

-
- iii) **Extensión del heterodúplex de DNA:** tiene lugar tras la formación de la unión por migración de las cadenas y empieza con el intercambio, lo que origina la formación de un círculo de doble cadena cortado. La migración se realiza en sentido 5'-3' con relación a la cadena sencilla a la que está unida, a una velocidad de 2-10 pb por segundo con consumo de ATP e induciendo estrés torsional en el DNA de doble cadena. Al completarse la reacción se disocia la proteína RecA con hidrólisis de ATP.

1.1.2.2.2. Actividad coproteasa

Como ya se ha comentado, RecA estimula la rotura catalítica de varias proteínas. Es esta actividad coproteasa la que le otorga un papel importante en la regulación del sistema SOS y en otros procesos de reparación del DNA ya que esta es la acción que RecA* ejerce sobre el represor LexA conduciendo a la inducción de los genes del regulón SOS.

Otro tipo de proteínas sobre las que RecA* tiene actividad coproteasa son algunos represores de fagos, como el represor CI del fago ζ , al igual que sobre los represores de los procesos de transferencia codificados por ciertos elementos conjugativos autotransferibles (Beaber *et al.*, 2003)

1.1.2.2.3. Mutagénesis SOS

Este mecanismo, también denominado reparación tendente al error, es el último recurso de la célula para asegurar su supervivencia frente a una lesión que no ha podido ser resuelta por otros procesos. Para que tenga lugar es indispensable que RecA* actúe sobre UmuD, proteína que presenta una elevada homología con la región carboxi-terminal del represor LexA. En este caso, como también sucede con LexA, la proteína RecA actúa como coproteasa del proceso, y da lugar al péptido UmuD', un fragmento carboxi-terminal de 12 KDa.

En un primer momento la lesión es detectada por la DNA polimerasa III y, ante la imposibilidad de repararla, se detiene la replicación hasta que una polimerasa capaz de insertar un nucleótido incorrecto frente a la lesión lleva a cabo una reparación tendente al error, produciendo de esta manera una mutación, pero permitiendo que continúe la síntesis normal de DNA.

Este proceso requiere gran cantidad de proteínas UmuD y UmuC, que en condiciones normales se expresan a muy bajos niveles. Ambas proteínas se hallan controladas a nivel transcripcional por LexA, y a nivel postranscripcional por Lon, ClpXP y RecA (González y Woodgate, 2002). Cuando el sistema se induce frente a un daño del DNA se desreprime el operón *umuDC*, aumentando la cantidad de las proteínas que codifican (Fig.1.7). Entonces la proteína RecA* cataliza la proteólisis de UmuD a su forma activa UmuD' (Nohmi *et al.*, 1988) y se forma el complejo Umu(D')₂C, que se une a la región del DNA donde se ha producido la lesión, con la intervención de RecA* (Frank *et al.*, 1993). De este modo las moléculas Umu(D')₂C interaccionan en el lugar dañado del DNA con dos

subunidades de la DNA polimerasa III, formando de esta manera un mutasoma, esto es, un complejo multiproteico que facilita la replicación tendente a error.

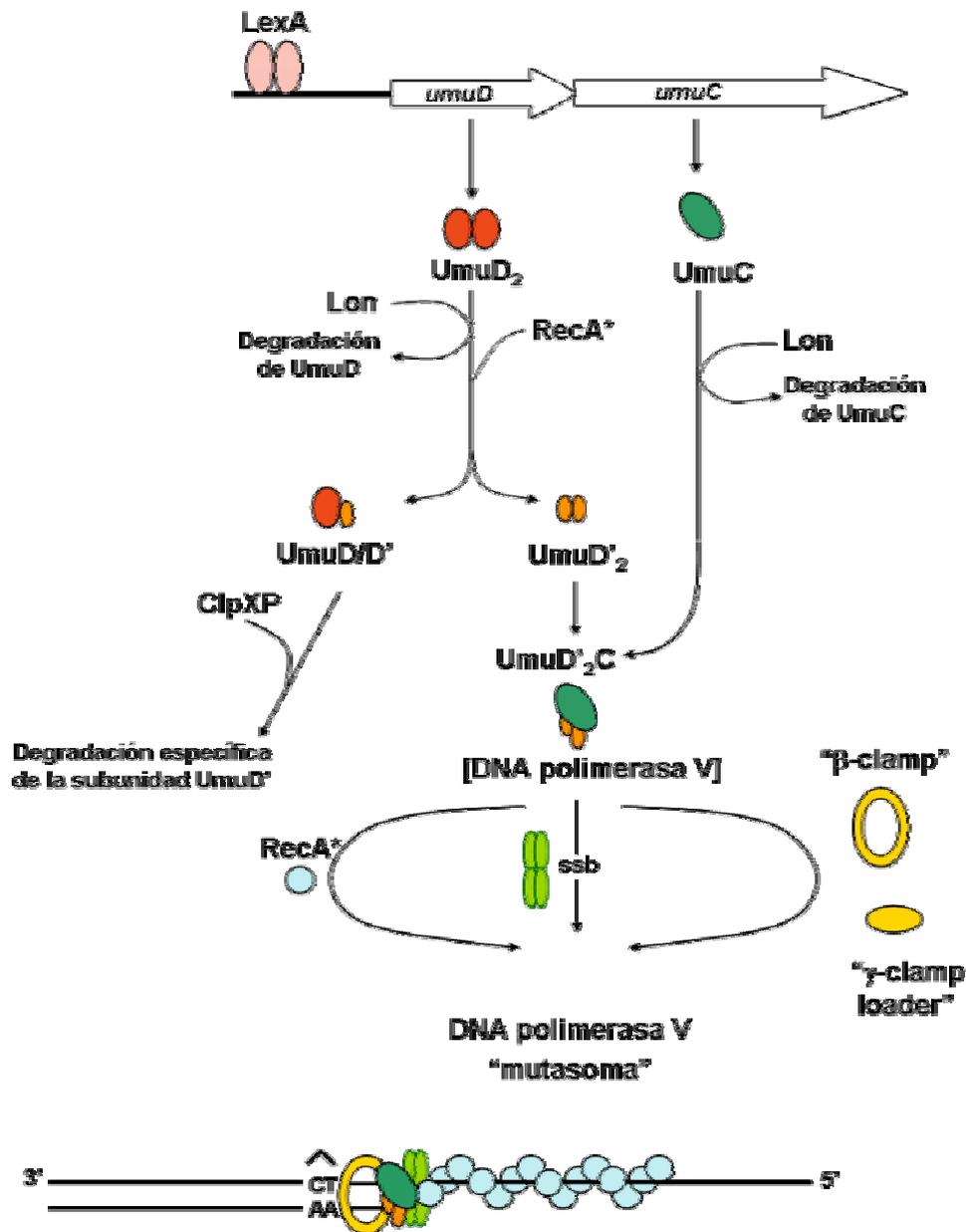


Figura 1.7. Formación del mutasoma. Modelo actual de la actividad de las proteínas UmuD y UmuC. La concentración de ambas está estrechamente regulada a nivel transcripcional por LexA, y a nivel traduccional por Lon, ClpXP y RecA. Cualquier complejo $UmuD'_2C$ que sobreviva a este control es libre de interactuar con RecA⁺, Ssb y las subunidades "η-clamp/v-clamp loader" de la DNA polimerasa III, en el punto del DNA dañado para formar el mutasoma. Modificado de González y Woodgate (2002).

En un principio se hipotetizó que el complejo $Umu(D')_2C$ actuaba sobre la DNA polimerasa III (Rehrauer *et al.*, 1998; Smith y Walker, 1998), pero recientemente se ha demostrado la existencia de la DNA polimerasa V, constituida por el producto de los genes *umuC* y *umuD* y formada por un heterotrímero del complejo $Umu(D')_2C$ que es la responsable de la síntesis translesión (Tang *et al.*, 1999; González y Woodgate, 2002). Por lo tanto, es esta polimerasa V la que incorpora un nucleótido incorrecto frente a la lesión y

posteriormente elonga la cadena tras desplazar a la DNA polimerasa III con la colaboración de RecA. Posteriormente la cadena se elonga unos cuantos nucleótidos más y a continuación vuelve a actuar la DNA polimerasa III (Tang *et al.*, 1999, Sutton *et al.*, 2000).

Debido a la peligrosidad que para la estabilidad de la célula tiene la mutagénesis SOS, ésta se halla regulada de una forma muy estrecha mediante diferentes mecanismos:

- i)** El promotor del operón *umuDC* está fuertemente reprimido por LexA y solo se induce su expresión cuando las lesiones en el DNA son elevadas. (Kitagawa *et al.*, 1985).
- ii)** Tanto UmuD como UmuC son proteínas muy lábiles.
- iii)** La autohidrólisis de UmuD es más lenta que la de la proteína LexA (Nohmi *et al.*, 1988).
- iv)** UmuD, que en solución tiende a formar dímeros, tiene más afinidad por UmuD de la que tiene por otra molécula de UmuD'. Por lo tanto es más probable la formación de heterodímeros UmuDD' no funcionales que la de homodímeros UmuD₂' (Battista *et al.*, 1990).

Por último, y tal como hemos comentado en el apartado 1.1, para que la mutagénesis SOS se lleve a cabo, es indispensable la presencia de SSB, proteína que facilita la formación del filamento nucleoproteico de RecA* y la unión de éste a la cadena de ssDNA. Incluso se ha indicado la posibilidad de que la formación de complejos mixtos SSB-RecA* con el DNA sea un requisito para que se produzca la síntesis translesión (Reuven *et al.*, 2001). No obstante, estudios recientes apuntan a que la síntesis translesión por parte de la polimerasa V se realiza en ausencia del filamento nucleoproteico de RecA, y ésta última sería necesaria en forma monomérica (Pham *et al.*, 2002). En este caso RecA llevaría a cabo al menos dos funciones (Fig.1.8):

- i)** Por un lado interaccionaría con la polimerasa V estimulando su actividad. De esta manera se permitiría la síntesis de DNA durante la lesión, pero no más allá de ella.
- ii)** Por otra parte, su interacción con un segmento corto de DNA adyacente a la lesión sería necesaria para que se produjese la síntesis translesión.

Según estos últimos resultados, Ssb actuaría en concierto con la DNA polimerasa V desmontando el filamento nucleoproteico de RNA en dirección 3'-5' por delante del mutasoma, y permitiendo, por tanto, la síntesis translesión. Si esto fuese así el polímero de RecA serviría para proteger al DNA de la mutagénesis SOS (Pham *et al.*, 2002).

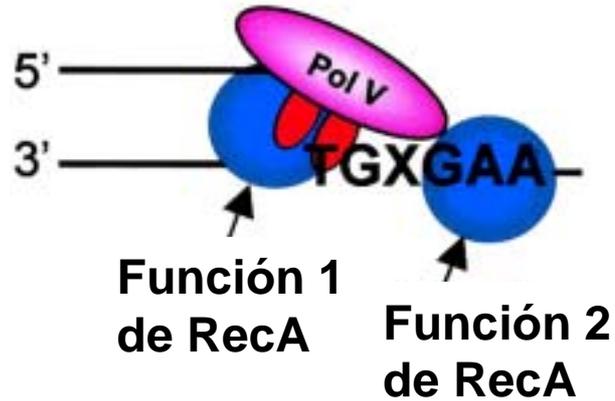


Figura 1.8. Representación del modelo de síntesis translesión SOS catalizada por la DNA polimerasa V. RecA actúa a dos niveles diferentes. Una primera función estimula la actividad polimerasa V interactuando en su extremo 3'-OH y una segunda cocataliza la síntesis translesión uniéndose a la cadena de DNA molde situada en el lado 5' de la lesión X. Modificado de Pham *et al.* (2002).

1.1.3. El regulón SOS

Los genes regulados por LexA, esto es, los pertenecientes al regulón SOS, tienen generalmente una sola caja SOS, pero en algunos casos puede haber dos (*lexA* entre otros) y hasta tres (*recN*) regiones operadoras (Schnarr *et al.*, 1991). Estos genes serán los regulados más fuertemente.

Por otro lado no todas las bases del motivo consenso al que se une la proteína LexA tienen la misma importancia para la unión, sino que las más conservadas, en este caso **CTGT-N8-ACAG**, son las más importantes (Tabla 1.2). Se ha descrito que la región específica del operador a la que se une a la proteína LexA es **CTGTNNNN** (Knegtel *et al.*, 1995).

Tabla 1.2. Genes cromosómicos de *E. coli* regulados por LexA y las secuencias de sus cajas SOS correspondientes

Genes	Caja SOS
<i>dinA</i> (<i>polB</i>)	GACT GT TATAAAA CCACAGCC
<i>dinB</i> (<i>dinP</i>)	CA CTGT TATACTTTA CCAGTG
<i>dinD</i> (<i>pscA</i>)	AA CTGT TATATAAA ATACAGTT
<i>dinG</i>	TA TGGC TGTTTATA ACAGTA
<i>dinI</i>	AC CTGT TATAAA TAACAGTA
<i>dinL</i> (<i>sosC</i> , <i>yjiW</i>)	TACT GAT GTATATATA ACAGGT
<i>dinM</i> (<i>sosD</i> , <i>ydjQ</i>)	CA CTGG ATAGATA ACCAGCA
<i>dinO</i> (<i>sosF</i> , <i>molR</i>)	AA CTGG A AAAAATTACAGGG
<i>dinQ</i>	TACT GT ATGATTAT CCAGTT
<i>dinS</i>	AG CTGT ATTTGTCT CCAGCA
<i>ftsK</i> (<i>dinH</i>)	TC CTGT TAATCCATA ACAGCA
<i>hokE</i> (<i>ybdY</i>)	CA CTGT TATAAA TAACAGCT
<i>lexA/dinf</i> (1)	TG CTGT TATATACT CACAGCA
<i>lexA/dinf</i> (2)	TG CTGT TATATACAC CCAGGG
<i>recA</i>	TACT GT ATGCTCATA ACAGTA
<i>recN</i> (1)	TACT GT TATATA AAAACAGTT
<i>recN</i> (2)	TACT GT ACACA ATAACAGTA
<i>recN</i> (3)	TA ATGG TTTTTTCATA ACAGGA
<i>ruvAB</i>	CG CTGG ATGTCTAT CCAGCA
<i>sbmC</i>	TACT GT TATATA AAAAACAGTA
<i>ssb</i>	AC CTGA ATGAATATA ACAGTA
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	TACT GT TACATCCATA ACAGTA
<i>umuDC</i>	TACT GT TATATA AAAAACAGTA
<i>uvrA</i> (<i>dinE</i>)	TACT GT TATATTCAT TCAGGT
<i>uvrB</i>	AA CTGT TTTTTTTAT CCAGTA
<i>uvrD</i>	AT CTGT TATATATAC CCAGCT
<i>ybfE</i>	AA CTGA T AAAAACCCAGCG
<i>ydjM</i> (1)	TACT GT ACGTATCG ACAGTT
<i>ydjM</i> (2)	CA CTGT TATA AAAAATCCTATA
<i>yebG</i>	TACT GT TATA AAAAATCACAGTT
<i>ysdAB</i>	CA CTGT TTATTTTATA ACAGTA
Consenso	TACT GT TATATATATA ACAGTA

Las bases en negrita corresponden a los motivos más conservados. Las bases en negrita y subrayadas corresponden a desviaciones de los motivos conservados CTGT, ACAG. Modificado de Fernández de Henestrosa *et al.*, (2000).

1.1.3.1. Variabilidad de la caja SOS

Todas las cajas SOS muestran una estructura palindrómica y un alto nivel de homología, pero son diferentes en cuanto a la secuencia, lo que provoca que el LexA se les una con diferente afinidad. Mediante estudios matemáticos, Lewis *et al.*, (1994) definieron para cada caja un índice heterólogo (HI), indicador de la afinidad de unión específica del represor LexA a un promotor determinado. Calcularon que la unión del represor a la caja tiene lugar cuando el valor HI es menor de 15, por lo que el gen es expresado con más facilidad cuanto más alto es su índice heterólogo (y por lo tanto el represor se le une con menos afinidad). De acuerdo con este valor podríamos agrupar a los genes SOS según el momento de la inducción SOS en que se expresan (Kuzminov, 1999) (Tabla 1.3):

- i) Genes como *lexA*, *uvrA*, *uvrB* y *uvrD*, cuyos productos están implicados en la reparación por escisión de nucleótidos, y los genes *ruvA* y *ruvB*, cuyos productos participan en la reparación del DNA por recombinación serían los primeros. Otros de los que se expresan primero son *dinI*, que codifica un inhibidor del paso *UmuD* a *UmuD'*, y *polB* (*dinA*) que codifica la DNA polimerasa II.
- ii) En la siguiente fase se expresan los genes *recA* y *recN*, cuyas proteínas participan en la reparación del DNA mediante recombinación. RecA, además, hemos visto que está implicada en la inducción del sistema SOS (vía RecA*), en la recombinación del DNA y en la reparación del DNA de cadena sencilla y doble. RecN está implicada en la recombinación RecF-dependiente y en la reparación de roturas de doble cadena.
- iii) De entre los últimos genes expresados se hayan *sfiA* (*sfiA*), que codifica un inhibidor de la división celular y causa filamentación celular, y los genes *umuD* y *umuC* que codifican la DNA polimerasa V.

Tabla 1.3. Algunos de los genes SOS de *E. coli* y su secuencia de expresión en la respuesta SOS.

Función		Número de copias por célula		Heterogeneidad
Gen	Producto del gen	No inducida	Inducida	Índice (HI)*
Expresados inicialmente				
<i>lexA</i>	Represor de genes SOS	1300	7540	6.31; 7.02
<i>uvrA</i>	Excinucleasa UvrABC	20	250	6.98
<i>uvrB</i>	Excinucleasa UvrABC	250	1000	6.11
<i>uvrD</i>	Helicasa II	5000-8000	25000-65000	8.80
<i>polB</i>	DNA polimerasa II	40	300	12.09
<i>ruvA</i>	Helicasa RuvAB	700	5600	9.19
<i>ruvB</i>	Reparación por recombinación	200	1600	9.19
<i>dinI</i>	Inhibidor del procesamiento de UmuD	500	2300	6.24
Expresados en segundo lugar				
<i>recA</i>	Regulador positivo del sistema	1000-10000	100000	4.31
<i>recN</i>	Reparación por recombinación	?	?	5.16; 9.38; 11.47
Expresados al final				
<i>sfiA</i>	(<i>sfiA</i>) inhibidor de la división celular	?	?	4.65
<i>umuD</i>	UmuD' (unidad de la DNA polimerasa V)	180	2400	2.77
<i>umuC</i>	DNA polimerasa V	0	200	2.77

* Calculado para caja LexA. Diferentes valores son indicados en genes que presentan más de una. Modificado de Kuzminov (1999).

1.1.4. Funciones SOS de reparación

1.1.4.1. Reparación por escisión de nucleótido

Mediante este mecanismo se elimina la lesión sustituyéndola por la secuencia original, utilizando como molde una cadena de DNA intacta. Es, por lo tanto, un mecanismo de reparación de alta fidelidad de lesiones producidas por agentes físicos, como la radiación UV, y diferentes agentes químicos (Friedberg *et al.*, 1995).

Para que esta reparación se lleve a cabo son necesarios los productos de los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*, de la DNA polimerasa I y de la DNA ligasa. De todos ellos solamente los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* pertenecen al regulón SOS (Fig.1.9).

Se pueden definir tres etapas a lo largo de todo el proceso:

- i) **Unión a DNA y reconocimiento del daño.** Un dímero de la proteína UvrA recorre la cadena de DNA y la rastrea hasta encontrar el daño. En este punto cambia su conformación y se produce la torsión de esa región del DNA, lo cual permite su interacción con la proteína UvrB, formándose un complejo UvrA₂B. Utilizando la energía de la hidrólisis del ATP, la actividad helicasa de la proteína UvrB abre la doble cadena y se forma un complejo de preincisión entre el DNA y UvrB, liberándose el dímero UvrA₂.
- ii) **Escisión de la cadena lesionada.** El siguiente paso consiste en la escisión de la cadena lesionada, para lo cual se requiere la interacción entre UvrC y el complejo formado por UvrB y el DNA. Se producen dos incisiones, una corta en el octavo enlace fosfodiéster en dirección 5' con respecto a la lesión y otra a nivel del cuarto enlace fosfodiéster en dirección 3' con respecto a la lesión. La primera incisión se produce en 3' por la acción endonucleasa de la proteína UvrB, mientras que la segunda, que tiene lugar en 5', es catalizada por UvrC. Se libera el fragmento que contiene la lesión y se separa la proteína UvrC, permitiendo la entrada de la proteína, UvrD (helicasa II).
- iii) **Síntesis de la nueva cadena.** Finalmente, por acción de la helicasa II y la DNA polimerasa I, se produce la síntesis reparadora de la nueva cadena, en presencia de dinucleósido-trifosfatos (dNTPs). Para esto, la proteína UvrB es desplazada por la DNA polimerasa I. Por último, el nuevo fragmento se une al resto de la cadena por acción de la DNA ligasa.

Este proceso normal de reparación por escisión de nucleótidos se denomina, *short patch repair*. Sin embargo, en algunas ocasiones este sistema falla y se produce el denominado *long patch repair* que se diferencia del anterior porque los parches de reparación son mucho mayores a los habituales de 12 nucleótidos, pudiendo llegar hasta los 1500 nucleótidos.

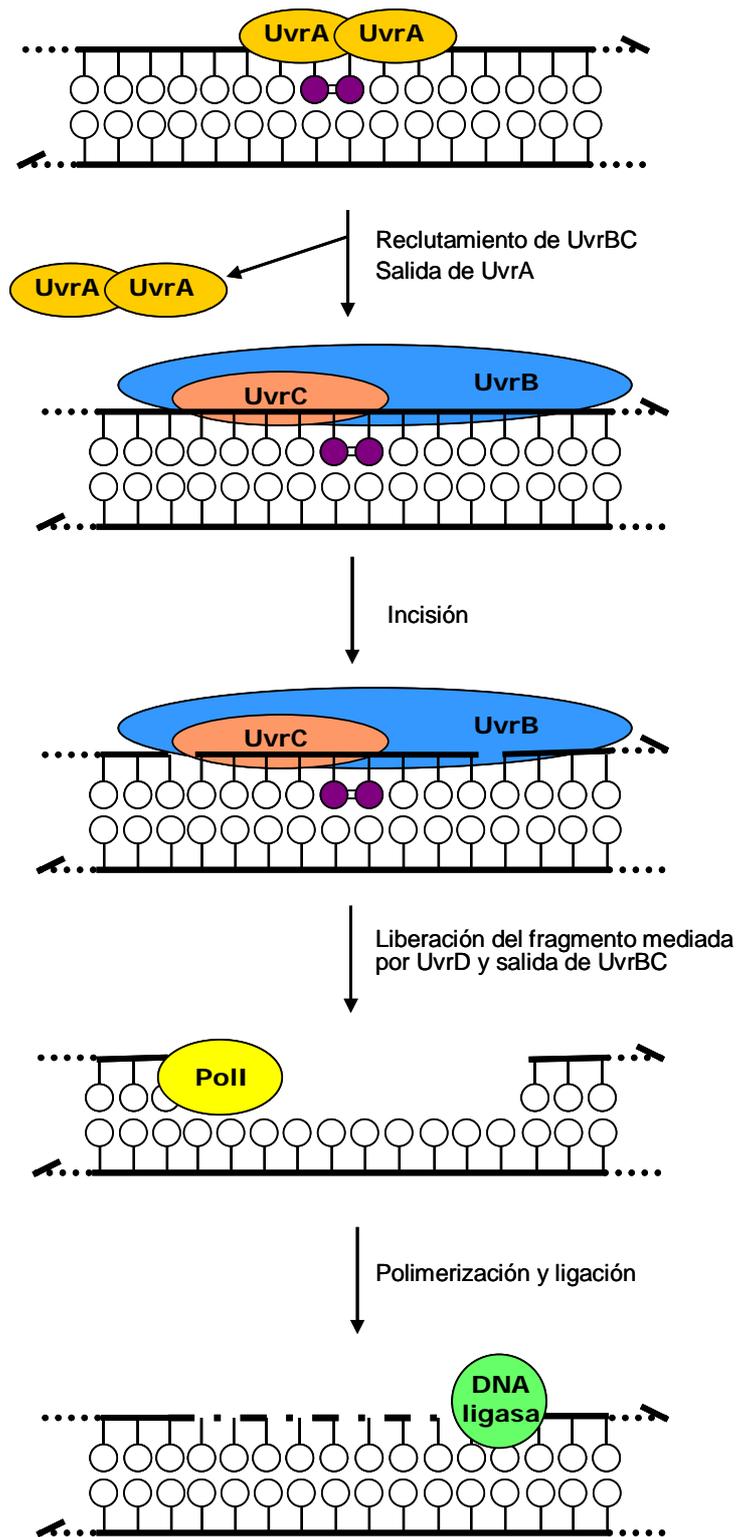


Figura.1.9. Reparación por escisión de nucleótido. Primero un dímero de UvrA se une a la lesión (bases lilas), y se reclutan subunidades UvrB y UvrC, quienes cortan el DNA en dos sitios asimétricos a la lesión. A continuación la DNA polimerasa I sintetiza una pequeña porción de DNA para reemplazar el fragmento dañado, que es liberado con la ayuda de la helicasa UvrD. Finalmente, la DNA ligasa completa el proceso de reparación. Modificado de Volkert y Landini (2001).

1.1.4.2. Reparación por recombinación

Este proceso se desencadena cuando en el DNA hay lesiones frente a las que la DNA polimerasa no puede continuar su funcionamiento normal y tiene que "saltar", dejando un hueco de unas 1000 bases en la cadena que estaba replicando. Esta discontinuidad en la doble cadena debida a huecos postreplicativos en las cadenas hijas hace imposible una reparación por replicación, ya que no se cuenta con una cadena molde intacta. En cambio mediante el proceso de reparación por recombinación la célula es capaz de continuar la replicación de una de las cadenas, a partir de la cual se podrá reparar la lesión mediante otras vías (Fig.1.10).

En la recombinación que tiene lugar durante este tipo de reparación participan otros mecanismos además del papel que cumplen las proteínas RecA y SSB ya mencionadas. De hecho, las dos vías más importantes para reparar daños de doble cadena en la fase presináptica son la vía RecBCD y la vía RecF.

En la primera está implicado el producto de los genes *recBCD* que tienen actividad ATPasa, DNA-helicasa, dsDNA- y ssDNA-exonucleasa y endonucleasa. Precisamente, el heterotrímero RecBCD en la fase presináptica, reconoce las roturas y, en presencia de Mg^{2+} y ATP, degrada los extremos de la doble cadena hasta alcanzar una región Chi de secuencia 5'-GCTGGTGG-3' (Bianco y Kowalczykowski, 1997). La interacción con el sitio Chi altera la actividad nucleasa de RecBCD, convirtiéndola en una RecBCD* recombinasa, la cual sigue su actividad degradando en una sola cadena, generando un extremo 3' libre, que permite a la proteína RecA continuar con la sinapsis (Friedberg, 1995; Kogoma, 1997; Churchill *et al.*, 1999; Kuzminov, 1999).

La segunda vía, la de RecF, está relacionada con la reparación replicativa y la replicación en plásmidos, y representa sólo una pequeña parte de la replicación cromosómica e interviene en la reparación de huecos de cadenas hijas. Participan los productos de los genes *recF*, *recJ*, *recO*, *recN*, *recQ* y *recR*. En la fase previa a la sinapsis, el complejo RecOR, con la participación del complejo RecFR, interviene sobre las cadenas hijas acomplejadas con la proteína SSB, permitiendo la polimerización de la proteína RecA sobre estas cadenas hijas y que ésta pueda realizar la recombinación. Aparte de *recA* y *ssb*, solamente el gen *recN* está regulado por LexA (Friedberg, 1995; Kuzminov, 1999).

Otras vías menos importantes actúan en casos especiales. Por ejemplo la de RecE, que se activa en mutantes *sbcA* relacionados con la presencia del fago críptico Rac, en la que participa la exonucleasa VIII (producto del gen *recE*) junto con la proteína RecT (Kuzminov, 1999) o la vía SbcBC, que participa en la eliminación de estructuras concretas.

En la fase postsináptica intervienen también dos vías adicionales, que participan en el proceso de *branch migration*, llevado a cabo por el producto del gen *recG*, la RecG helicasa, y más frecuentemente por el producto de los genes *ruvABC*, el resolvasoma RuvABC. De estos genes solamente *ruvA* y *ruvB* están regulados por LexA (Friedberg, 1995; Kogoma, 1997; Kuzminov, 1999).