfiA::lacZ)cI ind1</i>] (<i>lac-pro</i>)	RecA ⁺ , fusió <i>sfiA-lacZ</i>	M. Blanco
CM1470	F ⁺ <i>asnB32 thi1 relA1 spoT1 atp706</i>	Deficient en l'ATP sintasa. Metabolisme fermentatiu	K. Meyenburg
CM2786	CM1470 / pBJ706 Tc ^r	Superproductora d'ATP sintasa. Metabolisme oxidatiu. Tc ^r	K. Meyenburg
UA4164	GY4786 / pBJ706 Tc ^r	Superproductora d'ATP sintasa. Metabolisme oxidatiu. Tc ^r , fusió <i>sfiA-lacZ</i>	Obtinguda en aquest treball per transformació amb pBJ706
UA4165	GC2375 / pBJ706 Tc ^r	Superproductora d'ATP sintasa. Metabolisme oxidatiu. Tc ^r , fusió <i>recA-lacZ</i>	Obtinguda en aquest treball per transformació amb pBJ706

deixaven en aigua bullent dins d'un tub, durant 5 minuts. Després, la mostra se centrifugava a 8.000 r.p.m. durant 10 minuts. L'ATP del sobrenedant era mesurat tot seguit amb l'assaig luciferina-luciferasa (CAHPMAN *et al.*, 1971). Els resultats es presenten en ng d'ATP/ml de cultiu per a la DO₄₅₀, o bé en la concentració relativa referida al temps 0.

Estudi de la filamentació cel·lular

La filamentació en els cultius irradiats es va determinar mitjançant la distribució dels volums cel·lulars de la població, mesurada en un comptador de partícules Coulter ZBI equipat amb un analitzador de canals. Les condicions utilitzades han estat descrites previament (BARBÉ *et al.*, 1983a).

Estudi de la transcripció dels gens *umuC*, *recA* i *sfiA*

Després de la irradiació de les soques portadores de les fusions gèniques amb el gen *lacZ*, es processaven mostres de 0,5 ml del cultiu per a determinar-ne l'activitat β -galactosidasa, després de permeabilitzar les cèl·lules amb toluè, segons el mètode de MILLER (1972). Les unitats enzimàtiques es calculaven mitjançant la següent expressió:

$$\text{U.E.} = \frac{A_{420} - (1,75 A_{550}) \times 1000}{t \times v}$$

t és el temps de la reacció i v el volum de la mostra.

Els resultats es presenten en unitats enzimàtiques per ml de cultiu, normalitzades per a la DO en cada punt.

Tècniques de DNA

Els mètodes d'extracció de DNA plasmídic, de transformació i les condicions d'electroforesi han estat els habituals (MANIATIS *et al.*, 1983).

RESULTATS

Variacions de la concentració intracel·lular d'ATP en diferents mutants d'*Escherichia coli* irradiats amb llum ultraviolada

En la Figura 1A es presenta l'evolució de la concentració intracel·lular d'ATP en la soca *RecA*⁺ després de ser irradiada amb llum UV a una dosi de 20 J m⁻². Es pot observar que, després de la irradiació, hi ha un augment de la concentració d'ATP, que al minut 20 arriba a ser de l'ordre de dues vegades el valor inicial. A partir d'aquest moment, el nivell d'ATP comença a minvar, recuperant els seus valors normals

cap als 60 minuts i estabilitzant-se. Per esbrinar la possible relació entre aquest fenomen i l'expressió del sistema SOS, hom va estudiar el comportament de tres mutants deficientes en la inducció del sistema: *lexA1*, *recA430* i *recA13*. En els tres casos (Fig. 1B), la irradiació amb llum UV també augmenta la concentració intracel·lular d'ATP, però no s'aprecia el descens que, a partir del minut 20, té lloc en la soca salvatge. Aquestes dades demostren que, mentre que aquest descens és dependent de l'activitat de la proteïna *RecA*, l'augment de la concentració d'aquest nucleòtid després de la irradiació no està relacionat amb l'expressió del sistema SOS, ja que també té lloc en mutants *RecA*⁻ i *LexA*⁻. En canvi, els resultats presentats en la Figura 2A demostren que aquest augment de la concentració d'ATP és dependent de l'activitat de l'enzim *RecBC*, la qual cosa suggereix una estreta relació entre aquest fenomen i la degradació del DNA lesionat, que és duta a terme fonamentalment per aquest enzim (KUSHNER, 1974; KARU i BELK, 1982).

Per altra banda, en la mateixa Figura 2 es demostra com la manca de la funció *Uvr*, responsable de la reparació per escissió que duu a terme la correnodonucleasa II, no altera l'evolució del nivell del nucleòtid. Això estaria d'acord amb altres dades que demostren que la funció *Uvr* no és imprescindible perquè la cèl·lula dugui a terme la degradació i la reparació del DNA irradiat (CASTELLAZZI, 1976). Donat que s'ha descrit que les soques *RecA*⁻ presenten una degradació més gran de DNA després de ser irradiades (WITKIN, 1976), es va estudiar si, en el mutant *recA13* irradiat, també hi ha una producció d'ATP més gran que en la soca salvatge. En la Figura 2B es presenten els valors de la concentració relativa d'ATP 20 minuts després de la irradiació a diferents dosis d'UV. Com es pot veure, en la soca *RecA*⁻ el nivell d'ATP és més gran que en la soca salvatge

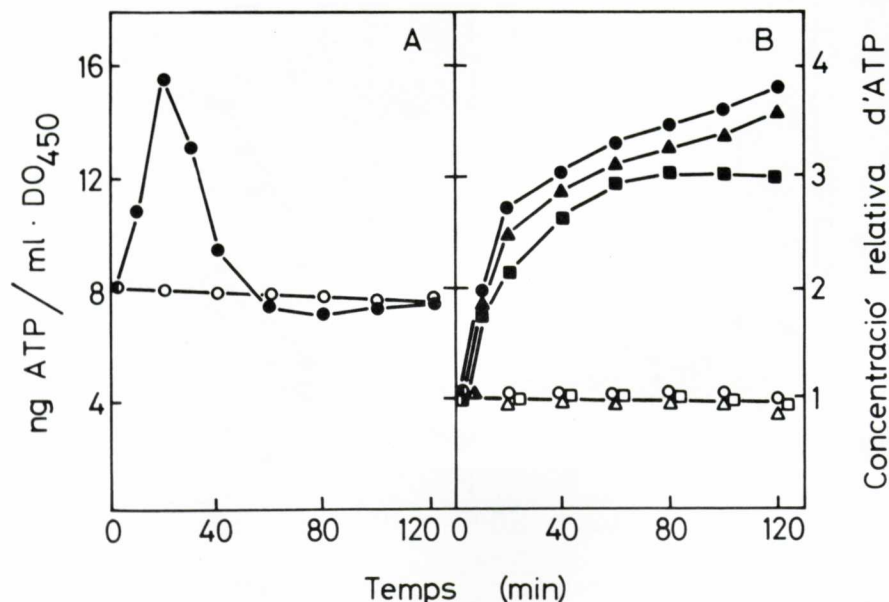


Fig. 1. A. Evolució de la concentració intracel·lular d'ATP en un cultiu de la soca salvatge AB1157 d'*E. coli* irradiada amb UV a una dosi de 20 Jm^{-2} (●). Com a control es presenta el nivell d'ATP en la mateixa soca sense irradiar (○). B. Evolució de la concentració relativa d'ATP en cultius irradiats a una dosi de 20 Jm^{-2} (símbols negres) i no irradiats (símbols blancs) de les soques AB2463 *recA13* (●, ○), IC41 *recA430* (■, □) i AB2497 *lexA1* (▲, △).

a totes les dosis, la qual cosa confirma que aquest augment està relacionat amb la degradació del DNA dependent de l'enzim RecBC. En les Figures 3A i 3B es presenten les cinètiques de producció del nucleòtid en les dues soques al llarg del temps, resultats que estan d'acord amb allò que s'ha indicat anteriorment.

Per confirmar que aquest augment relacionat amb la degradació del DNA és degut a la síntesi *de novo* del nucleòtid, es va estudiar el comportament d'un cultiu de la soca salvatge irradiada després de ser incubada durant una hora sense glucosa. En aquestes condicions, qualsevol augment de la concentració intracel·lular d'ATP després de la irradiació no pot ser degut més que a una producció mitjançant una font de carboni endògena. En la Figura 4A s'observa que, en aquestes circumstàncies, el comportament és el mateix que el que

s'observava prèviament. Això demostra que l'augment d'ATP és degut a la seva pròpia síntesi, que es fa a partir de la metabolització dels productes de degradació del DNA. Aquesta síntesi no es veu afectada per la presència d'un desacoplador de la fosforilació oxidativa com el dinitrofenol (Fig. 4A), fet que demostra que els processos fisiològics responsables del fenomen són bàsicament fermentatius. Això es confirma mitjançant l'estudi del mutant *atp706*. Aquesta soca és deficient en el complex ATP sintasa (von MEYENBURG *et al.*, 1984), responsable de la síntesi d'ATP per fosforilació oxidativa (WALKER *et al.*, 1984), i, per tant, els bacteris mutants en aquest gen només poden obtenir ATP per una via estrictament fermentativa. La presència d'aquest tipus de metabolisme augmenta la producció d'ATP després de la irradiació (Fig. 4B), mentre que en una

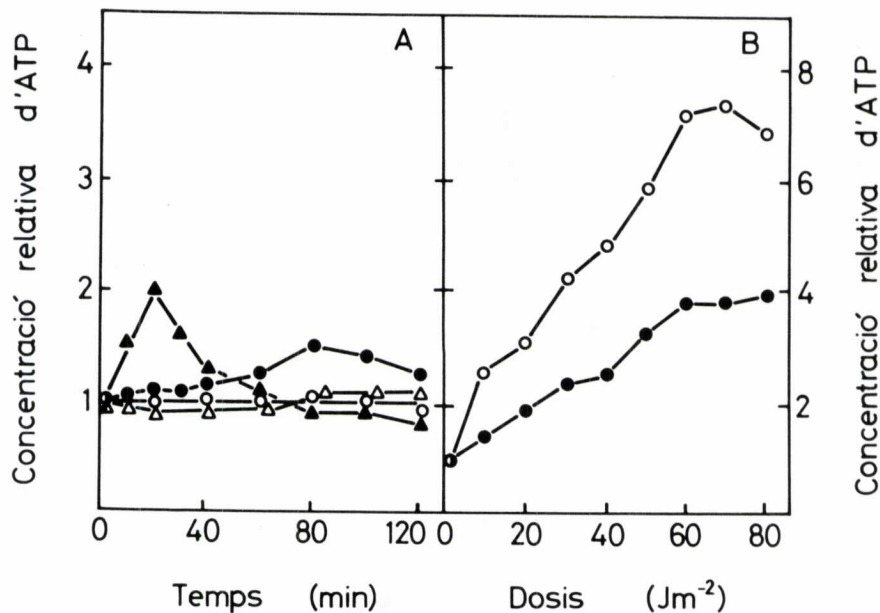


Fig. 2. A. Evolució de la concentració relativa d'ATP en cultius irradiats amb UV a una dosi de 20 J^{-2} (símbols negres) i no irradiats (símbols blancs) de les soques AB1186 *uvrA6* (▲, △) i IC53 *recB21 recC22* (●, ○). B. Concentració relativa d'ATP després de 20 minuts de la irradiació a diferents dosis en la soca salvatge AB1157 (●) i en la soca AB2463 *recA13* (○).

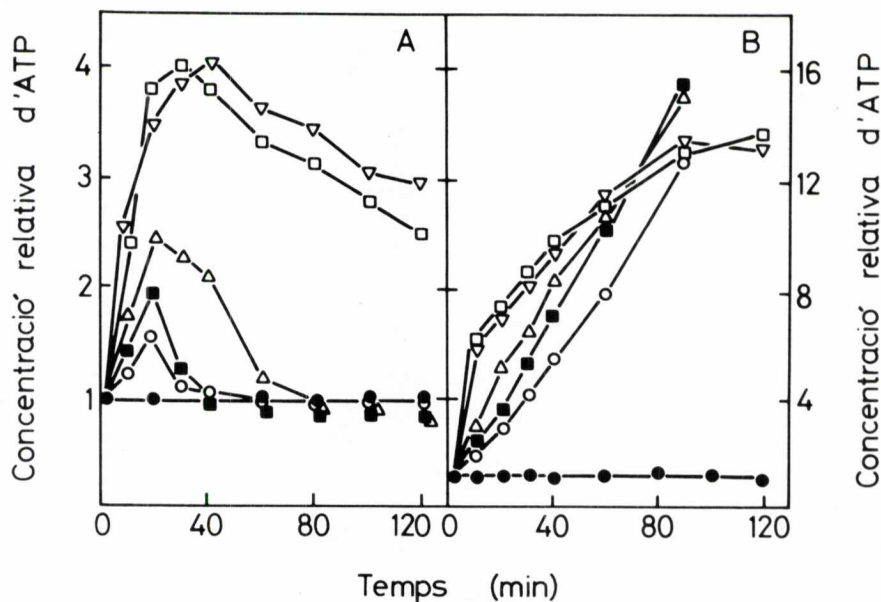


Fig. 3. A. Evolució de la concentració relativa d'ATP en la soca salvatge AB1157 irradiada a diferents dosis d'UV: 0 (●), 10 (○), 20 (■), 40 (△), 60 (□) i 80 Jm^{-2} (▽). B. Evolució de la concentració relativa d'ATP en la soca AB2463 *recA13* irradiada a diferents dosis d'UV: 0 (●), 10 (○), 20 (■), 40 (△), 60 (□) i 80 Jm^{-2} (▽).

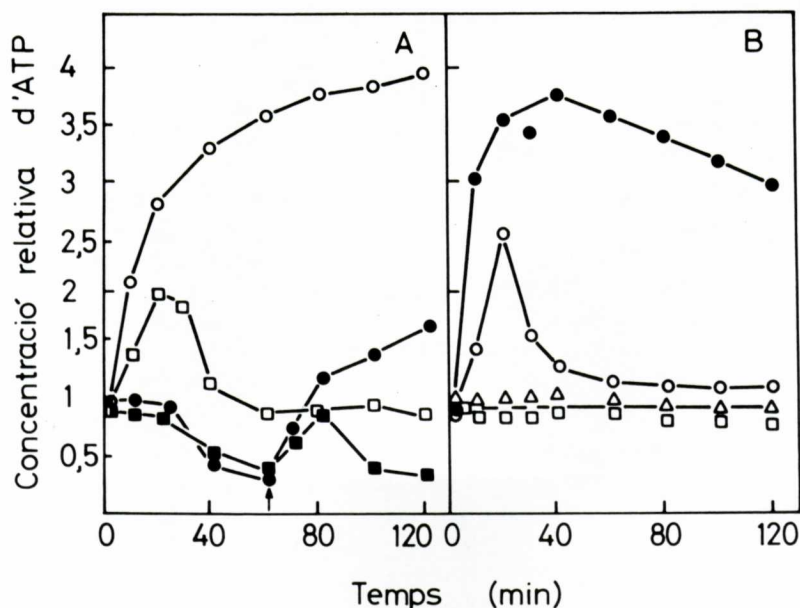


Fig. 4. A. Evolució de la concentració relativa d'ATP en la soca salvatge AB1157 (■, □), i en la soca AB2463 *recA13* (●, ○) irradiades amb UV i incubades en presència de dinitrofenol 250 mM (□, ○), o bé irradiades després de ser incubades durant una hora sense font de carboni (■, ●). La fletxa indica el moment de la irradiació. B. Evolució de la concentració relativa d'ATP en les soques CM1470 *atp706* (●) i CM2786 superproductora d'ATP sintasa (△) després de ser irradiades a 20 Jm⁻². Com a control, es mostra el comportament de la soca AB1157 irradiada a 20 Jm⁻² (○) i sense irradiar (□).

soca portadora d'un plasmidi superproductor del complex (amb un metabolisme predominantment oxidatiu), la irradiació no té quasi efecte sobre la concentració d'ATP (Fig. 4B).

Consum d'ATP durant l'activitat de la proteasa RecA

En la Figura 1 s'ha demostrat que les soques *RecA*⁺ irradiades recuperen el seu valor inicial d'ATP, en un procés dependent de l'activitat proteolítica de la proteïna *RecA*. En la Figura 5A es presenta el comportament d'un mutant *recA441* després de ser incubat a 42 °C. Aquesta soca sintetitza una proteïna *RecA* alterada, que és activada espontàniament a aquesta temperatura sense necessitat que el DNA sigui lesionat (CASTELLAZI *et al.*, 1972). D'a-

questa manera, a la temperatura restrictiva les cèl·lules expressen constitutivament el sistema SOS. En aquestes circumstàncies la concentració d'ATP presenta un descens progressiu, degut a l'activitat de la proteïna *RecA* termoinduída. Aquest resultat confirma que la proteïna *RecA* consumeix ATP *in vivo* durant la seva activitat, i explica el descens del nivell d'ATP en la soca salvatge irradiada, que per altra banda s'ha demostrat que depèn de l'activitat proteàsica i de la hidròlisi del repressor *LexA* (Fig. 1). Aquest fet suggereix que la disponibilitat del nucleòtid pot ser un factor limitant en l'eficiència de l'activitat de la proteïna *RecA*, i per tant de la intensitat en la inducció del sistema. Aquesta limitació ha de ser especialment important en el cas del mutant *recA441* termoinduït, en el que en no ser degradat el DNA no hi ha producció massiva del nucleòtid. En rela-

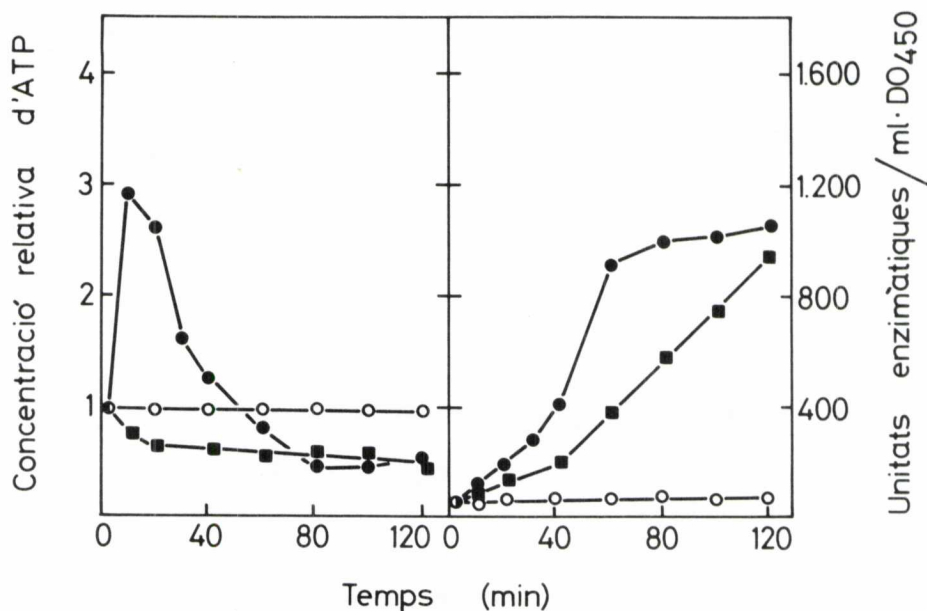


Fig. 5. A. Evolució de la concentració relativa d'ATP en la soca GW1000 incubada a 30 °C (○), a 42 °C en absència (■) i en presència (●) d'adenina a 100 µg ml⁻¹. B. Inducció del gen *umuC* en la soca GW1000 incubada a 30 °C (○), a 42 °C en absència (■) i en presència (●) d'adenina a 100 µg ml⁻¹.

ció amb això s'ha descrit que l'addició d'adenina al medi de cultiu augmenta molt l'expressió del sistema en aquest mutant *recA441* (KIRBY *et al.*, 1967). Per estudiar la possible relació entre aquest fenomen i la limitació d'ATP en el mutant hom va estudiar l'evolució del nucleòtid en un cultiu termoinduït en el que s'ha afegit adenina en ser incubades a la temperatura restrictiva. En la Figura 5A hom pot veure com l'adenina provoca un augment de l'ATP, fet que es reflecteix en una més gran inducció dels gens SOS (Fig. 5B). Això demostra que, en efecte, en aquest mutant la disponibilitat d'ATP és un factor limitant per a l'activitat de la proteïna RecA sobre el repressor LexA. En la Figura 6A es comprova com l'addició d'adenina també estimula l'augment d'ATP en la soca GW1000 irradiada i creixent a 30 °C (fenotip salvatge), i la transcripció del gen *umuC* (Fig. 6B). No obstant, aquesta estimulació és molt més baixa que l'observada en la Figura 5B en el mutant termoinduït,

fet que suggereix que, en aquest cas, la concentració d'ATP no és tant limitant.

Regulació de la intensitat de l'expressió del sistema SOS per la disponibilitat d'ATP

En la Figura 3A es mostrava com l'activitat de la proteïna RecA és capaç de retornar l'ATP intracel·lular als seus valors inicials, quan els cultius han estat irradiats a dosis més baixes de 40 J m⁻². A dosis més altes, però, l'ATP es manté per sobre d'aquest valor durant si més no 120 minuts després de la irradiació. Això suggereix que a dosis d'irradiació baixes l'ATP pot ser més limitant que a dosis altes, ja que la proteïna RecA és capaç de consumir tot el que s'ha produït degut a l'activitat RecBC. En la Figura 7 es presenta l'efecte de l'adenina en la transcripció del gen *umuC* en cultius de la soca GW1000 creixent a 30 °C (que presenta un fenotip salvatge) irradiats

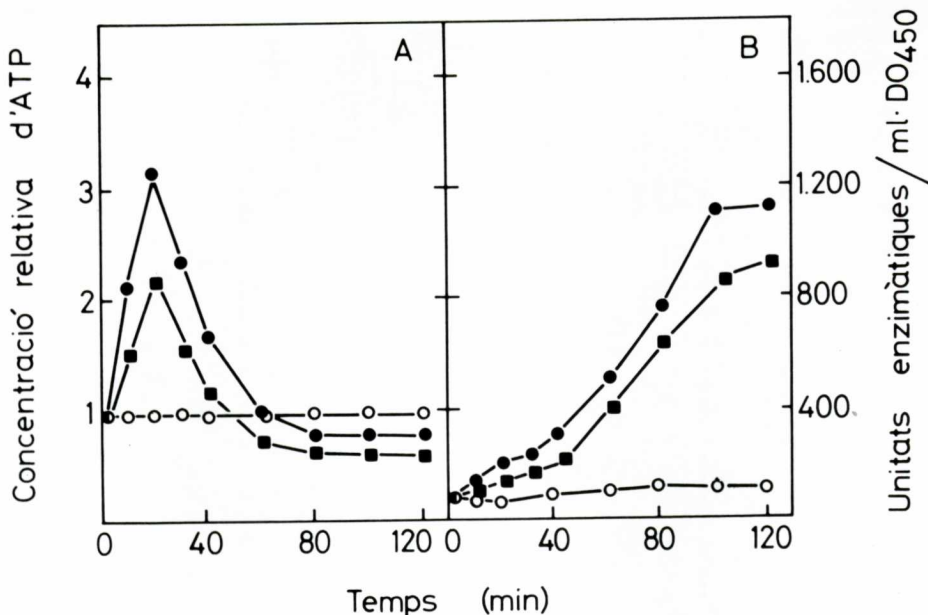


Fig. 6. A. Evolució de la concentració relativa d'ATP en la soca GW1000 incubada a 30 °C (○), i irradiada amb UV en presència (●) i en absència d'adenina (■). B. Inducció del gen *umuC* en la soca GW1000 incubada a 30 °C (○), i irradiada en presència (●) i en absència d'adenina (■).

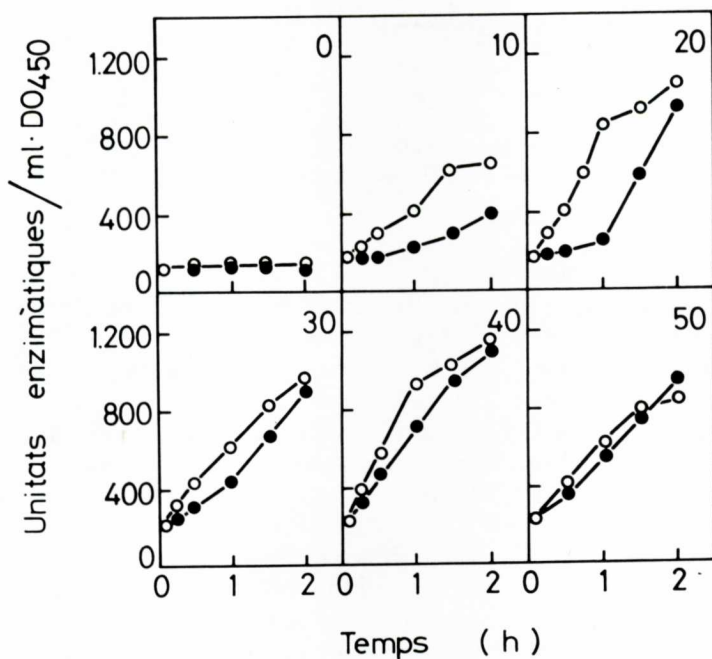


Fig. 7. Inducció del gen *umuC* en la soca GW1000 incubada a 30 °C, i irradiada amb UV a diferents dosis (0, 10, 20, 30, 40 i 50 Jm⁻²), en presència (○) i en absència d'adenina (●).

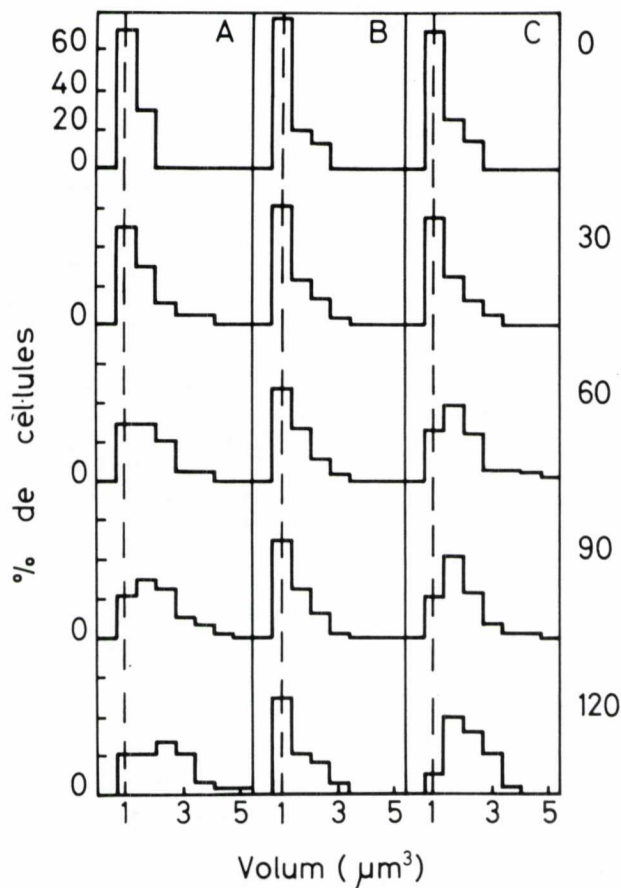


Fig. 8. Evolució dels volums cel·lulars de les soques CM1470 *Atp⁻* (A), CM2786 superproductora d'ATP sintasa (B) i de la sòca salvatge AB1157 (C), a diferents temps després de la irradiació amb UV a una dosi de 20 J m^{-2} .

a diferents dosis. Com es pot veure, l'efecte estimulador de l'adenina té lloc aproximadament fins una dosi de 40 J m^{-2} . Això demostra que, a dosis inferiors, l'ATP produït després de la irradiació és limitant per l'activitat de la proteïna RecA, tal i com passa en el mutant *recA441* termoinduït. No obstant això, a dosis més altes la producció d'ATP és més elevada que el requeriment d'aquest nucleòtid per l'activació i l'activitat de la proteïna RecA, i, per tant, un augment addicional d'ATP per mitjà de l'addició d'adenina no estimula la hidròlisi del repressor LexA dependent de la proteïna RecA activada.

Per altra banda, s'ha estudiat també l'efecte del tipus de metabolisme sobre l'expressió del sistema SOS després de la irradiació. En la Figura 4B s'ha demostrat que un metabolisme estrictament fermentatiu (el del mutant *atp706*), afavoreix la producció d'ATP després de la irradiació. Per determinar si aquesta circumstància podia influir en l'activitat de la proteïna RecA i en l'expressió del sistema, s'ha estudiat la inducció d'una de les respostes SOS (la inhibició de la divisió cel·lular), en el mutant *atp706* i en la sòca superproductora d'ATP sintasa. En la Figura 8 es pot veure com en la sòca *Atp⁻* la filamentació cel·lu-

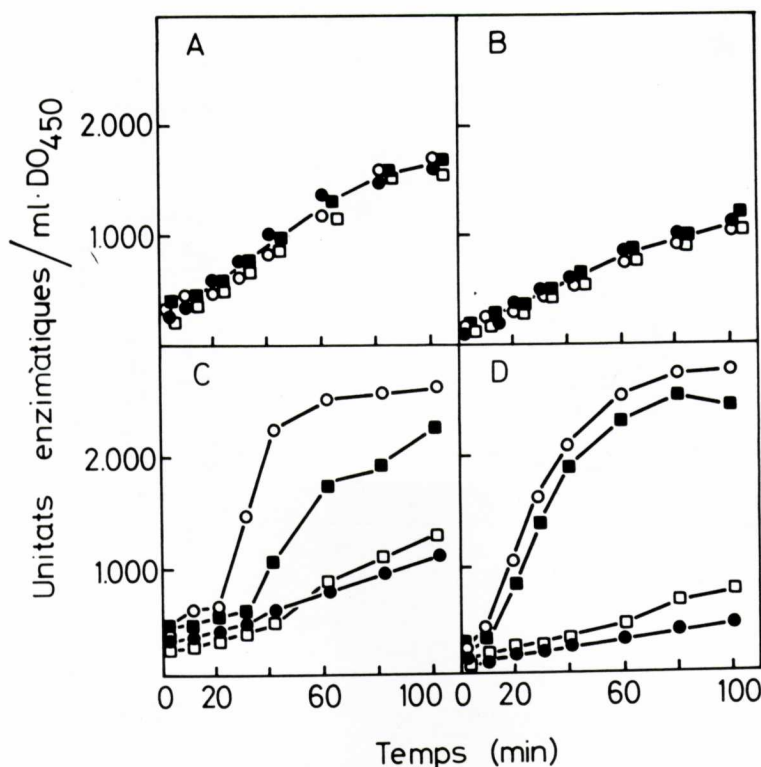


Fig. 9. Inducció dels gens *recA* (A i C) i *sfiA* (B i D) en les soques GC2375 i GY4786 irradiades amb UV a 20 Jm^{-2} , i preincubades amb dinitrofenol (250mM) durant 60 minuts abans de la irradiació (●, ○), i post-incubades amb el mateix producte després de la irradiació, durant tot l'experiment (○, ■). Com a control, es presenta la inducció dels gens en cultius irradiats i crescuts abans i després de la irradiació en absència de dinitrofenol (□). En els panels A i B, es mostren els resultats obtinguts quan la concentració de glucosa del medi és del 0,4 % (p/v), mentre que en els panels C i D es mostren els resultats obtinguts quan la concentració de glucosa és del 0,05 %.

lar després de la irradiació és molt més intensa que en la soca salvatge, i per altra banda en la soca superproductora el metabolisme oxidatiu fa que aquesta filamentació s'expressi més deficientment. Aquesta inhibició de la filamentació és deguda exclusivament a la menor activitat de la proteïna RecA degut a la poca disponibilitat d'ATP, ja que en les soques UA4165 i UA4164 portadores del plasmidi superproductor d'ATP sintasa i de les fusions *recA-lacZ* i *sfiA-lacZ*, respectivament, la transcripció d'aquests dos gens després de la irradiació és molt més dèbil que en les soques ATP⁺ (resultats no presentats).

També s'ha estudiat la intensitat de transcripció dels gens *recA* i *sfiA* en cultius incubats en presència de dinitrofenol abans i/o després de ser irradiats. En la Figura 9 es pot veure com els cultius que creixen amb presència del desacoblador després de la irradiació presenten una transcripció dels gens SOS més intensa que els que creixen sense. Ara bé, aquest fenomen només té lloc quan la concentració de glucosa és limitant (Fig. 9A i Fig. 9B), i les cèl·lules duen a terme un metabolisme oxidatiu. No obstant això, quan la concentració de glucosa del medi és elevada (Fig. 9C i Fig. 9D), i les cèl·lules obtenen l'ATP

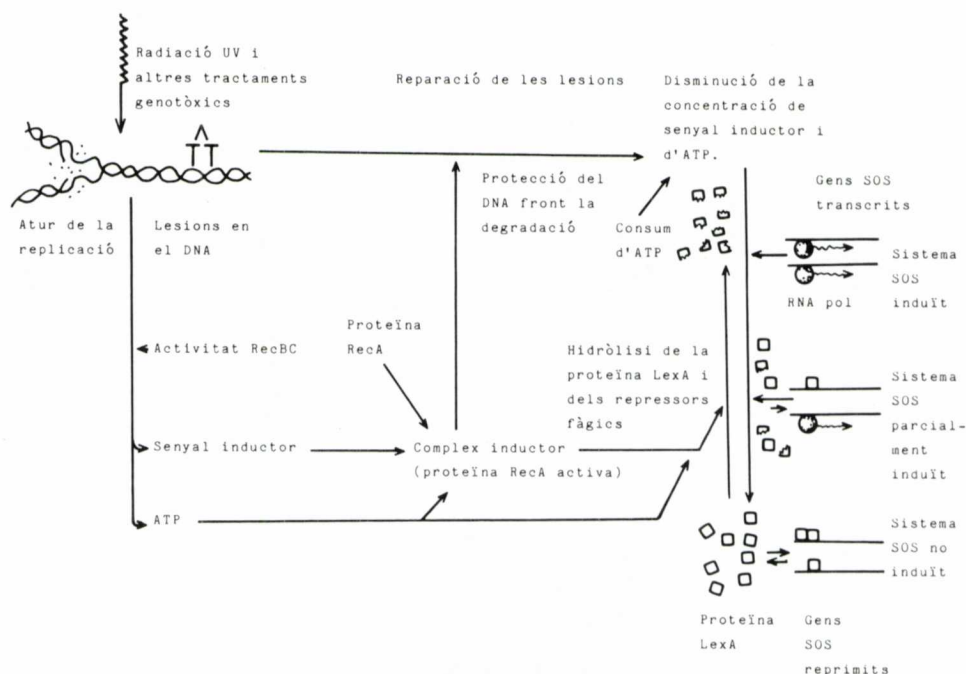


Fig. 10. Model global de la inducció del sistema SOS, des de la gènesi de la lesió en el DNA i del senyal inductor, fins al control i la reversió de la seva expressió. L'activitat RecBC sobre el DNA lesionat té com a conseqüència l'aparició de regions de DNA unicatenari i fragments oligonucleotídics, ambdós activant la proteïna RecA. A més, la metabolització d'aquests fragments té com a resultat una síntesi massiva d'ATP per fosforilació a nivell de substrat, que és utilitzat per la proteïna RecA durant la hidròlisi dels repressors LexA. Tant la disminució de la concentració de senyal inductor com de la d'ATP, té com a conseqüència la desactivació progressiva de la proteïna RecA i la repressió dels gens SOS. No obstant això, quan l'activació de la proteïna RecA no és prou eficient o quan la disponibilitat d'ATP és limitant, pot haver-hi una inducció d'aquells gens reprimits més dèbilment, i, per conseqüent, l'expressió d'un fenotip SOS parcial.

bàsicament per mitjà d'oxidacions incompletes, el desacoplador no té l'efecte estimulator que s'ha descrit abans.

DISCUSSIÓ

L'expressió del sistema de reparació SOS d'*Escherichia coli* és un dels fenòmens més estudiats en els darrers deu anys dins el camp de la reparació del DNA en bacteris. La seva naturalesa pleiotròpica ha despertat un gran interès, ja que està determinada per un sistema de regulació genètica molt complex. Els punts claus d'aquest mecanisme són la proteïna LexA, que és el repressor d'una llarga sèrie de gens SOS, i

la proteïna RecA, que, entre altres funcions té la d'hidrolitzar aquest repressor.

No obstant això, en un cultiu no exposat a agents genotòxics els gens SOS estan reprimits. Això es deu a que la proteïna RecA solament duu a terme la seva activitat proteolítica si és activada per algun tipus d'efecte de les lesions en el DNA sobre ella mateixa. La naturalesa del senyal inductor del sistema SOS no és massa clara, però s'ha associat a regions de DNA unicatenari i/o fragments oligonucleotídics (LITTLE i MOUNT, 1982; OISHI i SMITH, 1978), que interaccionen amb la proteïna RecA i li confereixen l'activitat proteolítica específica.

In vitro, aquesta interacció de la proteïna RecA amb el DNA unicatenari està clarament demostrada tant en processos que condueixen a la recombinació com en processos que condueixen a la ruptura hidrolítica del repressor LexA. En els dos casos, però, hi ha consum d'ATP, i la presència d'aquest nucleòtid és necessària perquè es dugui a terme la proteolisi (ROBERTS *et al.*, 1989; LITTLE *et al.*, 1980). És per això que semblava correcte suposar que, *in vivo*, la proteïna RecA també utilitza aquest cofactor, tot i que no es coneixien les variacions de la concentració citoplasmàtica del nucleòtid durant l'expressió del sistema SOS.

Seguint aquest raonament, en el treball que presentem es recullen els resultats de l'estudi d'aquestes variacions. Després de la irradiació amb llum ultraviolada hi ha un augment ràpid i progressiu de la concentració intracel·lular del nucleòtid (Fig. 1) tant en la soca salvatge com en els mutants RecA⁻; aquest augment depèn directament de la dosi d'irradiació (Fig. 2B i Fig. 3). A més, l'augment d'ATP està molt retrassat en el mutant RecBC (Fig. 2B), fet que demostra que la degradació del DNA lesionat produïda per l'exonucleasa V (CHAUDHURY i SMITH 1984) és directament responsable d'aquest fenomen. El petit augment del nivell d'ATP que presenta aquest mutant és degut probablement a l'acció d'altres nucleases cel·lulars, les quals, encara que d'una manera no tan eficient, poden actuar sobre el DNA lesionat. Un fet que està d'acord amb aquesta hipòtesi és que en les soques RecA⁻, en les quals no té lloc la inhibició de la funció RecBC per part de la proteïna RecA (WALKER, 1984), hi ha un augment molt més intens de l'ATP (Fig. 2), amb unes cinètiques que no són tan dependents de la dosi emprada com les de la soca salvatge (Fig. 3).

Relacionat amb el possible origen de l'augment d'ATP després de la irradiació, els resultats presentats en la Figura 4A de-

mostren que aquest augment no és degut a una inhibició del consum per algun efecte indiscriminat de la llum ultraviolada, sinó a una síntesi *de novo* que té lloc independentment de la fosforilació oxidativa (Fig. 4A). A més, un metabolisme estrictament fermentatiu en el muntant *atp706* (MEYENBOURG *et al.*, 1984) estimula aquesta producció, fet que demostra que el seu origen es troba en la fosforilació a nivell de substrat, probablement mitjançant la metabolització dels productes de l'activitat exonucleasa V, i en el cas dels mutants *recBC*, de l'activitat d'altres enzims que el substitueixen.

A partir del minut 20 després de la irradiació, hi ha un descens de la concentració intracel·lular d'ATP dependent de l'activitat de la proteïna RecA i de la hidròlisi dels repressors (Fig. 1B i Fig. 3). Aquest fenomen està doncs relacionat amb l'expressió del sistema SOS, i no depèn de la inducció específica de cap de les funcions, ja que el comportament del mutant *lexA51*, que té una proteïna LexA que no pot interaccionar amb els operadors dels gens SOS (i per tant el sistema s'expressa constitutivament), és el mateix que el de la soca salvatge. Aquest consum massiu d'ATP que la proteïna RecA duu a terme *in vivo* durant la seva activitat proteolítica és capaç de fer minvar la concentració del nucleòtid en les soques irradiades fins als seus valors inicials (Fig. 3A), i per sota d'aquests valors, en el mutant *recA441* termoinduït (Fig. 5A).

A més, els resultats obtinguts amb la utilització d'adenina (Fig. 5, Fig. 6 i Fig. 7) demostren que la proteïna RecA no sols consumeix l'ATP produït després de la irradiació sinó que, fins i tot, la seva activitat està regulada per la disponibilitat del nucleòtid. També es demostra que la concentració intracel·lular d'ATP és limitant per a la proteïna RecA441 termoactivada i per a la proteïna RecA⁺ en cultius irradiats a dosis per sota dels 40 J m⁻².

Aquestes dades, juntament amb les obtingudes en el nostre laboratori sobre l'estudi de l'expressió del sistema SOS en mutants *nrdA*, que no sintetitzen desoxiribonucleòtids perquè la ribonucleotidil reducció no és funcional, confirmen que tot i que *in vitro* altres nucleòtids com el d'ATP són més efectius com a cofactor per la proteïna RecA que l'ATP (PHIZIKI i ROBERTS, 1981), *in vivo* aquest darrer és el que utilitza el complex inductor durant la seva activitat.

Per altra banda, la intensitat de la producció d'ATP en cèl·lules irradiades no sembla ser només un factor determinant de la intensitat de la transcripció d'alguns gens SOS. En aquest sentit, hi ha dades que suggereixen que l'eficiència del consum d'ATP pel complex inductor pot determinar una transcripció diferencial del sistema. D'aquesta manera, el tractament amb àcid naldíxic o amb metil-nitrosoguanidina de la soca salvatge i la irradiació del mutant *recF143*, no ocasionen el consum de l'ATP produït, i induïxen diferencialment les funcions SOS (CAIRÓ, 1984; VERICAT, 1983). Això indica que la naturalesa del senyal inductor, i la no funcionalitat de la proteïna RecF, que probablement interacciona amb la proteïna RecA durant la seva activitat (VOLKERT i HARTKE, 1984), pot alterar l'eficiència ATPàsica del complex inductor, i que aquest fenomen està associat amb una expressió diferencial del sistema. Tot i que cal estudiar més extensament aquest aspecte, aquestes dades juntament amb els resultats presentats en aquest treball, suggereixen que la concentració d'ATP *in vivo* és un element regulador molt important de la intensitat, l'especificitat i la reversió de l'expressió de les funcions SOS.

En la Figura 9, hom es presenta un model global de la inducció del sistema SOS, en el que la disponibilitat d'ATP juga un paper regulador. En primer lloc, la degradació del DNA lesionat, deguda a l'acti-

tat de l'enzim RecBC, no és només la font de senyal inductor per la proteïna RecA, sinó que és també la font del cofactor utilitzat per la proteïna durant la seva activació i trencament del repressor LexA. Així mateix, l'activitat d'aquesta proteïna és capaç d'inhibir gradualment la producció del nucleòtid. Tant aquesta inhibició com el seu consum, fan minvar el nivell intracel·lular d'ATP, fet que junt amb la reparació de les lesions i la desaparició del senyal inductor desactiven a poc a poc el sistema.

Els tractaments genotòxics que produeixen menys ATP, activen menys eficientment la proteïna RecA, que manifesta una activitat més baixa, i com a conseqüència té lloc una menor hidròlisi del repressor LexA citoplasmàtic. Això condueix a l'expressió de fenotips SOS parcials ja que la proteïna LexA no presenta la mateixa afinitat per tots els gens SOS (EBINA *et al.*, 1983; BRENT i PTASHNE, 1981), i per tant no tots són transcrits amb la mateixa intensitat.

Agraïments

Agraïm als Drs. M. Blanco, S. Ellegde, R. D'Ari i K. Meyenburg que ens hagin enviat algunes de les soques bacterianes utilitzades en aquest treball, i a J.M. Cuartero la realització dels dibuixos. Hem d'agrair també la concessió d'un Ajut a la Recerca de la CIRIT de la Generalitat de Catalunya per a l'adquisició d'equip tècnic. A.V. ha rebut una beca del FIS de la Seguretat Social per a dur a terme aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

- BARBÉ, J., VERICAT, J.A. i GUERRERO, R. (1983a) Discriminate induction of SOS functions in *Escherichia coli* by alkylating agents. *J. Gen. Microbiol.* 129:2079-2089.
- BARBÉ, J., VERICAT, J.A. i GUERRERO, (1983b) *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. (1983c) Indirect induction of SOS functions in *Salmonella typhimurium*. *Antoine 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.
- BRENT, R. i PTASHNE, M. (1980) The *lexA* gene product represses its own promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1932-1936.
- BRENT, R. i PTASHNE, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4204-4208.
- BRYANT, F.R., TAYLOR, A.R. i LEHMAN, I.R. (1985) Interaction of the *recA* protein of *Escherichia coli* with single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 260:1196-1202.
- CAIRÓ, J. (1984) Importancia de la degradación del DNA en la expresión del sistema de reparación de emergencia de *Escherichia coli*. Tesina de Llicenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona.
- CLARK, A.J. i MALOE, O. (1967) DNA replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 23:99-112.
- CLARK, A.J. (1980) A view of the *recBC* and *recF* pathways of *E. coli* recombination. En B. Alberts (ed). Mechanistic studies of DNA replication and recombination: pp. 891-899. ICN-UCLA Symposium. Academic Press, New York.
- COHEN, S.P., RESNICK, J. i SUSSMAN, R. (1983) Interaction of single-strand binding protein and RecA protein at the single-stranded DNA site. *J. Mol. Biol.* 167:901-909.
- CRAIG, N.L. i ROBERTS, J.W. (1980) *E. coli recA* protein-directed cleavage of phage lambda repressor requires polynucleotide. *Nature* 283:26-30.
- CRAIG, N.L. i ROBERTS, J.W. (1981) Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli recA* protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *J. Biol. Chem.* 256:8039-8044.
- CHAUDHURY, A. i SMITH, G. (1984) *Escherichia coli recBC* deletion mutants. *J. Bacteriol.* 160:788-791.
- D'ARI, R. (1985) The SOS system. *Biochimie* 67:343-347.
- DAY, R.S. (1977) UV-induced alleviation of K-specific restriction of bacteriophage lambda. *Virology* 21:1249-1251.
- DEFAIS, M., FAUQUET, P., RADMAN, M. i ERRERA, M. (1971) Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of lambda in different genetic systems. *Virology* 43:495-503.
- EBINA, Y., TAKAHARA, Y., KISHI, F., NAKAZAWA, A. i BRENT, R. (1983) LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J. Biol. Chem.* 13258-13261.
- 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.
- GUDAS, L.J. (1976) The induction of protein X in DNA repair and cell division mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 104:576-587.
- GUDAS, L.J. i PARDEE, A.B. (1976) DNA synthesis inhibition and the induction of protein X in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 101:459-477.
- GUERRERO, R. i BARBÉ, J. (1982) Expression of *recA*-gene dependent SOS functions in *Salmonella typhimurium*. *Antoine van Leeuwenhoek* 48:159-167.
- HORII, T., OGAWA, T., NAKATANI, T., HASE, T., MATSUBARA, H. i OGAWA, H. (1981) Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell* 27:515-522.
- 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. (1981) Mutagenesis of phage: Weigle mutagenesis is induced by coincident lesion in the double helical DNA of the host cell genome. *Mol. 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. *Mol. Gen. Genet.* 193:288-292.
- KENYON, C.J. i WALKER, G.C. (1980) DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2819-2823.
- KENYON, C.J. i WALKER, G.C. (1981) Expression of the *E. coli uvrA* gene is inducible. *Nature* 289:808-810.
- KENYON, C.J., BRENT, R., PTASHNE, M. i WALKER, G.C. (1982) Regulation of damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 160:445-457.
- KIRBY, E.P., JACOB, F. i GOLTHWAIT, D.A. (1967) Prophage induction and filament formation in a mutant strain of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:1903-1903.
- LITTLE, J.W. i HARPER, J.E. (1979) Identification of the *lexA* gene product of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:6147-6151.
- LITTLE, J.W., MOUNT, D.W. i YANISCH-PERRON, C.R. (1981) Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4199-4203.
- LITTLE, J.W., EDMISTON, S.H., PACELLI, L.Z. i MOUNT, D.W. (1980) Cleavage of the *Escherichia coli lexA* protein by the *recA* protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3225-3229.
- LITTLE, J.W. i MOUNT, D.W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11-22.
- LITTLE, J.W. (1984) Autodigestion of LexA and phage lambda repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1375-1379.

- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. i SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.
- MCENTEE, K., WEINSTOCK, G.M. i LEHMAN, I.R. (1979) Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the *recA* protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2615-2619.
- MCENTEE, K., WEINSTOCK, G.M. i LEHMAN, I.R. (1980) *recA* protein catalyzed strand assimilation: stimulation by *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:857-861.
- MEYENBURG, K.V., JØRGENSEN, B.B. i DEURS, B.V. (1984) Physiological and morfological effects of overproduction of membrane-bound ATP synthase in *Escherichia coli* K-12. *EMBO Journal* 3:1791-1797.
- MEYN, M.S., ROSSMAN, T. i TROLL, W. (1977) A protease inhibitor blocks SOS functions in *E. coli*: antipain prevents repressor inactivation, ultraviolet mutagenesis, and filamentous growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:1152-1156.
- MILLER, J.M. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- MOUNT, D.W., WERTMAN, K.F., PETERSON, K.R., LITTLE, J.W., MARKHAM, B.E. i HARPER, J.H. (1983) Regulation of the SOS response of *Escherichia coli* by the *lexA* and *recA* gens. A Gene Expression, pp. 135-143. Alan R. Liss, Inc. New York.
- OISHI, M. i SMITH, C.L. (1978) Inactivation of phage repressor in a permeable cell system: role of *recBC* DNase in induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3569-3573.
- PHIZICKY, E.M. i ROBERTS, J.M. (1981) Induction of SOS functions: Regulation of proteolytic activity of *E. coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside triphosphate. *Cell* 25:259-267.
- POLLARD, E.C., FLUKE, D.J. i KAZANIS, D. (1981) Induced radioresistance: an aspect of induced repair. *Mol. Gen. Gen.* 184:421-429.
- QUILLARDET, P., HUISMAN, O., D'ARI, R. i HOFNUNG, M. (1982) SOS Cromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to mesure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5971-5975.
- RADMAN, M. (1974) Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. A L. Prokash, F. Sherman, M. Miller, C. Lawrence i H.N. Tabor (eds). Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis. pp. 128-142. Charles C. Thomas, Springfield.
- RADMAN, M. (1975) SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. A P.C. Hanawalt i R.B. Setlow (eds.). Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Parts A & 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., ROBERTS, C.W. i CRAIG, N.L. (1978) *Escherichia coli recA* gene product inactivates phage lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4714-4718.
- RUSCHE, J.R., KONIGSBERG, W. i HOWARD-FLANDERS, P. (1985) Isolation of altered *recA* polypeptides and interaction with ATP and DNA. *J. Biol. Chem.* 260:949-955.
- DANCAR, A., STACHELECK, C., KONIGSBERG, W. i RUPP, W.D. (1980) Sequences of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Sci. USA* 77:2611-2615.
- SATTA, G., GUDAS, L.J. i PARDEE, A.B. (1979) Degradation of *Escherichia coli* DNA: Evidence for limitation in vivo by protein X, the *recA* gene product. *Molec. gen. Genet.* 168:69-80.
- SCHNARR, M., POUYET, J., GRANGER-SCHNARR, i DAUNE, M. (1985) Large-scale purification, oligomerization equilibria, and specific interaction of the LexA repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 24:2812-2818.
- SWENSON, P.A., i SCHELLEY, R.L. (1974a) Respiration, growth, and viability of repair-deficient mutants of *Escherichia coli* after ultraviolet irradiation. *J. Radiat. Biol.* 25:51-60.
- SWENSON, P.A. i SCHELLEY, R.L. (1974b) Evidence relating cessation of respiration, cell envelope changes, and death in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* B/r cells. *J. Bacteriol* 117:551-559.
- VERICAT, J.A. (1983) Expresión diferencial de las funciones de reparación de emergencia en enterobacterias. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- WOLKERT, R.M. i HARTKE, M. (1984) Suppression of *Escherichia coli recF* mutations by *recA*-linked *srfa* mutations. *J. Bacteriol* 157:498-506.
- WALKER, G.C. (1984) Mutagenesis and inducibles responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 48:60-92.
- WITKIN, E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40:869-907.
- YANCEY, S.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* genes in *E. coli*. II. Effects of truncated gene products on in vivo *recA*+ protein activity. *Molec. Gen. Genet.* 185:99-104.