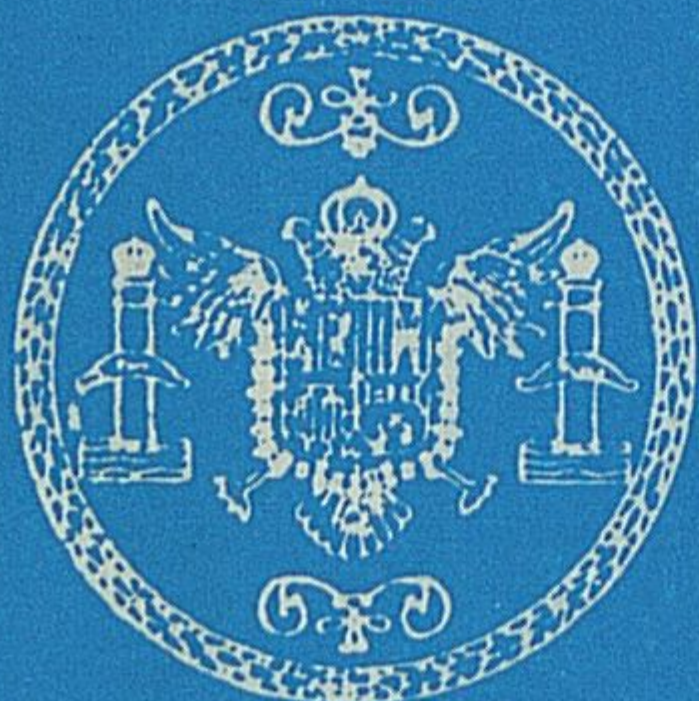


Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Estudio de los Mecanismos de Reparación
del ADN en *Rhizobium meliloti*

M.^a Angeles Goicoechea Acosta

TESIS DOCTORAL

1986



Biblioteca Universitaria de Granada



01533623

15/74



R. 33.009



T
13
22

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACION DEL ADN
EN *Rhizobium meliloti*

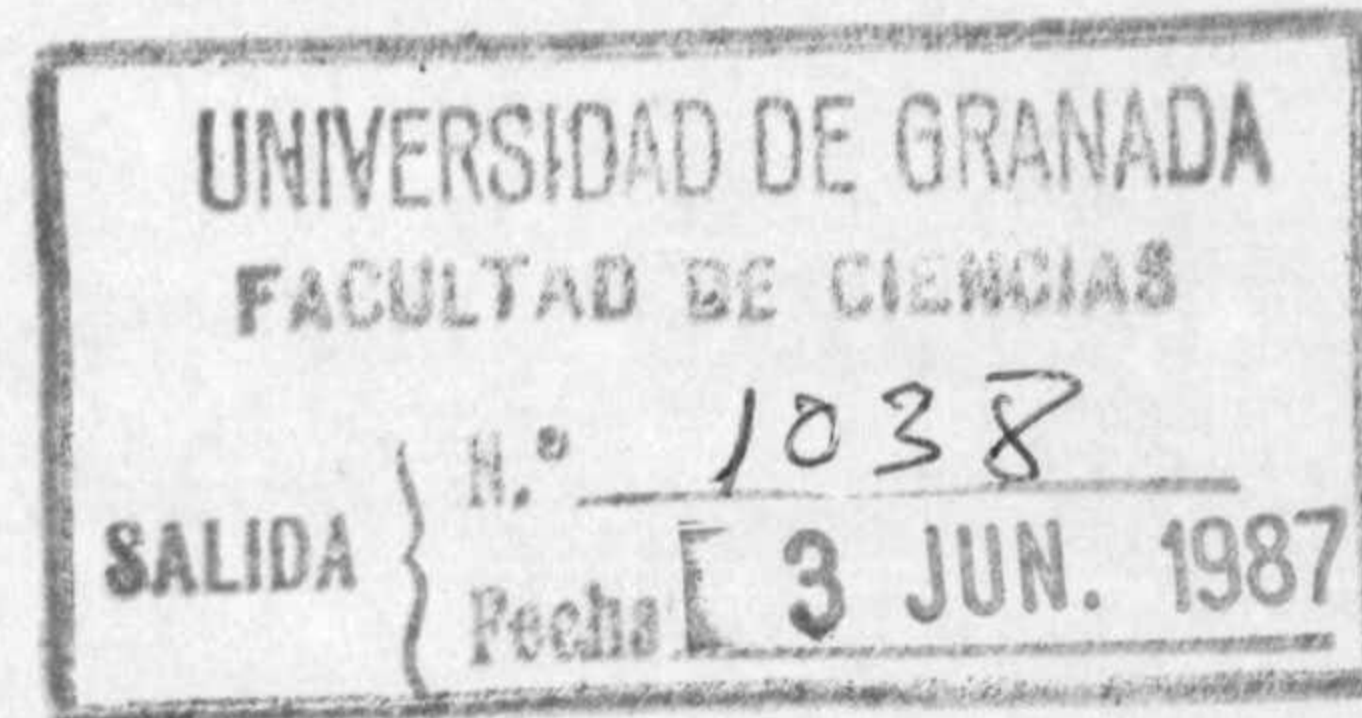
María de los Angeles Goicoechea Acosta

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1986

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	619644802
Nº Copia	121186200

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REPARACION DEL ADN
EN *Rhizobium meliloti*




Memoria que presenta la licenciada en
Ciencias Biológicas D^a M^a ANGELES
GOICOECHEA ACOSTA, para aspirar al
grado de Doctor.

Fdo.: M^a Angeles Goicoechea Acosta

Vº Bº
EL DIRECTOR

Fdo.: Enrique Montoya Gómez
Catedrático del Departamento de
Microbiología de la Facultad de
Ciencias. Universidad de Granada.



La presente Tesis Doctoral fue dirigida por el Prof. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue defendida el 16 de Junio de 1986, obteniendo la calificación de apto "cum laude" ante el Tribunal formado por los profesores D. Alberto Ramos Comerzana, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada, D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C. en Granada, D. Manuel Megías Guijo, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla, D. José Antonio Lupiáñez Cara, Profesor Titular de Bioquímica de la Universidad de Granada, y D. Antonio Luis Extremera León, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Granada.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Parte de estos resultados fueron presentados en la Segunda Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno (1985), en el X Congreso Nacional de Microbiología (1985) y en el 54th Annual Meeting of Genetics Society of America (1985).

Al finalizar esta Tesis Doctoral quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que colaboraron en su realización:

Al Prof. D. Enrique Montoya Gómez, Director de este trabajo por su ayuda y orientación.

Al Prof. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del CSIC por su orientación, apoyo y ánimo, que me ayudaron a seguir adelante en muchos momentos en que estuve a punto de abandonar.

Muy especialmente a Félix, por todo.

A Enrique, Jose, Antonio Luis, Paqui, Paco y todos mis amigos y compañeros que con su ánimo y ayuda en el laboratorio permitieron que este trabajo llegara a término.

Gracias

A Félix

A Cecilia

INDICE

INTRODUCCION.....	10
Importancia del estudio genético de <i>Rhizobium</i>	11
Genética de <i>Rhizobium</i>	13
a) Transferencia genética.....	14
a.1.- Transformación.....	14
a.2.- Conjugación.....	15
a.3.- Transducción.....	16
b) Plásmidos de <i>Rhizobium</i>	17
c) Uso de mutantes para el análisis genético.....	19
c.1.- Mutagénesis química.....	20
c.2.- Mutagénesis física.....	20
c.3.- Mutagénesis con transposones.....	20
Mecanismos de reparación en <i>E.coli</i>	22
Importancia de los mecanismos de reparación del ADN.....	22
Lesiones reparables.....	22
Lesiones producidas por la radiación UV.....	23
Reparación de los daños producidos en el ADN.....	25
a) Fotorreactivación.....	27
a.1) Reparación fotoenzimática o fotorreparación....	28
b) Reparación por escisión-resíntesis.....	32
b.1.- Incisión.....	34
b.1.1.- Endonucleasa de escisión UvrABC o esci-	
nucleasa.....	34
b.1.2.- Endonucleasa específica de dímeros o UV-	
endonucleasa.....	37
b.2.- Escisión y resíntesis.....	41
b.3.- Ligación.....	44
b.4.- Interacciones entre los mecanismos de foto-	
rreparación y reparación por escisión-resín-	
tesis.....	45
b.5.- Significación general de la reparación por	
escisión-resíntesis.....	46
c) Reparación postreplicativa o por recombinación.....	47
d) Reparación SOS.....	54
d.1.- La respuesta SOS.....	55
d.2.- Regulación de la respuesta SOS.....	56
d.2.1.- La señal inductora. Activación de la	
proteína RecA.....	56
d.2.2.- Escisión de LexA y represores de fagos....	58
d.2.3.- Inducción del sistema SOS. Desrepresión	
de los genes SOS.....	59
d.2.4.- Transición del estado inducido al creci-	
miento normal.....	61
d.3.- Los genes SOS.....	62
d.4.- Las funciones SOS.....	65
d.4.1.- Reparación del ADN.....	65
d.4.2.- Mutagénesis inducida.....	66
d.4.3.- Inhibición de la división celular (fila-	
mentación).....	69

d.4.4.- Funciones de letalidad.....	69
d.4.5.- Funciones de recuperación.....	70
d.4.6.- Funciones desconocidas.....	70
d.4.7.- Inducción lisogénica.....	71
d.4.8.- Funciones SOS extracromosómicas.....	71
e) La respuesta adaptativa.....	72
f) Sistema inducible por shock por calor.....	72
Estudio de los mecanismos de reparación en <i>Rhizobium</i>	74
OBJETO DEL TRABAJO.....	76
MATERIAL Y METODOS.....	78
Razas bacterianas y bacteriófagos.....	79
Medios de cultivo.....	79
Tampones.....	82
Antibióticos y drogas.....	83
Conservación de razas de razas bacterianas.....	83
Obtención de suspensiones de fagos de alto título.....	83
Obtención de razas lisogénicas.....	84
Transparencia de los cultivos.....	85
Curvas de supervivencia.....	85
Tratamientos con mitomicina C.....	86
Obtención de mutantes sensibles al UV.....	87
Estudios de reparación con cultivos celulares.....	89
Fotorreactivación.....	89
Estudio del efecto de inhibidores.....	90
Recuperación por mantenimiento en líquido (Liquid Holding Recovery).....	90
Efecto de la temperatura.....	91
Filamentación.....	91
Determinación de la frecuencia de mutación inducida.....	92
Estudios de reparación con fagos.....	92
Curvas de inactivación de fagos.....	92
Reactivación por la célula hospedadora.....	93
Efecto de la cafeína en curvas de inactivación de fagos.....	93
Reactivación por multiplicidad de infección.....	94
Reactivación por UV o reactivación Weigle.....	94
Cinética de la reactivación Weigle.....	95
Inducción lisogénica.....	95
Cinética de la inducción lisogénica.....	96
RESULTADOS Y DISCUSION.....	97
Condiciones óptimas de irradiación. Transparencia al UV de la suspensión bacteriana.....	98
Curvas de supervivencia.....	98

Estudios de reparación.....	106
Fotorreactivación.....	106
Reparación por escisión-resíntesis.....	117
a) Experimentos con cultivos celulares.....	117
a.1) Obtención de mutantes.....	117
a.2) Efecto de inhibidores.....	119
a.3) Influencia de las condiciones de postirra- diación.....	125
a.3.1) Recuperación por mantenimiento en líquido (liquid holding recovery).....	127
a.3.2) Efecto de la temperatura.....	133
b) Experimentos con suspensión de fagos.....	135
b.1) Reactivación por la célula hospedadora.....	135
b.2) Efecto de inhibidores sobre la célula hospe- dadora.....	140
Reparación por recombinación.....	143
a) Reactivación por multiplicidad de infección.....	143
b) Recuperación en medio mínimo.....	145
c) Influencia de la novobiocina.....	148
Respuestas SOS.....	152
a) Filamentación.....	152
b) Mutagénesis.....	155
c) Efecto Weigle o reactivación por UV.....	161
d) Inducción lisogénica.....	163
Estudios con la estirpe GRP4.....	175
 CONCLUSIONES	 180
BIBLIOGRAFIA.....	182

INTRODUCCION



IMPORTANCIA DEL ESTUDIO GENETICO DE RHIZOBIUM

En áreas no alteradas, frías o débilmente iluminadas, el factor limitante para el desarrollo de los ecosistemas en ellas establecidos es la disponibilidad de fosfatos u otros nutrientes, la disponibilidad de agua, la temperatura y la luz, respectivamente. Sin embargo, en todas las demás áreas de la tierra, alteradas aunque todavía fértiles (zonas agrícolas, bosques regresionados, regiones que hayan sufrido catástrofes naturales como incendios o erupciones volcánicas) la disponibilidad de nitrógeno fijado es el factor limitante para su productividad.

La fijación del nitrógeno atmosférico puede ser resultado de tres procesos distintos:

- una fijación química, espontánea, resultado de descargas eléctricas naturales, radiaciones ultravioletas solares y fenómenos de combustión, que producen óxidos de nitrógeno. Estos son arrastrados a la corteza terrestre a través de la lluvia.

- una fijación industrial, generalmente por el proceso de Haber-Bosch, realizada para la obtención de fertilizantes nitrogenados.

- una fijación biológica, llevada a cabo por organismos procariotas fijadores de nitrógeno.

En 1976 se calculaba que de los 2×10^{10} Tm de nitrógeno fijado por año, la contribución del proceso químico suponía del 20 al 24% y la del proceso espontáneo alrededor del 10 al 13%. El resto se debe a la fijación biológica (Postgate y Hill 1979). De acuerdo con esto, la fijación biológica de nitrógeno es el principal factor determinante de la productividad de la mayoría de las áreas agrícolas y forestales de la tierra. Por otra parte, no requiere grandes costos de energía y de tecnología, de distribución ni de aplicación, como lo hace la fijación industrial. Además, el incremento de fijación biológica de nitrógeno

supone un mínimo deterioro ambiental, problema que se plantea con el incremento de los fertilizantes nitrogenados.

La fijación biológica es debida sólo a un pequeño grupo de organismos procariotas (Rev. Postgate 1978) que reducen el nitrógeno atmosférico a nitrógeno protéico o bien a amonio directamente utilizable por las plantas.

De todos los microorganismos fijadores de nitrógeno, los más importantes desde el punto de vista económico son los fijadores simbióticos, en asociación con plantas, ya que el nitrógeno que fijan es exportado casi totalmente bajo la forma de amonio a los tejidos vegetales y utilizado directamente por la planta. El nitrógeno que fijan representa más del 90% del total fijado biológicamente.

Dentro de estas asociaciones, la simbiosis mutualista establecida entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas leguminosas es la de mayor significación agronómica, por la cantidad de nitrógeno que es capaz de fijar y por la naturaleza de las plantas implicadas, que bien de forma directa (en la dieta alimentaria) o indirectamente (como forraje, alimentos más o menos transformados de animales...) son base de la alimentación humana.

Todos los estudios genéticos sobre los dos organismos implicados - leguminosas y *Rhizobium* - que lleven a una mayor comprensión de las bases de la simbiosis mutualista establecida, conducirán al mayor aprovechamiento de su totalidad potencial. Así, el conocimiento de los genes que determinan el establecimiento de una simbiosis efectiva, su localización y regulación, supone un acercamiento hacia la meta que representa una fijación más eficiente.

GENETICA DE RHIZOBIUM

Los miembros del género *Rhizobium* son responsables de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas leguminosas. Existen diversas revisiones que describen los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de infección y el desarrollo del nódulo maduro (Newcomb 1976; Beringer *et al* 1979). De forma resumida, las bacterias penetran normalmente en la planta a través de los pelos de la raíz, por el pelo curvado. En respuesta a la invasión bacteriana, la planta produce un tubo de celulosa llamado cordón de infección, que rodea a las células bacterianas, y que penetra en las células de la raíz y se ramifica. Las bacterias proliferan en el cordón y las células del interior de la corteza radical, normalmente ya diferenciadas, comienzan a dividirse, formando una región meristemática que produce un nódulo con un tamaño que oscila entre 1 y 10 mm, según la especie de leguminosa. Los nódulos son estructuras complejas altamente diferenciadas, con un sistema vascular bien establecido. Finalmente, varias ramas del cordón de infección liberan sus bacterias intracelularmente, y éstas bacterias se diferencian a bacteroides, nuevas formas típicamente pleomórficas, que han perdido parte de su pared celular y que tienen los genes de la fijación de nitrógeno desreprimidos. El amonio que es producido por ellos como consecuencia de esta fijación, pasa al citoplasma de la célula de la planta que los rodea, donde es asimilado en aminoácidos. Las células de la planta también muestran un cambio en la composición de proteína, primordialmente de leghemoglobina.

Los estudios genéticos de *Rhizobium* que datan de 1941 (Krasilnikov 1941) han alcanzado en los últimos años un desarrollo suficiente como para permitir el análisis de los genes de *Rhizobium* que determinan las funciones simbióticas, orientación primordial de todos estos



estudios, que se pueden agrupar en las siguientes áreas (Rev. Beringer et al 1980):

- a.-Desarrollo de técnicas para transferencia genética, que conduzcan al análisis genético formal del cromosoma de *Rhizobium*.
- b.-Caracterización genética y física de plásmidos, con particular referencia a su papel en la simbiosis.
- c.-Uso de variaciones genéticas naturales e inducidas para la determinación de los cambios de desarrollo que ocurren en la infección y en la nodulación.

a.- TRANSFERENCIA GENÉTICA

Los sistemas de transferencia de material genético, conjugación, transformación y transducción, han sido ampliamente aplicados al estudio genético de *Rhizobium*.

a.1.-TRANSFORMACION

Proceso por el que el ADN extraído de una bacteria donadora es tomado por la bacteria receptora, produciéndose después la recombinación e integración en su genoma.

Desde los trabajos de Krasilnikov (1941), son numerosos los estudios de transformación llevados a cabo. Sin embargo, no se ha desarrollado ningún sistema de transformación a un nivel utilizable para un mapeo a fina escala del cromosoma.

Debido al papel de los plásmidos de *Rhizobium* en la simbiosis, las transformaciones con ADN plasmídico pueden ser importantes en el futuro para el clonaje molecular de genes en *Rhizobium*.

a.2.- CONJUGACION

Es el método que se ha elegido fundamentalmente para el mapeo cromosómico en las bacterias. Este fenómeno consiste en el apareamiento de células donadora y receptora, dándose una transferencia de grandes segmentos de ADN del donador al receptor y siendo relativamente fácil detectar ligamiento entre ellos. Para que se dé la conjugación es necesaria la presencia de plásmidos autotransmisibles en el donador, tipo plásmido F de *Escherichia coli*.

En *Rhizobium*, los estudios más recientes en la transferencia cromosómica por conjugación se han realizado con plásmidos de resistencia a antibióticos del grupo de incompatibilidad P1, inicialmente identificado en *Pseudomonas*. La característica más notable de tales plásmidos es su amplio rango de hospedador entre las bacterias Gram-negativas, incluyendo varias especies de *Rhizobium*. En este género, dichos plásmidos se mantienen estables una vez transformados, y promueven la transformación de marcadores cromosómicos a frecuencias aceptables.

Para estos estudios se han utilizado fundamentalmente dos plásmidos R, el RP4 y el R68.45. Este último, aislado por Haas y Holloway (1976), puede ser transferido a alta frecuencia de *P.aeruginosa* o *E.coli* a *R.meliloti* y *R.leguminosarum*, donde moviliza el cromosoma eficientemente. Así, se han usado estos plásmidos para realizar mapas circulares de ligamiento en *R.leguminosarum* (Beringer et al 1978b), dos estirpes diferentes de *R.meliloti* (Kondorosi et al 1977; Casadesús y Olivares 1979a) y *R.trifolii* (Megías et al 1982).

Estos plásmidos R presentan también la propiedad de formar derivados con segmentos de ADN cromosómico del hospedador circunstancial, plásmidos R-prima, que pueden emplearse para estudios genéticos y para construir diploides parciales (Holloway 1978). Esta propiedad de formar R-prima ha sido utilizada tanto con material cromosómico (Kiss *et al* 1980; Julliot y Boistard 1979) como con material plasmídico (Vincze *et al* 1981).

a.3.- TRANSDUCCION

Este proceso consiste en la transferencia de ADN bacteriano por bacteriófagos. Durante el empaquetamiento, parte del ADN del bacteriófago es sustituido por ADN de la bacteria. Al ser inyectado en el nuevo hospedador, se produce una recombinación entre los segmentos homólogos del genoma.

La mayoría de los estudios sobre transducción han sido realizados en *R. meliloti*. Corral *et al* (1978) aislaron un fago virulento, el DF2, que lleva a cabo transducción generalizada, tanto de marcadores cromosómicos como plasmídicos, con frecuencia de 10^{-6} por unidad formadora de placa lítica, en la raza GR4 de *R. meliloti* (Casadesús y Olivares 1979a). Con este fago se realizó un mapeo estructural fino del mapa de ligamiento del cromosoma de esta misma raza, que había sido construido con el R68.45. Para estos estudios fue necesario añadir suero antibacteriófago que protegiese a los transductantes de la muerte por una posterior infección del fago. Posteriormente, se usaron mutantes termosensibles del bacteriófago (DF2-*tsC*) impidiendo esta posterior infección de los transductantes, por incubación de éstos a temperaturas no permisivas (Casadesús y Olivares 1979b).

Por otra parte, se ha llevado a cabo la transducción de diversos marcadores con un fago de *R. meliloti* 41, el 11 (Sik *et al* 1980). Con esta misma raza y el fago 16-3 se realizó la transducción especializa-

da de un marcador para la cisteína (Svab *et al* 1978). Recientemente se han realizado estudios de transducción generalizada en derivados de la estirpe SU47, una de las estirpes más intensamente estudiadas y resistente a los fagos anteriormente mencionados (Finan *et al* 1984; Martin y Long 1984).

Buchanan-Wollaston (1979) describió la transducción generalizada en *R. leguminosarum*. El fago utilizado, el RL38JI, era también capaz de transducir razas de *R. trifolii*.

b.- PLASMIDOS DE *RHIZOBIUM*

En todas las especies de *Rhizobium* de rápido crecimiento se han encontrado plásmidos de alto peso molecular. Sólo hay algunas excepciones dentro del grupo cowpea (Rev. Toro y Olivares 1985).

En la mayoría de las razas de *R. leguminosarum* se han encontrado más de dos plásmidos con p.m. >90 Mdal (Casse *et al* 1979b) y recientemente se han aislado plásmidos en *R. leguminosarum* con p.m. superiores a los 600 Mdal (Tichy y Lotz 1981). Las razas analizadas llevaban hasta 4 plásmidos de diferente tamaño.

En *R. meliloti*, diferentes procedimientos de aislamiento han revelado dos clases de plásmidos, los llamados pRme, de p.m. 90-250 Mdal (Casse *et al* 1979a) y el p.Sym, de p.m. mayor de 300 Mdal, sólo detectado cuando se usan procedimientos de lisis poco destructivos. Rosenberg *et al* (1981) han detectado este megaplásmido en 27 razas de *R. meliloti* de diferentes orígenes geográficos y también en razas en las que no se había detectado ningún plásmido por el procedimiento de la desnaturalización alcalina (Casse *et al* 1979a). Recientemente se ha encontrado un plásmido pequeño de ≈ 7.3 Kb. en una raza de *R. meliloti*,

la M19S (Facon et al 1984), plásmido que por sus características podría ser utilizado como vector apropiado para clonaje en *Rhizobium*.

También en *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* y *Rhizobium* del grupo cowpea se han aislado plásmidos de distintos tamaños, hasta 200 Mdal. (Rev. Toro y Olivares 1985).

Uno de los hechos más interesantes de la fijación de nitrógeno simbiótico es la localización generalizada de los genes simbióticos, incluyendo los genes *nif* codificadores de la nitrogenasa, en los plásmidos grandes de *Rhizobium* (Rev. Ausubel 1982; Toro y Olivares 1985).

La primera evidencia de que genes responsables del establecimiento de la simbiosis estuvieran localizados en plásmidos, la obtuvo Higashi (1967), quien aisló de un cruce entre *R. trifolii* y *R. phaseoli* transconjugantes de este último capaces de nodular trébol. Se supuso que por conjugación se había transferido a *R. phaseoli* un factor responsable de la nodulación de *R. trifolii*. Estudios posteriores confirmaron esta hipótesis.

Así, se ha visto que los genes *nod* y *fix* (responsables de la nodulación y fijación del nitrógeno) están localizados en plásmidos tanto en *R. leguminosarum* (Buchanan-Wollaston et al 1980) como en *R. trifolii* (Hoykaas et al 1981). En *R. meliloti* Rosenberg et al (1981) y Bánfalvi et al (1981) describieron que los genes de la nodulación y los genes *nif* están localizados en el plásmido de más de 300 Mdal. en las estirpes L5-30 y Rm41, respectivamente. Este hecho de que los genes estructurales *nif* estén localizados en el megaplásmido es confirmado en otras estirpes de *R. meliloti* aisladas de diferentes orígenes geográficos (Rosenberg et al 1981). Por su parte, Forrai et al (1983), localizaron genes *fix* en *R. meliloti* 41, tanto en el cromosoma como en el megaplásmido.

En algunas razas de *Rhizobium* el hidrógeno liberado en los bacteroides por la nitrogenasa, como consecuencia de la reducción de H^+ concomitante con la de nitrógeno, es reciclado gracias a una enzima llamada hidrogenasa, con la consiguiente recuperación de ATP (genotipo *hup*). Estos genes *hup* también se han localizado en plásmidos en *R. leguminosarum* ligados a los genes *nod* y *fix* (Brewin et al 1980). También se han asociado a los plásmidos diferentes funciones relacionadas con la especificidad de hospedador, la infectividad, sensibilidad a bacteriófagos, producción de polisacáridos de la pared celular, producción de pigmentos, etc. (Rev. Beringer et al 1980; Toro y Olivares 1985).

c.- USO DE MUTANTES PARA EL ANALISIS GENETICO

Los análisis genéticos de las vías metabólicas en microorganismos se han visto facilitados por la disponibilidad de estirpes mutantes defectivas en diferentes pasos de la vía metabólica, o en su regulación.

También en *Rhizobium* se ha intentado analizar el papel que desempeña en la simbiosis por los mismos procedimientos, y en consecuencia, se han obtenido diversidad de mutantes con distintos métodos: mutagénesis química, mutagénesis física o con el empleo de transposones.

Los mutantes seleccionados han sido normalmente resistentes a drogas, a bacteriófagos, auxótrofos y deficientes en algún paso del metabolismo del carbono y del nitrógeno, y mutantes termosensibles. Con dichos mutantes se han realizado mapeos cromosómicos de varias especies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum* (Beringer et al 1978b), *R. meliloti* (Kondorosi et al 1977; Meade y Singer 1977; Casadesús y Olivares 1979a), *R. trifolii* (Megías et al 1982), o bien se ha tratado de establecer una relación entre la función alterada y algún paso del proceso simbiótico (Rev. Beringer et al 1980).



c.1.- MUTAGENESIS QUIMICA

Casi todos los mutágenos químicos utilizados con otros microorganismos se han aplicado a *Rhizobium*: etil-metanosulfonato (EMS), ácido nitroso, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), naranja de acridina, etc. De todos los mutágenos probados, la MNNG parece ser generalmente la más efectiva, en términos del número de mutantes producido y el rango de estirpes susceptible a la misma (Walton y Moseley 1981a; Beringer et al 1984).

c.2.- MUTAGENESIS FISICA

La luz ultravioleta, radiación gamma, y la incubación a elevadas temperaturas se han venido aplicando también con el fin de obtener mutantes. El proceso de incubación a altas temperaturas da lugar a la pérdida completa de algún plásmido o bien a deleciones en los mismos (Zurkowski 1982).

c.3.- MUTAGENESIS CON TRANSPOSONES

Los transposones son secuencias de ADN definidas, incapaces de replicarse por sí mismas, que pueden insertarse en otras secuencias de ADN, algunas veces al azar. Su inserción determina reordenamientos en el material genético del tipo de deleciones, inversiones, duplicaciones, fusión de replicones y amplificación de secuencias del ADN. Estos elementos genéticos móviles causan la inactivación de genes por simple inserción. Algunos transposones llevan genes de resistencia a drogas, de modo que al ser usados como mutágenos, se puede obtener la inserción estable en el ADN bacteriano, seleccionando las bacterias resistentes a la droga. Las mutaciones que producen se hacen así reconocibles, tanto genética como físicamente (por hibridaciones con sondas radioactivas, análisis de heterodúplex o mapeo de fragmentos de restricción), de modo que se pueden mapear genéticamente y clonar.

La mutagénesis con transposones ha sido uno de los métodos más eficaces en *Rhizobium* (Walton y Moseley 1981a). En los diferentes trabajos, el transposón más útil ha sido el Tn5, que confiere resistencia a la kanamicina y neomicina (Beringer *et al* 1978a; Kondorosi y Johnston 1981; Denarié *et al* 1981). El Tn1 que confiere resistencia a la ampicilina también ha sido utilizado (Casadesús *et al* 1980) pero la expresión de niveles suficientemente altos de resistencia y de frecuencias de transposición han sido difíciles de detectar en algunas especies de *Rhizobium*.

Los plásmidos pueden ser transferidos entre *Rhizobium* y *E.coli* y es posible por ello, inducir mutaciones en el ADN de *Rhizobium* en *E.coli* usando técnicas desarrolladas en este microorganismo. Ruvkum y Ausubel (1981) describieron la técnica de mutagénesis dirigida en ADN de *Rhizobium*, clonándolo previamente, mutándolo en *E.coli* y retornando el ADN ya mutagenizado a *Rhizobium*. Una vez introducido, se recombina con el ADN correspondiente del hospedador, reemplazando los genes de la cepa silvestre. Teóricamente es posible inducir mutaciones suficientemente cerca unas de otras como para tener una alta posibilidad de identificar todos los genes que están ligados y cuya función puede ser identificada.



MECANISMOS DE REPARACION EN *E. coli*

IMPORTANCIA DE LOS MECANISMOS DE REPARACION EN ADN

Debido al papel fundamental que para la vida tiene el ADN, y al hecho de que está presente en cada célula en sólo una, o como mucho, en unas pocas copias, el daño que se le ocasiona tiene implicaciones mucho más serias para la integridad funcional que el que pudiera sufrir el resto de los componentes celulares. Por su naturaleza química y su gran tamaño, el ADN cromosómico es particularmente susceptible al ataque exógeno por agentes físicos y químicos. Las reacciones con éstos pueden resultar en roturas de cadena, o en alteraciones y distorsiones locales en su conformación. La preservación de la estructura única tridimensional de la hélice del ADN de doble cadena parece ser requisito imprescindible para su actividad biológica. La alteración de las bases que lo componen, y la concomitante distorsión de la hélice pueden llevar a la inhibición de la replicación, de la transcripción y al deterioro de la fidelidad, así como a una parada en la regulación de estos procesos. La restauración de la integridad estructural del ADN por procesos de reparación es, por tanto, una función vital para cada célula, que debió aparecer presumiblemente en los primeros estadios de la evolución como se puede deducir de la distribución universal de dichos procesos de reparación en las células vivas.

LESIONES REPARABLES

Se define lesión o daño como cualquier modificación del ADN que altera sus propiedades codificadoras o su normal funcionamiento en replicación o transcripción. Para ser reparables, las lesiones deben ser reconocidas por una proteína que pueda iniciar una secuencia de reacciones bioquímicas que lleven a su eliminación y a la restauración de la estructura intacta del ADN.

Parece probable que lesiones que compartan características semejantes, sean procesadas por las mismas vías de reparación, y no por sistemas reparadores específicos para cada lesión individual introducida. En base a esto, se han hecho clasificaciones de las lesiones según los agentes productores del daño, según la estructura de dichas lesiones (Cerutti 1975), o según los sistemas de reparación que actúen sobre ellos (Lindahl 1979). Ahora bien, estas clasificaciones no han resultado demasiado útiles, ya que un mismo mecanismo de reparación puede procesar varios tipos de lesiones, un mismo agente puede ocasionar diferentes alteraciones en el ADN y un tipo de lesión puede a su vez ser producida por varios agentes químicos o físicos.

LESIONES PRODUCIDAS POR LA RADIACION UV

De los distintos agentes físicos y químicos que pueden dañar el ADN, la luz UV ha sido la más extensa e intensamente estudiada. Los mecanismos de reparación de los daños ocasionados por ella han sido casi exclusivamente realizados dentro del campo microbiológico en *E. coli*, si bien en los últimos años estos estudios se han ido extendiendo a otros microorganismos.

Las lámparas de UV germicidas usadas de forma habitual en los distintos trabajos emiten a 254 nm fundamentalmente, e inducen una gran variedad de fotoproductos. De éstos, los dímeros de pirimidina en anillo ciclobutilo (dipirimidín 5,6 ciclobutilos), son los más comunes y mayoritarios (Rahn 1979). Estos dímeros se forman en una molécula de ADN de doble cadena a partir de dos pirimidinas adyacentes situadas en la misma cadena (lesión bifuncional intracatenaria), originando un reordenamiento sustancial de la conformación y de ahí, una distorsión local considerable en la hélice de ADN. Los dímeros de pirimidina pueden ser de los siguientes tipos: timina-timina (T<>T), timina-citosina (T<>C), citosina-citosina (C<>C). Considerando la polaridad del ADN, el dímero citosina-timina (C<>T) formaría un cuarto tipo distinguible del

T<>C. Estos dímeros se forman sólo en configuración cis-syn, en el ADN de doble cadena; en el de cadena sencilla también se puede dar en configuración trans-syn.

Al formarse el anillo ciclobutilo, el doble enlace 5,6 de las pirimidinas se pierde. Esto repercute en el espectro de absorción, distinto para los dímeros y las pirimidinas constituyentes y ha supuesto un instrumento eficaz para el estudio de los efectos de la radiación UV así como para el estudio de su reparación.

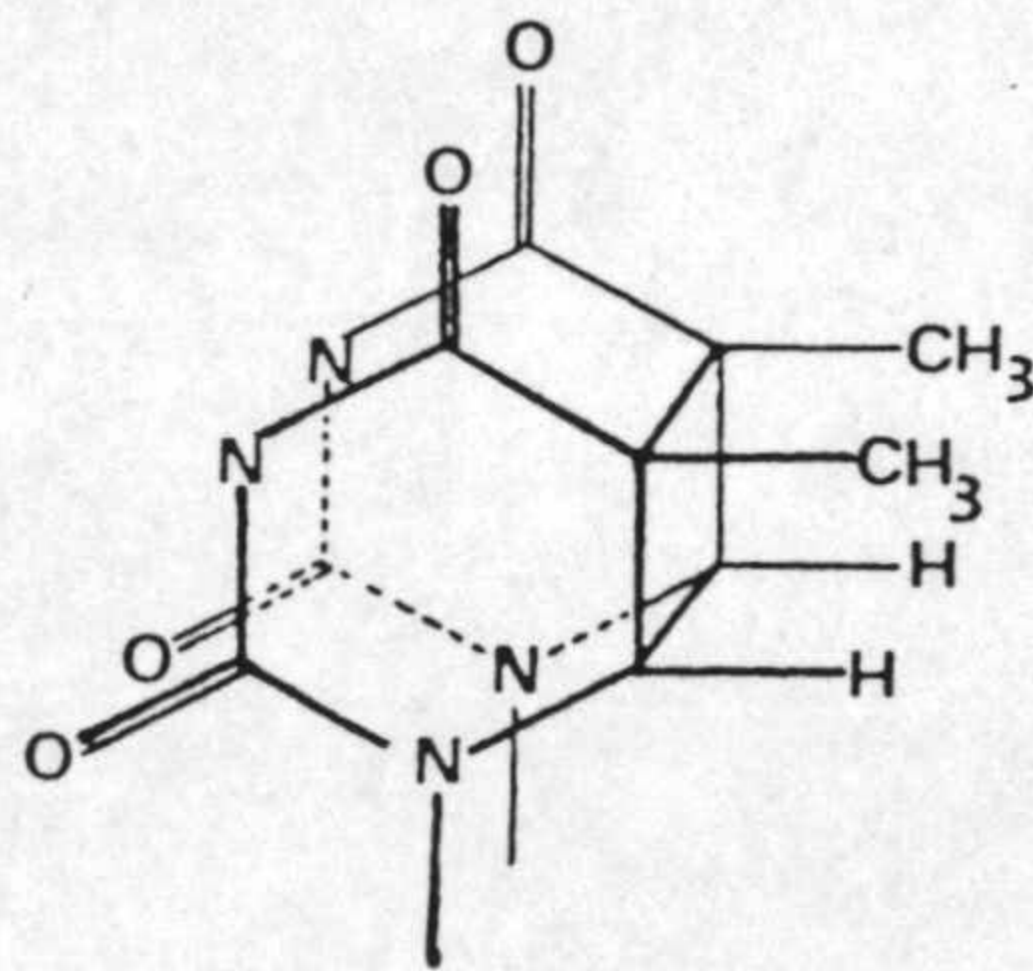


Figura A.- Dímeros de timina en configuración cis-syn.

Un segundo producto mayoritario se forma también entre pirimidinas adyacentes de la misma cadena (lesión bifuncional intracatenaria) y lo constituyen los aductos de pirimidinas, de los cuales el más conocido es el 6-[4'-(pirimidina-2'-ona)]timina, también llamado Pyc o Thy-(6-4)-Pyc. La frecuencia de estos aductos es de 1/10 de la de los dímeros de pirimidina (Franklin *et al* 1982), si bien en ciertas secuencias nucleotídicas del ADN, la formación de estos productos excede la de los dímeros ciclobutilo (Brash y Haseltine 1982). Este producto

es lábil a los álcalis y se piensa que se trata de una lesión premutagénica (Brash y Haseltine 1982).

Otro fotoproducto del UV, también dipirimidínico, es el fotoproducto de la espora. Este no ha sido encontrado en células vegetativas sino en esporas bacterianas, donde son los fotoproductos predominantes.

Por último, fotoproductos de menos, aunque de posible importancia biológica, son los entrecruzamientos ADN-proteína, los hidratos de pirimidina, rotura de las cadenas de ADN (que suponen entre 1/300 y 1/1000 de la formación de los dímeros de pirimidina en *E.coli*) y los entrecruzamientos intercatenarios, que se dan con la misma frecuencia que la rotura de una las cadenas del ADN (Harm 1980).

REPARACION DE LOS DAÑOS PRODUCIDOS EN EL ADN

La eficacia con que *E.coli* repara el daño producido por la radiación UV en sus cromosomas, así como por otros agentes, sugiere la presencia de potentes sistemas celulares de reparación. Esto ha llevado al estudio intensivo en esta bacteria de los mecanismos de reparación de los daños ocasionados por esta radiación en primer lugar y por otros agentes posteriormente. Poco a poco dichos estudios se van ampliando a otros microorganismos, que presentan tanto similitudes como diferencias con *E.coli*. También son notables los estudios realizados con cultivos de tejidos humanos, si bien esto queda fuera del ámbito de este estudio.

Para reparar todos estos daños ocasionados por agentes extraños, las células han desarrollado una amplia variedad de estrategias conceptualmente diferentes para reparar el ADN de la forma más exacta posible (Rev. Hanawalt *et al* 1979 y Lindahl 1982).



En primer lugar, los mecanismos más simples son los que revierten el daño sin necesidad de síntesis de cualquier nuevo enlace fosfodiéster, como son la fotorreactivación de dímeros de pirimidina que son inducidos por radiación UV y la eliminación por la O⁶-alquil-metilguanina-ADN-transferasa del grupo metilo de O⁶-metilguanina, producida por nitrosoguanidina o metil-nitrosourea.

En segundo lugar, el mecanismo de reparación por escisión-resíntesis aprovecha el hecho de que la información en el ADN está presente en dos copias, como consecuencia de la naturaleza de doble cadena complementaria. Este mecanismo introduce una incisión en la cadena dañada o cerca del lugar de la lesión, escinde un fragmento que incluye el daño, el ADN que falta es resintetizado usando la otra cadena como molde y finalmente éste es ligado a la cadena preexistente.

Por último, la reparación postreplicativa es un mecanismo de reparación que incluye un intercambio por recombinación de cadenas homólogas, una dañada y otra no. Parece ser un mecanismo de tolerancia más que de reparación, para tratar los huecos generados en las cadenas hijas cuando la horquilla de replicación en avance encuentra lesiones no reparadas en el ADN (Rupp y Howard-Flanders 1968). En principio, este proceso al igual que los anteriores, está libre de error, o al menos algunos de sus posibles caminos de actuación no originan la introducción de mutaciones.

Por otra parte, todas las lesiones en el ADN suponen un serio desafío a la célula por las posibilidades a que da lugar de producir mutaciones o conducir a la muerte celular. En este sentido, en *E. coli* las lesiones pueden ser consideradas de dos tipos en orden al proceso necesario para producir mutaciones.

Por un lado están las lesiones que pueden causarlas por el simple fallo en la complementación durante la replicación normal del ADN.

Constituyen un apartado minoritario y se puede citar como ejemplo la O⁶-metilguanina (Drake y Baltz 1976; Loeb y Kunkel 1982).

Por otro, las que parecen requerir la participación de un sistema especial inducible para producir mutaciones. Esta segunda clase es mucho mayor, e incluye lesiones como las inducidas no sólo por la radiación UV, sino también por el metil-metano-sulfonato, mitomicina C, 4-nitroquinolina-1-óxido, aflatoxina B1, etc. Este sistema inducible se conoce como sistema SOS o procesamiento SOS (Radman 1975; Witkin 1976; Walker 1984 y 1985; D'Ari 1985). En *E. coli* al menos, hay tres redes regulatorias diferentes de genes cuya expresión es inducida en respuesta a tratamientos con agentes que dañan al ADN; el sistema SOS, la respuesta adaptativa y el sistema de shock al calor (Rev. Walker 1984 y 1985). Los productos de estos genes tienen diferentes papeles en la reparación exacta del ADN, en el proceso SOS y otros procesos no necesariamente relacionados con la reparación del ADN y la mutagénesis.

a.- FOTORREACTIVACION

El estudio del fenómeno de la fotorreactivación fue iniciado en los años 30, cuando Hollaender y Claus indicaron la existencia de una recuperación celular del daño producido por radiación UV en presencia de luz visible. Esta recuperación fue caracterizada años más tarde como un proceso concreto y controlable, por Kelner (1949) en bacterias y Dulbecco (1949) en fagos.

Posteriormente, en los sesenta, Jagger (1967) definió el fenómeno de fotorreactivación como "una disminución en la respuesta de un sistema biológico a la irradiación de UV lejano, como resultado de un tratamiento posterior o concomitante con una radiación no ionizante". Ahora bien, a esta definición de fotorreactivación se ajustan varios tipos de procesos: la reparación fotoenzimática, la fotorreactivación indirecta y la monomerización fotoquímica de los dímeros de pirimidi-

na. De estas tres, la primera es con mucho la más importante y mayoritaria, y a ella se va a dedicar mayor atención. La segunda, recoge los efectos debidos a la reparación por oscuridad estimulada por la luz, que induce en las células cambios fisiológicos que se traducen en esta fotorreactivación indirecta. Por último, el tercer proceso, un fenómeno fotofísico, es de mucha menor relevancia a nivel de reactivación biológica (Harm 1980).

a.1.- REPARACION FOTOENZIMATICA O FOTORREPARACION

Este mecanismo enzimático cataliza la conversión directa de un dímero a sus pirimidinas constituyentes, en una reacción que depende de la luz, hecho éste que la hace notable y distinguible de las demás.

En un principio, como se ha dicho, se conoció como un fenómeno biológico de "recuperación". Las células expuestas a la luz visible después de la irradiación con luz UV, mostraron mayor nivel de supervivencia que las mantenidas en oscuridad. Así, los primeros investigadores examinaron la fotorreactibilidad en un enorme rango de organismos irradiados con UV lejano, tanto procariotes como eucariotes. Se vió que el fenómeno de fotorreactivación es ubicuo en su distribución, apareciendo desde micoplasmas, la bacteria más pequeña, hasta células de animales, como leucocitos humanos, si bien están ausentes en otros, como las bacterias naturalmente transformables, incluyendo *Bacillus subtilis* (Sutherland 1981).

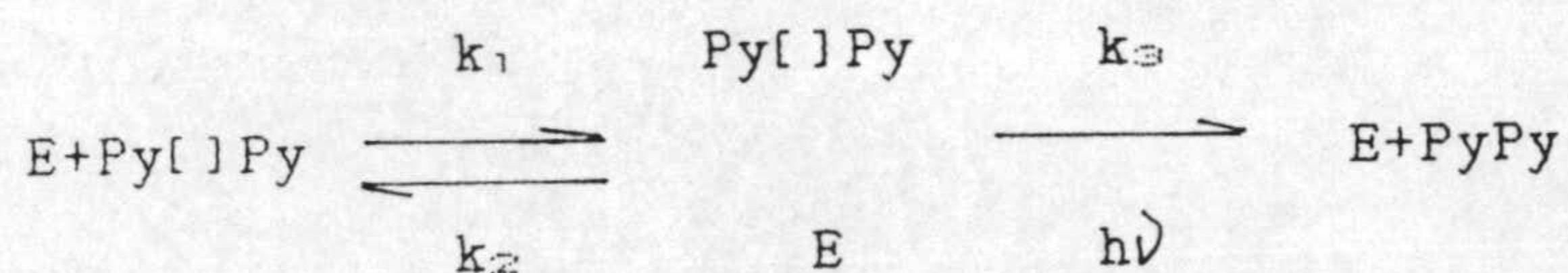
La primera visión real de la base molecular de la fotorreparación proviene de los trabajos pioneros de Goodgal *et al* en 1957, en los que mostraron mediante el ensayo de ADN transformante de *Hemophilus influenzae*, que la reacción de fotorreparación estaba mediada por una enzima fotorreactivante. Esta seguía una cinética de Michaelis-Menten en sus dos acciones de formación de un complejo enzima-sustrato con ADN irradiado con radiación UV como sustrato, y en la reparación de

este ADN por exposición a la luz visible (Rupert 1962a y b). Previamente se había mostrado que la reversión directa por radiación UV de los dímeros no era el mecanismo base de la fotorreactivación biológica.

Estudios posteriores en el campo de la fotoquímica y fotobiología de los ácidos nucleicos llevaron a la definición del papel de la enzima en la fotorreactivación, su sustrato y su producto, y proporcionaron la base para el estudio bioquímico y biofísico de la enzima. Las características mayoritarias son compartidas por todas las enzimas fotorreactivantes caracterizadas hasta la fecha, aunque las estructuras y mecanismos de fotólisis del dímero de las enzimas de los diferentes organismos pueden variar considerablemente.

La fotorreparación enzimática es, por tanto, catalizada por una enzima denominada fotoliasa del ADN (EC.4.1.99.3), deoxirribodipirimidina fotoliasa o enzima fotorreactivante (PRE).

La reacción tiene lugar a través de dos pasos: formación del complejo enzima-sustrato y la reacción de fotólisis dependiente de la luz. Esta puede representarse por:



Como grupo, las fotoliasas se caracterizan por dos aspectos importantes:

a) El único sustrato de estas enzimas son los dímeros ciclobutilos de pirimidina, en su configuración cis-syn, formados entre dos pirimidinas adyacentes en la misma cadena de ADN por la exposición a la radiación UV en un rango de 220 a 320 nm. En adición a esta configuración

determinada, la enzima requiere que el dímero sea parte de un polímero de ácido deoxirribonucleico de al menos 10 bases. Estos dímeros constituyen el fotoproducto mayoritario de la irradiación con radiación UV.

b) El complejo enzima-sustrato, debe formarse ANTES o DURANTE la exposición a luz fotorreactivante.

La formación del complejo enzima-sustrato en un paso independiente de la luz. La exposición de dicho complejo a luz próxima a 300-600 nm (luz fotorreactivante) provoca la conversión enzimática de los dímeros a los monómeros de pirimidina que los constituyen. El máximo exacto y el rango de luz fotorreactivante varían entre las distintas enzimas. El límite inferior de alrededor de 300 nm probablemente sea consecuencia de la capacidad en aumento, a longitudes de onda más cortas, de formar dímeros de pirimidina por absorción directa del ADN. El máximo de longitud de onda en el rango de luz fotorreactivante depende de la absorción del cromóforo de la enzima, si es intrínseco a la holoenzima, o bien de la absorción inducida por la formación del complejo. La enzima no puede utilizar otras fuentes de energía alternativas para la reacción catalítica.

Los estudios de la cinética de la reacción han sido llevados a cabo en experimentos "in vitro" con preparaciones de enzimas parcial o totalmente purificadas. Frecuentemente la purificación en su mayor grado se ha visto dificultada por la labilidad de la enzima, tanto en extractos como en preparación purificada, así como por la presencia de un número muy bajo de copias por célula (10-20 moléculas de fotoliasa activa/cél. en *E. coli*) (Harm et al 1968). No obstante, han sido purificadas hasta una aparente homogeneidad las fotoliasas de *E. coli*, *Streptomyces griseus*, levaduras, cyanobacterias y organismos superiores, incluyendo humanos (Rev. Sutherland 1981). En algunos sistemas, como

levaduras, hay dos enzimas distintas. El tamaño, espectro de acción y otras características varían entre ellas.

En lo que respecta a *E. coli*, un primer método de purificación desarrollado por Sutherland *et al* en 1973 , y otro posterior desarrollado por Snapka y Sutherland en 1980 , llevaron a la obtención de una proteína aparentemente homogénea de p.m. 35000, que carece de triptófano y otros aminoácidos aromáticos, y que contiene una cantidad variable de carbohidratos y unos 10-15 nucleótidos de ARN. Sin embargo, en los últimos años, Sancar *et al* (1983) han desarrollado técnicas de amplificación en la producción de fotoliasa (hasta 15000 veces) y han purificado (Sancar *et al* 1984c) y secuenciado la proteína así como el gen que la codifica (Sancar *et al* 1984b). Asimismo se ha mapeado el gen *phr* :16'2 minutos del mapa de ligamiento revisado de *E. coli* (Bachmann 1983).

La enzima así obtenida es un monómero de peso molecular 49000, con 471 aminoácidos, que desarrolla las propiedades de fotoliasa con una actividad 1000 veces superior a la enzima aislada por Snapka y Sutherland. Se trata de una flavoproteína con FAD como cofactor en unión no covalente (Sancar y Sancar 1984b), por lo que se denomina fotoliasa F para distinguirla de la aislada por Snapka y Sutherland, a la que denominan fotoliasa R. Presenta una tasa de recambio de 2,4 dímeros/molécula de fotoliasa/min, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos por Harm "in vivo" (1970) en *E. coli* B_{m-1}.

En la actualidad, los últimos trabajos en desarrollo van destinados a esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la unión enzima-sustrato, la conversión de la energía luminosa a energía química necesaria para la ruptura del anillo ciclobutano, y subsecuente liberación del producto, y los mecanismos de regulación del proceso.

b.- REPARACION POR ESCISION-RESINTESIS

El conocimiento de este mecanismo de reparación arranca de los años 50 cuando Garen y Zinder (1955) descubrieron que la inactivación por UV del fago P22 de *Salmonella* mostraba una estrecha dependencia de las condiciones de las células hospedadoras. Si los fagos irradiados infectaban células no irradiadas, su supervivencia era considerablemente mayor que si lo hacían sobre células a su vez fuertemente irradiadas con UV o con rayos X.

Este fenómeno, denominado reactivación por la célula hospedadora (HCR, del inglés host-cell reactivation) es observado normalmente en fagos moderados (P22, lambda, y muchos otros) y moderadamente virulentos como el T1, T3 y T7, pero no en los altamente virulentos como los T pares y el T5. Tampoco ocurre en los fagos que contienen ADN de cadena simple o ARN.

En principio se pensó que este mecanismo de reactivación HCR se debía a un fenómeno de recombinación genética entre el fago y una región homóloga del cromosoma bacteriano. Sin embargo, se encontró que la estirpe B₅₅₋₁ de *E. coli*, un mutante muy sensible a la radiación UV, carecía de la capacidad de reactivar los fagos infectantes. Se vió asimismo que otros mutantes aislados, que eran también incapaces de la HCR, eran igualmente muy sensibles al UV. Esto mostraba de forma evidente que el factor responsable de la reactivación de los fagos en la célula hospedadora, lo era también de la reactivación del daño producido por la radiación UV en el propio cromosoma bacteriano. Los mutantes aislados carecían de este factor, siendo por ello más sensibles a la radiación e incapaces de la HCR.

La búsqueda de este tipo de mutantes bacterianos sensibles al UV e incapaces de llevar a cabo la HCR y el estudio de los efectos de la radiación UV sobre estos mutantes llevaron a Setlow y Carrier por un

lado y a Boyce y Howard-Flanders por otro, en 1964, al descubrimiento de este mecanismo de reparación, por el cual tenía lugar la escisión y eliminación, desde el ADN dañado, de los dímeros producidos por la radiación UV. Este mecanismo celular fundamental de reparación en oscuridad, de gran importancia no sólo en procariotes, sino también en organismos superiores, incluido el hombre, ha sido llamado por eso reparación por escisión-resíntesis o simplemente reparación por escisión.

Los diferentes trabajos (genéticos, bioquímicos y enzimáticos) que desde entonces se han realizado, se han dirigido hacia el esclarecimiento del modo de acción de este mecanismo, identificación y clonación de los genes involucrados, purificación de las proteínas por ellos codificadas, estudios "in vivo" e "in vitro" que aporten más detalles del modo de acción concreto, etc.

El mecanismo de reparación por escisión-resíntesis, como se indicó anteriormente, aprovecha el hecho de que la información genética está presente en dos copias, como consecuencia de la naturaleza de doble cadena del ADN y su complementariedad. En primer lugar, una incisión es introducida en la cadena dañada en o cerca del lugar de la lesión (INCISION), y un fragmento que incluye la lesión es escindido (ESCISION). El ADN que falta es resintetizado, usando la cadena opuesta, no dañada, como molde (RESINTESIS DE REPARACION). Por último, este nuevo material sintetizado es integrado a la molécula de ADN a través de una unión covalente (REUNION O LIGACION) (Rev. Hanawalt et al 1979; Lindahl 1982).

Evidentemente, el mecanismo de reparación por escisión es más complejo que el de fotorreparación, ya que incluye, al menos, cuatro actividades enzimáticas distintas que deben llevarse a cabo de forma coordinada.

b.1.- INCISION

Puede ser resultado de dos actividades enzimáticas distintas:

b.1.1.- Endonucleasa de escisión UvrABC o escinucleasa.

b.1.2.- UV-endonucleasa o T4-endonucleasa-V; con dos actividades secuenciales: glicosilasa específica del daño y endonucleasa apurínica/apirimidínica (AP).

b.1.1.- ENDONUCLEASA DE ESCISION UVRABC O ESCINUCLEASA

La vía mayoritaria de escisión-resíntesis en *E. coli* se inicia con los productos de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*. Estos tres genes, físicamente no ligados en el cromosoma bacteriano, fueron originalmente identificados como *loci* que son requeridos conjuntamente para la escisión "in vivo" de los dímeros de timina del ADN dañado por UV, así como para la escisión de otras lesiones producidas por agentes químicos como mitomicina C, óxido-4-nitroquinolina, psoraleno más luz UV próxima y diclorodiamina de platino (Howard-Flanders *et al* 1966).

Mutaciones sencillas en cualquiera de estos genes hacen a las células extremadamente sensibles a los citados agentes y las incapacita para eliminar de forma eficiente las lesiones producidas (Franklin y Haseltine 1984).

A lo largo de los últimos años, experimentos "in vivo" y con extractos de *E. coli*. han puesto de manifiesto la implicación de los productos de estos tres genes, las proteínas UvrA, UvrB y UvrC en la actividad de incisión de la cadena de ADN. Sin embargo, la purificación desde tales extractos de un complejo enzimático activo formado por dichas proteínas ha resultado hasta ahora infructuosa. Por otra parte, sólo ha sido posible recientemente aislar e identificar de for-



ma inequívoca las proteínas individuales que llevan a cabo este paso, en cantidades suficientemente grandes como para permitir el análisis bioquímico "in vitro".

Así, Sancar *et al* (1981a y b; 1982) y Yoakum y Grossman (1981), obtuvieron los productos de estos genes y determinaron su p.m., siendo de 114000 para UvrA, 84000 para UvrB y 70000 para UvrC.

Las proteínas UvrA y UvrB son las que reconocen de forma específica y se unen a la región que contiene el dímero, en una reacción conducida por la UvrA mediante hidrólisis de ATP (Seeberg 1978 y Yeung *et al* 1983). La UvrA se une al ADN de cadena sencilla (Seeberg y Steinum 1982) mientras que la UvrB se une al complejo UvrA-ADN, posiblemente aumentando la condición de cadena sencilla parcialmente creada por la distorsión (Sancar *et al* 1984a). Los mutantes *uvrA* (*uvrA6*) y *uvrB* (*uvrB5*) no son capaces de producir incisión alguna en el ADN, ni "in vivo" ni "in vitro".

La proteína UvrC se une también al ADN de cadena simple (Sancar *et al* 1981a). sin embargo, a diferencia con los anteriores, los mutantes *uvrC34* y *uvrC56*, son capaces de producir "in vivo" incisiones en el ADN dañado, incisiones específicas para los dímeros, si bien en menor proporción y más lentamente que las estirpes *uvr+*, pero por el contrario, no pueden escindir dichos dímeros (Seeberg y Rupp 1975; Sharma y Moses 1979; Tang y Ross 1985). Se ha atribuido a la UvrC la función de impedir la ligación de la incisión producida (Grossman *et al* 1975) permitiendo los pasos siguientes de escisión y resíntesis. Los mencionados mutantes presentarían una proteína UvrC defectiva que actuaría con las UvrA y UvrB intactas, dándose el paso de incisión pero no la escisión, y las roturas de cadena sencilla observadas representarían entonces el equilibrio entre la incisión y ligación en el lugar de los dímeros (Tang y Ross 1985).

"In vitro" es necesaria la función colectiva de los tres productos para la incisión y escisión de los dímeros. La combinación de dos productos o la presencia de uno sólo no es suficiente para dicha incisión (Seeberg 1978). "In vitro" las proteínas UvrA, UvrB y UvrC forman un complejo muy estable (Lorensen *et al* 1984; Yeung *et al* 1983; Sancar y Rupp 1983), la nucleasa de escisión UvrABC o escinucleasa, que lleva a cabo una reacción de incisión que requiere la presencia de Mg^{++} y ATP.

La escinucleasa reconoce la distorsión helicoidal causada por los dímeros y otros aductos. Se une al ADN y provoca dos cortes, uno en el octavo enlace fosfodiéster del lado 5' del dímero (produciendo terminales 5'-P) y otro en el cuarto o quinto enlace fosfodiéster del lado 3' del dímero, produciendo terminales 3'-OH. Ambas incisiones generan un fragmento de ADN de cadena sencilla de 12 ó 13 nucleótidos que lleva el dímero de pirimidina.

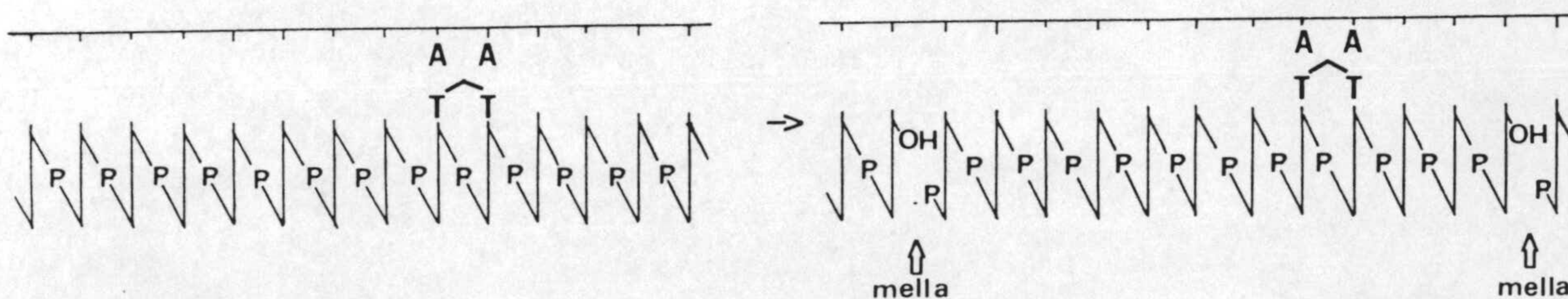


Figura B.- Mecanismo de acción de la escinucleasa UvrABC en la incisión de los dímeros de pirimidina.

Los sitios de incisión están alejados el uno del otro por aproximadamente una vuelta de doble hélice, lo que sugiere que la enzima se une al ADN por la cara de la hélice que no incluye las dos pirimidinas que forman el dímero.

El mecanismo molecular de acción de UvrABC debe ser aún resuelto por el análisis de los aminoácidos específicos en contacto con los nucleótidos cuando el complejo enzimático se une al ADN, así como la determinación de los sitios de unión entre las tres proteínas Uvr. Para ello se requiere primero el conocimiento de la secuencia primaria de las proteínas. En esta dirección se encaminan gran parte de los trabajos en desarrollo en los últimos años (Sancar et al 1984b).

b.1.2.- ENDONUCLEASA ESPECIFICA DE DIMEROS O UV-ENDONUCLEASA

En *E. coli* infectado por el bacteriófago T4, la reparación de los dímeros parece deberse a una ADN-glicosilasa (Radany y Friedberg 1980; Demple y Linn 1980 y Nakabeppu y Sekiguchi 1981). La enzima responsable de este proceso es codificada por el gen V del fago T4, y se trata de una cadena polipeptídica de bajo p.m. (16000), la T4 endonucleasa V

Por otra parte, en *Micrococcus luteus*, en el que no se ha identificado ningún sistema de reparación semejante al UvrABC, el inicio de la reparación de los dímeros tiene lugar por la actuación de otra ADN-glicosilasa específica para dichos dímeros, la UV-endonucleasa. Esta es una enzima también formada por una sola cadena polipeptídica, de bajo p.m. (18000) y resistente al EDTA.

Estas enzimas presentan dos actividades distintas asociadas:

i.- Actividad N-glicosilasa, que rompe el enlace 5'-N-glicosil entre la pirimidina 5' de un dímero y el azúcar correspondiente, generándose un lugar 3' apirimidínico y un dímero 5'timina-timidilato.

ii.- Actividad AP-endonucleasa, asociada a la anterior, que rompe el enlace 3' del lugar AP (apurínico/apirimidínico) recientemente creado. Genera términos 5'-OH y 3'-P; es por tanto una AP-endonucleasa, clase I (Haseltine *et al* 1980; Gordon y Haseltine 1980; Demple y Linn 1980; Seawell *et al* 1980).

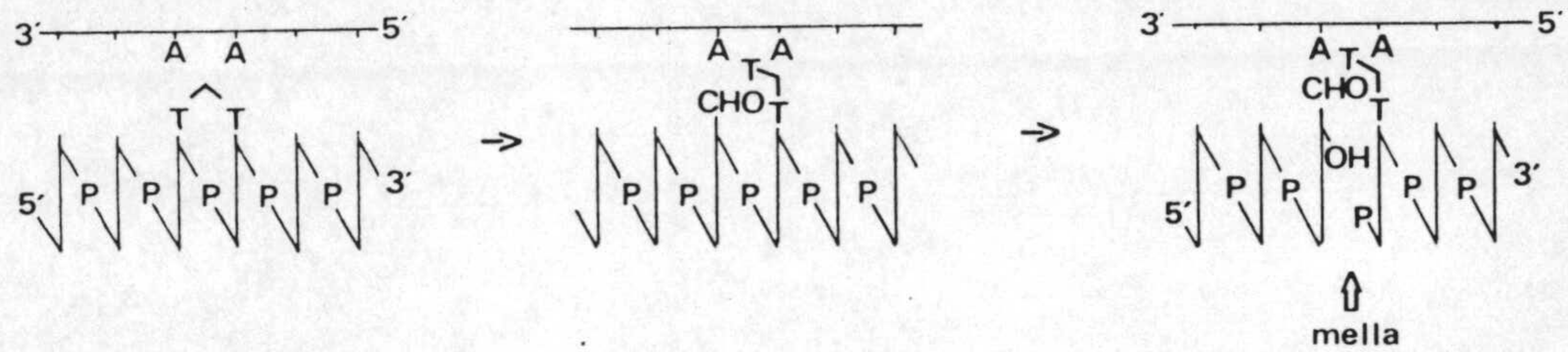


Figura C.- Mecanismo de acción de la UV-endonucleasa en la incisión de los dímeros de pirimidina.

Estos dos pasos originan la formación de mellas que contienen una deoxirribosa fosfato en el terminal 3' y un dímero ciclobutano timina-timidilato en el 5'. El fosfoazúcar 3' que queda como término no es sustrato para las ADN polimerasas (Gordon y Haseltine 1981).

Algunas de las enzimas responsables de los pasos siguientes en la escisión de la lesión, como la eliminación del término fosfoazúcar, escisión del dímero unido al lado 5' de la incisión y la resíntesis

seguida de ligación, no han sido todavía identificados (Haseltine 1983).

La actividad N-glicosilasa ha sido confirmada por la demostración de que las bases de timina pueden ser liberadas por la actuación de la fotoliasa desde el ADN irradiado y tratado con UV-endonucleasa que rompe el enlace ciclobutano.

Estas UV-endonucleasas comparten con el resto de las enzimas glicosilasas las características de proteínas de bajo p.m., formadas por una cadena sencilla polipeptídica, altamente específicas en su sustrato, reconociendo en este caso a los dímeros de pirimidina ciclobutilos como único sustrato (Lindahl 1982). Así, no reconocen los Thy-6-4-Pyo (Lippke *et al* 1981). Sin embargo, difieren de las otras ADN-glicosilasas en que parecen tener asociada la actividad AP-endonucleasa, como parte de la misma proteína estructural (Nakabeppu y Sekiguchi 1981; McMillan *et al* 1981; Warner *et al* 1981). Esta asociación se ha observado también en la endonucleasa III de *E.coli*, con actividad glicosilasa y AP-endonucleasa de clase I, que actúa en la eliminación de timinas saturadas (Demple y Linn 1980; Lindahl 1982).

En la T4 endonucleasa V, la actividad AP-endonucleasa es más termolábil que la actividad glicosilasa asociada. Debido al pequeño tamaño de la proteína, se puede suponer que las dos actividades son realizadas por un mismo centro activo que difiere en el grado de dependencia de conformación del centro para cada una de las actividades (Nakabeppu y Sekiguchi 1981).

En cuanto a la UV-endonucleasa de *M.luteus*, Grafstrom *et al* en 1982, con un nuevo sistema de purificación (20000 veces) determinaron que la actividad N-glicosilasa muestra una mayor preferencia por el ADN de doble cadena irradiado que por el de cadena sencilla. En condi-

ciones de exceso de sustrato, la UV-glicosilasa muestra una preferencia por dímeros de pirimidina con timina en el lado 5' que por los que tienen citosina 5'. Por su parte, la actividad AP-endonucleasa asociada, parece preferir el lugar apirimidínico creado, adyacente al dímero timina-timidilato que a otros sitios depurinizados. Otras AP-endonucleasas (AP-endonucleasa placentaria, exonucleasa III y AP-endonucleasa de *M. luteus* clase III) no muestran esta preferencia por el lugar apirimidínico adyacente al dímero.

Como hemos mencionado, el resto fosfoazúcar creado por esta última actividad no es sustrato de las ADN polimerasas. No está claro si pudiera actuar en concierto, y tras la actuación de estas UV-endonucleasas, una AP-endonucleasa clase II, que liberan el residuo deoxirribosa-5'-fosfato del extremo apirimidínico y generan así términos que son buenos sustratos para las ADN polimerasas (Gordon y Haseltine 1981). Esto parece razonable ya que las células contienen ambos tipos de AP-endonucleasas. De forma alternativa, este residuo podría ser eliminado por una exonucleasa celular (Lindahl 1982).

Este sistema de escisión de base AP-endonucleasa es el mecanismo mayoritario por el que *M. luteus* inicia la reparación de dímeros (La Belle y Linn 1982). Como ya se ha indicado, en *M. luteus* no ha sido posible identificar un sistema de reparación tipo UvrABC-endonucleasa. Por otro lado, Demple y Linn (1980) demostraron que *E. coli* no escinde los dímeros via ADN-glicosilasa.

Debido a la diferencia de iniciación de este mecanismo de reparación, se ha denominado escisión de nucleótidos al sistema iniciado por la escinucleasa UvrABC, y escisión de base al sistema iniciado por las UV-endonucleasas.



b.2.- ESCISION Y RESINTESIS

La característica más desconcertante de estos dos pasos en *E. coli* es la multiplicidad de enzimas con propiedades válidas para ellos "in vitro", así como un número incluso mayor de mutaciones que han mostrado alterar estos procesos "in vivo". Sin embargo, ninguna mutación sencilla elimina la escisión o la resíntesis, una vez que ha ocurrido la incisión, y ninguna las mutaciones que afectan a la escisión o a la resíntesis confieren el grado de sensibilidad al UV característico de los mutantes *uvr⁻*. Por este motivo es difícil identificar un camino enzimático que pueda ser designado con seguridad como el mecanismo principal de los pasos de escisión y resíntesis "in vivo".

Estudios "in vitro" con la escinucleasa reconstituida han mostrado que después del paso de incisión, el complejo ADN-UvrABC parece persistir (Yeung *et al* 1983) si bien también se ha observado cierta liberación del oligonucleótido de 12-13 nucleótidos desde dicho complejo. Así parece posible que "in vivo" intervengan varias proteínas en el proceso de disrupción del complejo ADN-UvrABC y el desplazamiento o eliminación del oligonucleótido. Candidatos para este papel son la proteína UvrD, que se trata de una helicasa II (Yeung *et al* 1983; Kumura y Sekiguchi 1984) la ADN-polimerasa I (en su actividad exonucleasa 5'-3'), la proteína de unión a ADN de cadena sencilla (Ssb) o una de las varias exonucleasas celulares (polimerasa III en su actividad exonucleasa 5'-3', exonucleasa VII, específica de cadena sencilla, etc.). Los mutantes *uvrD⁻* llevan a cabo la incisión, pero son deficientes en la escisión de los dímeros de pirimiina, y presentan una disminución en la velocidad y extensión de unión del ADN reparado al ADN parental (Kuemmerle y Masker 1980; Kuemmerle *et al* 1982; Kuemmerle y Masker 1983; Kumura y Sekiguchi 1984). Por su parte, Caron *et al* (1985) han indicado que "in vitro" la liberación del oligonucleótido que lleva el dímero desde el ADN parental, que ha sido cortado por la escinucleasa, es dependiente de condiciones quelantes o bien de la

adición simultánea del producto del gen *uvrD* y del producto del gen *pol A* (polimerasa I), cuando la polimerización de deoxinucleótidos trifosfatos es catalizada de forma concomitante. Esta adición de la proteína UvrD también conduce al recambio de la proteína UvrC. Sin embargo, también indican que en ausencia de estos productos de los genes *uvrD* y *polA*, el paso de escisión puede ser llevado a cabo por la acción de un número de diferentes productos génicos. Por otra parte, estudios recientes han planteado la posibilidad de que el producto del gen *phr* juegue un papel en la reparación dependiente de *uvrABC* en la oscuridad, probablemente colaborando en este paso de escisión (Yamamoto *et al* 1983a y b, 1984; Sancar *et al* 1984a).

La escisión de los dímeros "in vivo" es seguida por la síntesis de reparación (Petitjohn y Hanawalt 1964) o resíntesis que rellena los huecos de escisión. Cooper y Hanawalt (1972a) encontraron que los parches de reparación son heterogéneos en tamaño. El 99% de estos parches son de 20-30 nucleótidos (parches cortos)-otros métodos de medida tanto "in vivo" como "in vitro" han dado valores de 13-24 nucleótidos (Ley y Setlow 1972; Ben-Ishai y Sharon 1978; Masker 1977)- mientras que el 1% restante constan de unos 1500 nucleótidos (parches largos) (Cooper 1982). Estas dos clases de parches de reparación parecen resultar de la actuación de distintas vías para la síntesis de reparación. Ahora bien, tanto una como otra requieren el paso previo de incisión para iniciar el proceso de resíntesis, ya que ésta no se da en ninguno de sus tipos (corto o largo parcheo) en mutantes *uvrA*⁻.

La relativamente estrecha correspondencia entre el tamaño de los parches cortos y el tamaño del oligonucleótido producido por la doble incisión de la escinucleasa, sugiere que en la mayoría de los casos (el 99% antes indicado) la ADN polimerasa rellena el hueco dejado después de la acción de la endonucleasa UvrABC con muy poca translación de mella o expansión exonucleolítica del hueco. En este caso, la polimerasa I parece ser la principal responsable de este paso de resínte-

sis en la reparación por escisión de corto parcheo, ya que la procesividad intrínseca de la polimerasa I se correlaciona bien con el tamaño del parche (Matson y Bambara 1981).

En los mutantes *polA* (Cooper y Hanawalt 1972b) hay una mayor frecuencia de parches largos. El número de sitios que sufren reparación es el mismo o incluso menor que en *polA*⁺. Este aumento de parches largos probablemente tenga que ver con el mecanismo de acción de las polimerasas que intervienen en el relleno del hueco y sea debido a la acción de exonucleasas 3'-5' no asociadas, que expanden el hueco para permitir la unión procesiva y la reinserción de nucleótidos por las polimerasas II y III que actúan en ausencia de la polimerasa I. Esta expansión no es llevada a cabo por la exonucleasa V, ya que estos parches aparecen en mutantes *polA*⁻*recB*⁻*recC*⁻. Sin embargo, estos parches largos, algo mayores que los normales, 80-90 nucleótidos, son distintos de los originados por la reparación por escisión de largo parcheo (Cooper 1982).

El proceso de reparación de largo parcheo, que supone como antes se ha dicho el 1% de los parches de resíntesis después de la incisión y escisión, es inducible y está controlado por el circuito regulatorio dependiente de *rec-lex* (Cooper y Hanawalt 1972b). La cinética de la síntesis en este proceso difiere de la de corto parcheo, ya que en esta última la síntesis comienza inmediatamente después de la irradiación UV y es completada virtualmente antes de la síntesis de la mayoría de los parches largos (Cooper 1982). Esta última parece ser llevada a cabo por la polimerasa I, en la forma normal o bien en una modificada. Se ha aislado una polimerasa I* (Lackey et al 1982), una forma alterada que representa una pequeña proporción de la actividad polimerasa I total, y que podría estar involucrada en este proceso. Esto no excluye la posibilidad de otros productos génicos inducidos.

Cada parcheo largo inducido es debido a una sola lesión, y pueden ser de dos tamaños diferentes: cerca del 75% de estos parches son de 1500 nucleótidos y los restantes son de al menos 9000 nucleótidos. En total suponen el 1% de todos los parches de reparación. Es posible que estos parches ocurran en regiones especiales del genoma que podrían, por razones estructurales, ser refractarias a la reparación por el sistema constitutivo. Por otro lado, hay datos que sugieren que esta reparación por largo parcheo está relacionada con la capacidad de la célula de supervivencia, no con la mutagénesis, frente a la irradiación UV y con una recuperación más rápida de la replicación del ADN después del daño. Estos y otros datos implican un papel especializado de esta síntesis de reparación en contraste con el modelo en el cual los largos parches se darían al azar en unos pocos sitios de lesión (Cooper 1982).

b.3.- LIGACION

La unión covalente de la secuencia de nucleótidos nuevamente sintetizada a la cadena de ADN original es llevada a cabo por la polinucleótido ligasa, el mismo enzima implicado en la replicación y recombinación del genoma no dañado.

Esta enzima es inhibida por nicotinamida-mononucleótido evitando así el cierre de las roturas de simple cadena introducidas en la incisión (Lorensen et al 1984).

b.4.- INTERACCIONES ENTRE LOS MECANISMOS DE FOTORREPARACION Y REPARACION POR ESCISION-RESINTESIS

Datos "in vivo" (Yamamoto *et al* 1984; Hays *et al* 1985) sugieren que la fotoliasa coopera de hecho con la reparación en oscuridad. Sin embargo, "in vitro" hay datos que sugieren la inhibición de la fotoliasa a la escinucleasa (Sutherland 1981). No obstante, estudios con ambas enzimas purificadas (Sançar *et al* 1984a y c; Hays *et al* 1985) indicaron que la fotoliasa estimula la eliminación específica de los dímeros por la escinucleasa, lo que sugiere que la enzima contribuye a la reparación en el ADN del daño por UV, incluso en oscuridad. Esta estimulación es posible que sea debida a que, ya que el dímero *per se* no es la estructura reconocida por la UvrABC-escinucleasa, la fotoliasa, al unirse al dímero y cambiar los parámetros de la hélice de ADN, haga a éste mejor sustrato para aquella, o bien, de forma alternativa, porque al unirse al dímero, facilite la disociación de la escinucleasa del ADN después de los procesos de incisión. Yeung *et al* (1983) indicaron que la nucleasa queda como complejo unida al ADN durante un largo período de tiempo, después de las reacciones de incisión. El efecto alternativo de la fotoliasa promovería el recambio de la escinucleasa, aumentando la velocidad y extensión de la incisión.

Pero por otro lado, el papel estimulador de la fotoliasa es específico de los dímeros, ya que no estimula la acción de la escinucleasa en el tratamiento de otros aductos tales como los entrecruzamientos producidos por psoralenos ni las lesiones ocasionadas por cisdiaminodicloroplatino (II) (Hays *et al* 1985).

Por otra parte, la unión de las subunidades de las proteínas UvrA y UvrB a la lesión (la unión completa de la escinucleasa y su acción es tan rápida que escinden los dímeros antes de la adición de la foto-

liasa) no afectan la unión de la fotoliasa al dímero, lo que sugiere que los lugares de unión de ambas enzimas no se superponen.

Por el contrario, el mecanismo de escisión-resíntesis por UV-endonucleasa interfiere con la fotoliasa en la unión a los dímeros de pirimidina. Sancar *et al* (1984a) demuestran que la fotoliasa inhibe la función endonucleolítica de la T4-endonucleasa V, lo que confirma que los dímeros *per se* son la estructura importante de reconocimiento de ambas enzimas.

b.5.- SIGNIFICACION GENERAL DE LA REPARACION POR ESCISION-RESINTESIS

Este mecanismo de reparación parece ser de importancia general, no sólo en bacterias, sino en todo el mundo de los seres vivos. Hasta el momento no se ha obtenido ninguna evidencia de su ausencia en cualquiera de las múltiples especies investigadas.

Comparada con la reparación fotoenzimática, que actúa esencialmente sobre los dímeros de pirimidina, la reparación por escisión es menos específica con respecto a los tipos de alteraciones del ADN con que trata. Por el propio mecanismo de acción de la UvrABC-escinucleasa (2 cortes y separados del lugar real de la lesión), el enzima es capaz de reconocer un amplio espectro de daños. La especificidad no puede ser un simple reconocimiento de aductos particulares, sino que puede residir en alguna deformación particular en el ADN común a varios sustratos. Los mejores sustratos de la escinucleasa son los mono y biaductos de psoraleno-pirimidina, seguidos por [Thy(6-4)Pyol], ciertos aductos de cys-diaminocloroplatino y luego los dímeros de pirimidina (Sancar *et al* 1984a).

Sin embargo, la reparación de los daños producidos por diferentes agentes químicos es menos extensiva que para los ocasionados por la

luz UV, aunque estos últimos sean peor sustrato. Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que la luz UV es un factor ambiental natural que ha sido la fuerza selectiva mayoritaria para establecer y mantener este mecanismo de reparación. No obstante, se puede considerar como un sistema general de mantenimiento del ADN para la célula, cuya función predominante es el reconocimiento y corrección de varios tipos de irregularidades.

c. - REPARACION POSTREPLICATIVA O POR RECOMBINACION

En 1965, poco después del descubrimiento de la reparación por escisión, Clark y Margulies aislaron dos mutantes de *E. coli* K12, que producían un número extremadamente bajo de recombinantes cuando se transferían fragmentos cromosómicos donadores (Hfr) a células receptoras (F⁻) por conjugación. Posteriormente fue aislado en otros laboratorios un considerable número de tales mutantes *rec*⁻. La mayoría de ellos muestran también una mayor sensibilidad a la radiación UV, siendo de particular interés los mutantes *recA*. Su sensibilidad es semejante a la de los otros mutantes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, si bien reactivan los fagos infectantes por la HCR y escinden los dímeros de pirimidina. Los mutantes *recA* son defectivos en un mecanismo de reparación que incluye procesos de recombinación genética y que requiere al menos una replicación parcial del ADN, denominado por ello reparación por recombinación o reparación postreplicativa. Este mecanismo es diferente del de escisión-resíntesis, ya que mutantes dobles *recAuvrA* son 30 ó 40 veces más sensibles que los correspondientes *uvrA*⁻. De hecho, son los mutantes más sensibles hasta ahora encontrados.

Este mecanismo de reparación fue descrito originalmente en mutantes deficientes en la reparación por escisión de *E. coli* K12 (Rupp y Howard-Flanders 1968). Estudiando la replicación del ADN en estas cé-



lulas, se encontró que después de la irradiación con UV, las secuencias polinucleotídicas recién sintetizadas eran mucho más cortas que las de células sin irradiar. Sin embargo, a medida que transcurría el tiempo de incubación, esta diferencia desaparecía, de modo que estas secuencias más cortas eran aparentemente convertidas o integradas en las de longitud normal. Estudios posteriores han establecido la naturaleza principal de este fenómeno (Rev. Hanawalt et al 1979).

La estructura del ADN en las regiones en replicación plantea un problema a la reparación por escisión, ya que las cadenas complementarias se desenrollan y se separan. El ADN sintetizado después de la irradiación con UV contiene un hueco opuesto a cada dímero de pirimidina, o de otra lesión, presentes en la cadena molde. Estos huecos se generan aparentemente al ser bloqueada la replicación en el lugar del dímero, que continúa más allá de éste, presumiblemente en el siguiente lugar de iniciación de un fragmento de Okazaki. Son estos huecos, más que los dímeros *per se*, los sustratos de la reparación postreplicativa, y por ello también se denomina a este proceso reparación del hueco de la cadena hija (DSGR, del inglés daughter-strand gap repair).

Para reparar estos huecos, se produce un intercambio de cadenas hermanas que rellenan cada hueco con ADN no dañado, procedente de la cadena isopolar parental. Las discontinuidades que aparecen en las cadenas parentales son eliminadas entonces por síntesis de reparación, usando las regiones no dañadas de las cadenas hijas complementarias como molde (figura D). Los intercambios de cadena se dan con una frecuencia que se aproxima a una por hueco en la cadena hija. Una vez que el intercambio ha ocurrido, las lesiones pueden ser eliminadas, al menos en principio, por el mecanismo de reparación por escisión.

Así, la DSGR repara los huecos que son generados por el aparato de replicación al intentar replicar el ADN pasando ciertas lesiones

localizadas en él, pero no elimina las lesiones originales en sí mismas. Debe ser contemplado, por tanto, como un mecanismo que permite tolerar a las células tales lesiones, al menos temporalmente.

Hay diferentes pruebas que confirman este modelo indicado. En los primeros estudios (Rupp y Howard-Flanders 1968) se estimó que la longitud media de las secuencias polinucleotídicas primeramente sintetizadas, las más cortas, coincidía con la distancia media entre los dímeros de pirimidina en el ADN de las células irradiadas.

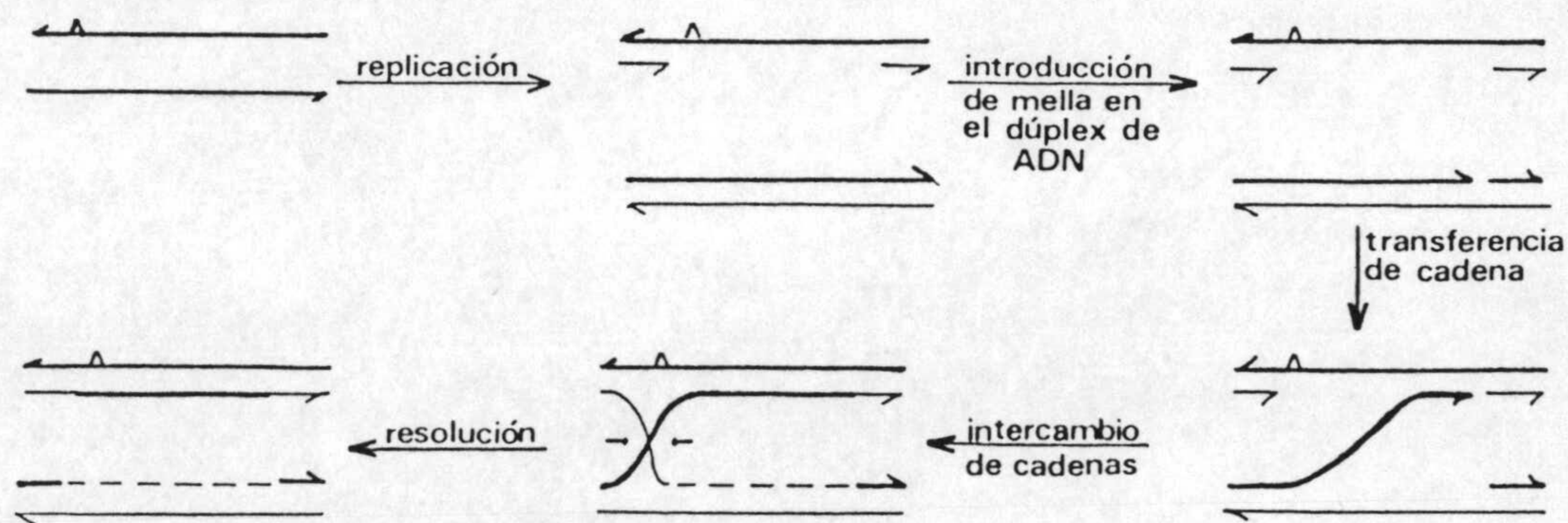


Figura D.- Modelo de reparación por recombinación (DSGR).

Posteriormente, diferentes experimentos (Rupp *et al* 1971; Mosevitsky 1976) indicaron que hay intercambio de cadenas durante este tipo de reparación y que los insertos de ADN parental en las cadenas hijas oscilan entre 1×10^3 - 2.4×10^4 nucleótidos. Por otra parte, estudios de fotolisis del BrUra incorporado en la síntesis de ADN por células *uvrA* irradiadas con UV, mostraron que en la DSGR se da síntesis de reparación en las cadenas parentales (Ley y Setlow 1972). Los tamaños de

los insertos citados en los diferentes trabajos son probablemente compatibles con el tamaño de los huecos ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$). Sin embargo, aún no está del todo claro cuánto del hueco se rellena con ADN parental y cuánto podría rellenarse con síntesis de reparación, ya que en principio, sólo se necesitaría la transferencia de una pequeña longitud de ADN. No obstante, si se da la migración de ramas durante el intercambio, al final podría resultar un inserto mayor que el tamaño del hueco original.

La replicación postreplicativa en *E. coli* irradiado con UV parece no generar una copia del genoma libre del dímero directamente. Estudios monitorizados con la UV-endonucleasa de T4 indican que los dímeros se transfieren al azar en el ADN nuevamente sintetizado, a medida que los huecos son reparados, resultando distribuidos por igual entre cadenas parentales e hijas (Ganesan 1974; Ganesan y Seawell 1975). La producción de ADN libre de dímero por este mecanismo, en la ausencia de la reparación por escisión, requiere varias rondas de replicación (Ganesan y Seawell 1975).

Estudios genéticos han indicado la existencia de varias vías en la reparación postreplicativa: hay dos caminos mayoritarios, independientes entre sí, esto es, el dependiente del gen *recF* y el dependiente del gen *recB* (Rothman *et al* 1975; Wang y Smith 1981). La vía dependiente de *recF* es responsable prioritariamente de la DSGR, jugando un menor papel la dependiente de *recB* (Wang y Smith 1984a). Aparte, hay una vía minoritaria independiente de *recB recF* para el relleno de los huecos producidos en las cadenas hijas (Wang y Smith 1983; 1984a).

La inactivación de varios genes en *E. coli*, solos o en combinación, parecen causar deficiencias en la DSGR: *recA*, *ruv*, *lexA*, *recF*, *recB* (y posiblemente *recC*). Las tres primeras bloquean también la reparación por escisión de largo parcheo, pero estos dos mecanismos se distinguen en que esta última requiere un genotipo *uvrA⁺B⁺C⁺*, mientras

que la reparación postreplicativa no, y que puede darse en ausencia de replicación normal.

La proteína RecA es una proteína de 37800 daltons que juega dos papeles en la célula: es imprescindible en la recombinación homóloga en *E. coli* y cataliza la sinapsis y el intercambio de cadenas entre moléculas homólogas de ADN (Rev. Radding 1982). Además, la proteína RecA regula la inducción de la respuesta SOS.

En la reparación postreplicativa la proteína RecA participa mecánicamente, aparte del efecto regulatorio que pueda ejercer. Estudios "in vitro" han sugerido esta participación directa en algunos de los pasos de la reparación. Si el dúplex de ADN que es homólogo a la región de cadena simple (la que tiene el hueco) contiene una mella o incisión, la proteína RecA es capaz de iniciar el intercambio de cadenas desde el dúplex mellado, transfiriendo el término 3'-OH de la mella a la región de cadena simple de la molécula con el hueco, y proporcionando así una cadena intacta complementaria a la que contiene el dímero. La reacción de intercambio de cadenas se inicia así de modo tricatenario. La proteína RecA dirige la migración de cadenas y la formación de héterodúplex más allá del dímero. El término 3'-OH de la cadena con hueco es posteriormente transferido a la otra molécula, produciéndose así un cambio cruzado de cadenas, y a partir de este punto hay un intercambio recíproco para formar los dos monómeros heterodúplex. Se ha detectado una actividad de corte en trans en la molécula intacta tanto "in vivo" (Ross y Howard-Flanders 1977) como "in vitro" (Cassuto *et al* 1978) pero la enzima o enzimas responsables de tal paso no han sido aún identificadas ni caracterizadas.

Se ha visto que en presencia de la proteína Ssb y ATP, la RecA es capaz de promover tal migración de cadenas en un ADN que contenga dímeros de pirimidina y otros fotoproductos inducidos por UV (West *et al* 1981a y b; 1982). La velocidad de migración se reduce cerca de 50 ve-

ces cuando se encuentra un dímero en el ADN, pero la reacción continúa hasta su terminación, incluso en muestras fuertemente irradiadas con UV. Posteriormente, los dímeros pueden ser escindidos específicamente por la T4-glicosilasa-AP-endonucleasa, lo que sugiere que las lesiones pueden ser eliminadas por escisión-resíntesis, una vez que se haya completado la reparación por recombinación (Livneh y Lehman 1982).

Las mutaciones en el gen *ruv* producen una mayor sensibilidad a la radiación e incrementan la filamentación tras la inhibición temporal de la síntesis de ADN (Otsuji *et al* 1974). Esta mayor sensibilidad parece no deberse a la filamentación inducida, sino a un defecto en la reparación que incluye funciones de recombinación y que parece probable sea este mecanismo de DSGR (Lloyd *et al* 1984). Se ha sugerido que el producto del gen *ruv* actúe en algún paso del proceso de reparación ulterior al intercambio de cadenas, quizás participando en la resolución de las moléculas unidas a genomas viables.

La proteína LexA es una proteína de 22700 daltons que regula el sistema SOS, reprimiendo los genes SOS inducibles. Los mutantes *lexA* (Ind^-) son deficientes en la reparación postreplicativa, probablemente debido a la incapacidad de estas células de inducir proteínas requeridas en esta reparación recombinacional: RecA, probablemente el producto del gen *ruv* y quizás otras.

El gen *recF* está localizado en medio de un bloque de genes involucrados en el metabolismo del ADN y codifica una proteína de 40000 daltons cuya función bioquímica, no obstante, no se conoce todavía (Blanar *et al* 1984). Los mutantes *recF* son deficientes en la reparación postreplicativa (Ganesan y Seawell 1975; Rothman y Clark 1977; Wang y Smith 1981). Esto puede ser debido a una deficiencia, no bloqueo total, en la inducción SOS; el producto del gen *recF* podría afectar a la activación de RecA, jugando un papel en la producción, regulación o estabilización de la señal inductora SOS o de los cofactores

(ADN de cadena simple y ATP) requeridos para las actividades de proteasa de RecA. Sin embargo, hay datos que indican que aparte de este posible papel, la proteína RecF interactúa físicamente con la proteína RecA, afectando su actividad y facilitando así su papel en la reparación por recombinación (Volkert y Hartke 1984; Volkert et al 1984).

Los genes *recB* y *recC* codifican subunidades del enzima exonucleasa V, una ATPasa dependiente de ADN que funciona como exo- y endonucleasa, así como ADN-helicasa. La vía de reparación por recombinación dependiente del gen *recB* juega un pequeño papel en el relleno de los huecos de las cadenas hijas, siendo el producto de estos genes más bien requerido en la reparación de la roturas de doble cadena del ADN que se originan de los huecos no reparados en las cadenas hijas.

Aparte de estos genes, también se han implicado en esta reparación los productos de los genes *uvrD*, *dnaG*, *polA*, *polC*, *uvrA*, *uvrB* (Hanawalt et al 1979), y *umuC* (Wang y Smith 1985).

A pesar de denominarse este mecanismo de reparación, reparación por recombinación, por los intercambios de ADN que en él se dan y el requerimiento absoluto del gen *recA* funcional, las deficiencias que producen las mutaciones en los genes citados en este proceso de reparación, y no en la recombinación genética, indican que necesita algunas funciones bioquímicas no necesarias en la recombinación genética.

Los sistemas de reparación por escisión y DSGR se complementan uno a otro en células silvestres. Los dos sistemas actúan secuencialmente; así es inevitable que el que actúa primero, el de escisión restaure más del 95% de las lesiones totales. Después de esta reparación extensiva, las células silvestres irradiadas aún pueden llevar un porcentaje de lesiones letales por genoma, que impedirán que la célula sobreviva si no actúa el mecanismo de reparación postreplicativa. Esto explica la baja supervivencia de los mutantes *recA* en los que sólo fun

ciona la reparación por escisión. Este porcentaje de lesiones sin reparar se piensa que es debido a un insuficiente tiempo de reparación, la irreparabilidad de ciertos fotoproductos o bien a alteraciones adicionales en los lugares de las lesiones que las hagan irreparables. Después de una ronda de reparación por escisión y por recombinación, los dímeros de pirimidina que quedan podrían ser eliminados por una nueva ronda de escisión-resíntesis. Por cada lesión reparada, la reparación por recombinación incluye una secuencia nucleotídica mucho más larga que la reparación por escisión. Por ello, la reparación por recombinación puede ser sólo altamente efectiva (en porcentaje de lesiones reparadas) cuando se enfrenta con relativamente pocas lesiones. Este es el caso de bajas dosis y de altas dosis sólo si la gran mayoría de las lesiones son previamente reparadas por escisión.

d.- REPARACION SOS

En *E. coli* existen al menos tres sistemas o redes regulatorias de genes diferentes, cuya exposición es inducida en respuesta a tratamientos que dañan al ADN. Dichas redes son: sistema SOS, red de respuesta adaptativa y sistema de shock por calor (Rev. Walker 1984; 1985).

El sistema SOS fue la primera red regulatoria que se caracterizó de las que se inducen por el daño al ADN. Es el mayor, el más complejo y el mejor conocido de los sistemas regulatorios inducibles por daño al ADN.

La existencia de la red SOS fue claramente postulada en primer lugar por Defais *et al* en 1971 y posteriormente por Radman en 1975. Las primeras evidencias genéticas y fisiológicas que sugieren la existencia de este sistema fueron discutidas en profundidad por Witkin (1976) y los avances y desarrollos más recientes han sido objeto de



numerosas revisiones, entre ellas Little y Mount 1982, Kenyon 1983, Walker 1984 y 1985 , D'Ari 1985 y Ossana et al 1986.

d.1.- LA RESPUESTA SOS

La exposición de células de *E.coli* a agentes que dañan el ADN, por ejemplo radiación UV, mitomicina C... o interfieren en su replicación, por ejemplo por ácido nalidíxico, o mutantes termosensibles para la replicación del ADN expuestos a temperatura restrictiva, da lugar a la inducción de un juego diverso de respuestas fisiológicas denominadas respuestas SOS, que incluyen:

- a) aumento en la capacidad de reactivar fagos irradiados con UV (reactivación Weigle)
- b) capacidad de mutar bacteriófagos irradiados con UV (mutagénesis Weigle)
- c) inducción de funciones que dan lugar a mutaciones por UV y por otra variedad de agentes físico-químicos
- d) crecimiento filamentosos debido a inhibición de la división celular
- e) aumento de la capacidad de reparación por escisión-resíntesis y DSGR
- f) aumento de la capacidad de reparación de roturas de doble cadena
- g) disminución de la capacidad de restricción controlada por el hospedador
- h) capacidad de llevar a cabo la reparación por escisión de largo parcheo
- i) cese de respiración
- j) inducción de profagos

Todas estas respuestas fisiológicas son debidas a la inducción de la expresión de al menos 17 genes, a menudo denominados *din* (damage-inducible).

d.2.- REGULACION DE LA RESPUESTA SOS

La expresión de todas estas funciones celulares es transitoria e incluye un complejo mecanismo regulatorio de transcripción, donde los productos de los genes *recA* y *lexA* controlan la expresión de un regulón, formado por varios genes no ligados. La proteína LexA actúa como represor de la transcripción de estos genes SOS, al unirse a secuencias de operador similares en todos ellos, incluyendo al *recA* y al propio *lexA*.

La exposición de las células a agentes que dañan el ADN o interfieren en su replicación, genera una señal inductora que activa las moléculas de RecA. Una vez activada, la proteína RecA adquiere actividad proteasa e interactúa con un monómero de LexA, escindiéndolo por un enlace peptídico -alanina-glicina-. A medida que las moléculas de LexA van siendo inactivadas por la rotura proteolítica, los distintos genes SOS se expresan a mayor nivel, y en consecuencia, se pueden observar las respuestas SOS mediadas por sus productos. Los represores de bacteriófagos tales como λ , comparten homología con LexA (Sancar et al 1982), y son escindidos de forma similar en un enlace -ala-gly- cuando interactúan con la proteína RecA activada, produciéndose la inducción de profagos (figura E).

A medida que la reparación del ADN ayuda a la célula a recuperarse del tratamiento que la ha dañado, la señal inductora desaparece, de modo que las moléculas RecA cesan de ser activadas. Las moléculas LexA se acumulan entonces en la célula y reprimen de nuevo a los genes SOS

d.2.1.- LA SEÑAL INDUCTORA. ACTIVACION DE LA PROTEINA RECA

Estudios "in vitro" han indicado que la proteína RecA es la única necesaria para la rotura catalítica de la proteína LexA (Little et al

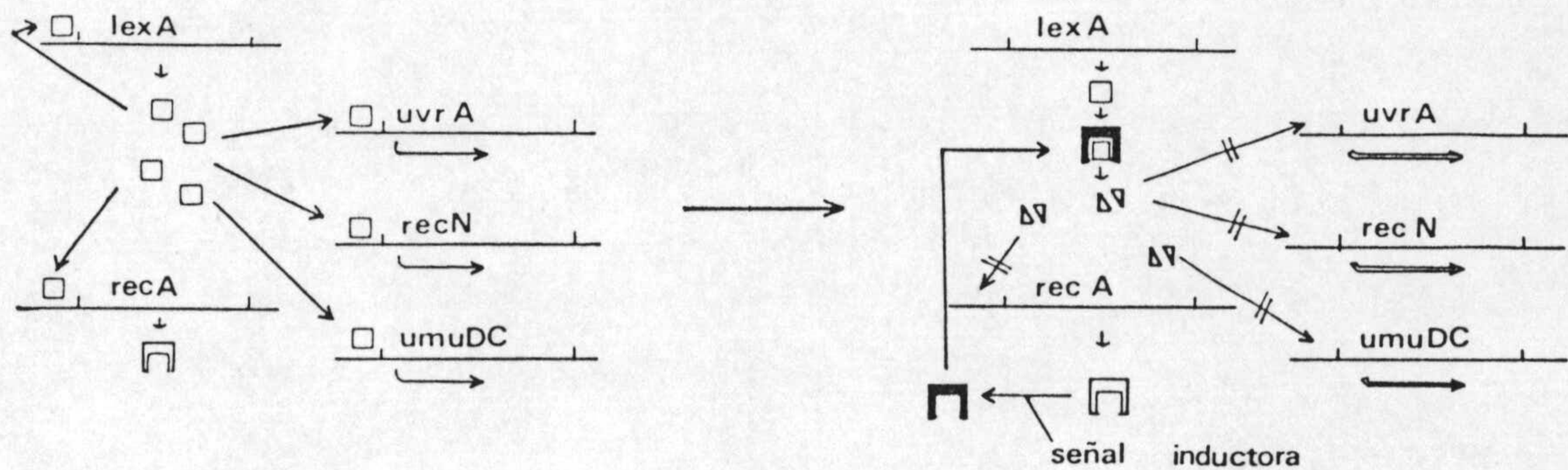


Figura E.- Inducción de la expresión de los genes SOS

1980; Horii *et al* 1981). Para que esta actividad proteolítica de RecA se exprese, es necesaria su activación. Se piensa que ésta consiste en un cambio conformacional de la molécula más que una mayor síntesis de la misma, ya que la simple superproducción de la proteína no es suficiente para causar inducción de las respuestas SOS (Quillardet *et al* 1982; Uhlin y Clark 1981). Esta activación es reversible. "In vitro", ocurre cuando la proteína RecA forma un complejo ternario con ADN de cadena sencilla, y un nucleósido trifosfato, siendo el más efectivo el dATP (Phizicky y Roberts 1981).

Por lo que respecta a la situación "in vivo", todavía no está claro cuál es exactamente la señal inductora o si pueden servir como tal varias señales. Se ha sugerido que funcionen como tales señales trozos de ADN de cadena sencilla que resultan del bloqueo de la replicación en el sitio de las lesiones, oligonucleótidos, producto de la degradación por ADNasa del ADN dañado, o bien las alteraciones en los *pools* de nucleótidos después del daño al ADN (Referencias en Ossana *et al* 1986 y Little y Mount 1982).

Por otra parte, Roberts *et al* (1982) propusieron que la proteína se activa como proteasa al unirse al ADN de cadena sencilla dejado por la horquilla de replicación cuando se encuentra una lesión o cuando se le interfiere en su avance, en presencia de dATP. La proteína Ssb puede jugar un papel importante en esta activación a proteasa de la RecA (Moreau 1985) estimulándola en la presencia de dATP, pero favoreciendo más la actividad de sinaptasa (esto es, de dirigir la recombinación homóloga y en consecuencia, favoreciendo la reparación postreplicativa) en presencia de ATP.

También se ha indicado que la participación de enzimas del metabolismo del ADN en la activación de RecA (Rev. Walker 1984; Little y Mount 1982).

Se han aislado varios mutantes RecA con la actividad proteasa y/o con la capacidad de unión al ADN alteradas.

d.2.2.- ESCISION DE LEXA Y REPRESORES DE PROFAGOS

Una vez activada, la proteína RecA cataliza la escisión de los represores. La estrecha homología detectada entre el represor de λ y otros profagos, y la proteína LexA (localización del enlace -ala-gly-secuencia de aminoácidos adyacentes a dicho enlace, modo de represión... [Rev. Little y Mount 1982]) sugieren que la proteasa RecA reconoce una determinada estructura terciaria. La escisión se realiza por rotura del enlace -ala-gly- localizado cerca de la mitad de la cadena polipeptídica y da lugar a dos fragmentos de aproximadamente igual tamaño.

Los detalles exactos del mecanismo molecular por el cual media esta rotura proteolítica no están claros todavía. Little (1984) ha indicado que la rotura específica de la proteína LexA y del represor de

λ puede ocurrir en ausencia de RecA. La incubación de dichos represores altamente purificados en condiciones alcalinas suaves y presencia de cationes divalentes, conduce a la rotura del mismo enlace -ala-gly- que es escindido normalmente en condiciones neutras en presencia de RecA activada. Estos resultados indican la posibilidad de que la proteína RecA juegue un papel estimulador indirecto, quizás como un efector alostérico, más que como proteasa directamente. La proteína RecA podría cambiar la conformación de LexA de modo que incrementase la susceptibilidad de este enlace específicamente lábil a la hidrólisis por una molécula de agua exógena, o bien de modo que facilitara su propia autodigestión. Sea cual sea el mecanismo exacto de esta reacción en la célula, la proteína RecA debe ser activada para escindir a LexA y así desencadenar la respuesta SOS.

El 80% de la proteína LexA es escindida en 3 minutos después de someter a las células a una dosis suave de irradiación con UV. Esto sugiere que la activación de la proteasa es inmediata, y que la rotura del represor es un paso muy temprano en la inducción (Little y Mount 1982). Se han aislado mutantes que evitan esta escisión proteolítica, y que son por tanto no inducibles para el sistema SOS [*lexA* (*Ind*⁻)].

d.2.3.- INDUCCION DEL SISTEMA SOS. DESREPRESION DE LOS GENES SOS

En una célula no inducida, la proteína LexA reprime los genes SOS al unirse a secuencias homólogas entre los distintos genes, a menudo denominadas cajas SOS, localizadas cerca de sus promotores. La secuencia *consensus* de estos sitios de unión de LexA es taCTGTatata-a-aCAGTa (Walker 1984). El represor se une a los diferentes operadores con distintas afinidades, de modo que la mayoría de los genes se expresan a un nivel basal significativo, incluso en la ausencia de tratamiento inductor de SOS. Entre los genes que reprime (tabla A) se encuentran el propio gen *lexA* y el *recA*. El *lexA* es por tanto autorregulatorio.

Se han aislado mutantes *lexA(Def)* con incapacidad de la proteína LexA a unirse a las cajas SOS, y por tanto, con expresión constitutiva de las respuestas SOS.

A medida que las moléculas de LexA van siendo escindidas proteolíticamente por la RecA activada, el *pool* de LexA disminuye y los genes con operadores a los que la LexA se une de forma relativamente débil empiezan a expresarse en toda su extensión. Si el tratamiento es suficientemente fuerte, se activan más moléculas de RecA que escinden más moléculas de LexA. El *pool* del represor alcanza niveles muy bajos, y entonces se expresan a su máximo nivel incluso aquellos genes a cuyo operador se une fuertemente.

Medidas físicas directas indican que la proteína LexA se une más débilmente al operador de *lexA* y *uvrB* que el de *recA* (Brent 1982; Little *et al* 1981) y experimentos genéticos sugieren que se une al de *uvrA*, *dinA* y *dinB* más débilmente que al de *umuDC*, y éste a su vez más débilmente que al de *dinD* (Krueger y Walker 1983). Así parece que tratamientos inductores relativamente débiles llevarían a la expresión incrementada de los genes de reparación por escisión, mientras que la acumulación de grandes cantidades de proteína RecA y la inducción de fenómenos como reparación/mutagénesis dependiente de *umuDC*⁺ no se daría a menos que la célula reciba un tratamiento mucho más fuerte.

La represión del *lexA* por su propio producto influye también en el grado de inducción SOS (Brent 1982; Little *et al* 1981): según la señal inductora, se van a establecer estados intermedios de inducción expresándose de este modo sólo subjugos, mayores o menores, de respuestas SOS. Por otra parte, a causa de la menor afinidad de LexA por su propio operador en comparación con la mostrada por el del gen *recA*, el sistema está tamponado frente a una inducción sustancial por cantidades muy pequeñas de señal inductora.

Aparte de este control ejercido por la afinidad de LexA al operador de los genes a los que reprime, existe una variedad de estrategias diferentes para afinar la expresión de genes individuales en esta amplia red regulatoria (Rev. Walker 1984). Por ejemplo, la mayoría de los genes SOS tienen sólo un lugar de unión para la proteína LexA, pero algunos genes (como *lexA* y *umuDC*) parecen presentar dos secuencias de unión adyacentes (Brent 1982; Little *et al* 1981). Por otra parte, al menos el gen *uvrB* tiene dos promotores, y sólo uno de ellos está regulado por LexA (Sancar *et al* 1982). La presencia del promotor no regulado da lugar a niveles de expresión basales relativamente altos en ausencia del tratamiento inductor. Por su parte, el gen *hima* está autorregulado por su propio producto, aparte de estar reprimido por la proteína LexA.

d.2.4.- TRANSICION DEL ESTADO INDUCIDO AL CRECIMIENTO NORMAL

A medida que la célula se recupera del tratamiento inductor, la señal inductora es eliminada, y las moléculas de RecA vuelven a su estado proteolíticamente inactivo. La síntesis continuada de LexA conduce a un incremento en los *pools* del represor, y en consecuencia a la represión de los genes SOS y vuelta al estado no inducido.

Después de bajas dosis de ultravioleta, el ritmo de síntesis de RecA disminuye de nuevo al cabo de 30-60 minutos, y el de RNAm de RecA también decae hasta alcanzar los niveles basales después de 30 minutos mientras el de RNAm de LexA lo hace 20-30 minutos más tarde (Little y Mount 1982; Markham *et al* 1985). Esto es de esperar de la unión más débil de LexA al operador de *lexA* respecto al de *recA*.

Como se indicó más arriba, los represores de una serie de bacteriófagos como λ , 434, 21, P22 y ϕ 80 (Roberts y Devoret 1983) pueden ser escindidos proteolíticamente por la RecA activada como proteasa.

Esta rotura de represores conduce a la inducción de profagos, que difiere de las respuestas celulares SOS en que es un proceso irreversible. El estado de inducción SOS en el cual los profagos se inducen está determinado por la susceptibilidad de su represor a la proteólisis por RecA y por la afinidad de su represor al operador del profago.

d.3.- LOS GENES SOS

El sistema SOS controla la expresión de genes que tienen una variedad de funciones fisiológicas (Tabla A). Debido a la complejidad fisiológica de las respuestas SOS y a la dificultad de asociarlas a genes cuya actividad pudiera ser cuantificada, la identificación directa de genes distintos de *recA* y *lexA*, ya identificados, no fue posible hasta la utilización de fusiones de operón con el bacteriófago Mud1 (*Ap lac*) construidos por Casadaban y Cohen (1980). Dicho bacteriófago lleva los genes estructurales de la lactosa, pero no el promotor, cerca de uno de los extremos de su genoma. Este fago se integra en el cromosoma bacteriano esencialmente al azar, pero la β -galactosidasa sólo se puede expresar si el bacteriófago se inserta en una unidad transcripcional en la orientación correcta. Por el procedimiento de búsqueda de funciones que expresen la β -galactosidasa a mayores niveles en la presencia de agentes que dañasen el ADN que en su ausencia, se han identificado una serie de genes *din*. La inducción de estos *loci* se bloquea por mutaciones *recA*(Def) (defectiva en todas las actividades de RecA) y por la *lexA*(Ind⁻), lo que indica que dichos genes inducibles están bajo el control de estos dos genes (Kenyon y Walker 1980).



Tabla A Genes SOS controlados por el sistema *recA-lexA* en *E. coli*

Genes cromosómicos	Función
<i>recA</i>	Recombinación; reparación postreplicativa; inhibición de degradación de ADN por exonucleasa V; proteasa. (regulación del sistema SOS); Mutagénesis.
<i>lexA</i>	Represor del sistema SOS
<i>uvrA</i>	Reparación por escisión-resíntesis. Reactivación Weigle de bacteriófagos.
<i>uvrB</i>	"
<i>uvrC</i>	"
<i>uvrD</i>	Reparación por escisión-resíntesis y reparación de errores dirigidos por grupos metilo (methyl-directed mismatch repair).
<i>sula</i> (<i>sfIA</i>)	Inhibición de división celular (filamentación).
<i>ssb</i>	Proteína de unión al ADN de cadena sencilla.
<i>recN</i>	Reparación de roturas de doble cadena, por recombinación dependiente de <i>recF</i> .
<i>ruv</i>	Recombinación.
<i>himA</i>	Proteína HimA; recombinación específica del sitio.
<i>umuDC</i>	Mutagénesis cromosoma bacteriano. Reactivación y mutagénesis Weigle.
<i>dinA</i>	Función desconocida.
<i>dinB</i>	"
<i>dinD</i>	"
<i>dinF</i>	"

Tabla A (Continuación). - Genes SOS controlados por el sistema *recA* *lexA* en *E. coli*.

Genes localizados en plásmidos	plásmido	Función
<i>mucAB</i>	pKM101	Reparación y mutagénesis.
<i>imp</i>	TP110	Reparación y mutagénesis.
<i>gen de colicina E1</i>	ColE1	Producción de colicinas.
E2	ColE2	"
Ib	TP110	"
<i>gen de cloacina DF13</i>	ClODF13	Producción de cloacina.

Referencias en Walker 1984; 1985 y D'Ari 1985.

d.4.- LAS FUNCIONES SOS

d.4.1.- REPARACION DEL ADN

Los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD* que intervienen en la reparación por escisión-resíntesis son genes inducibles y regulados por *recA⁺lexA⁺*, como se deduce del uso de técnicas de fusión de operones "in vivo" e "in vitro" (Rev. Walker 1985). Durante años se pensó que estos genes eran constitutivos y no inducibles, ya que se expresaban a niveles basales significativos en células no inducidas, y que este nivel basal no se afecta mucho por las mutaciones *recA(Def)* o *lexA(Ind⁻)*. La inducibilidad de estos genes ayuda a explicar aparte de la mayor resistencia a UV, ciertas observaciones tales como que la inactivación del producto LexA incrementa la resistencia a UV de células *recA* de modo dependiente de *uvrA⁺* (Mount *et al* 1976) y que la reactivación de fagos inducida (reactivación Weigle) tiene un componente dependiente de *uvr* (Kato y Shinoura 1977 y Rothman *et al* 1979).

El gen *uvrD*, que codifica una helicasa II (Oeda *et al* 1982), interviene también en la reparación por escisión-resíntesis (Kuemmerle y Masker 1980) y en la reparación de errores dirigidos por grupos metilo (methyl-directed mismatch repair) que ayuda a corregir los errores introducidos durante la replicación del ADN (Lu *et al* 1983).

En cuanto a la reparación por recombinación, se ha demostrado que tres genes que intervienen en ella son inducidos por el daño al ADN y están controlados por el circuito regulatorio SOS: *recA*, *recN* y *ruv*.

La proteína RecA, además de su papel de catalizar la rotura proteolítica del represor, es requerida de forma absoluta para la reparación de huecos en la cadena hija y la reparación de roturas de cadenas dobles de ADN.

El producto del gen *recN*, que forma parte de la vía de recombinación dependiente de *recF*, está también involucrado en la reparación de roturas de cadenas dobles de ADN (Picksley *et al* 1984). En cuanto al producto del gen *ruv*, parece actuar en la DSGR (Lloyd *et al* 1984).

Por su parte, la proteína de unión a ADN de cadena sencilla, Ssb, codificada por el gen *ssb*, que es inducida por el daño al ADN (Brandma *et al* 1983), puede jugar un papel en algunos procesos de reparación al estar involucrada en la activación de RecA después de ciertos tipos de daño al ADN (Moreau y Roberts 1984; Moreau 1985).

Aparte de este aumento de reparación consecuencia de la expresión de los genes mencionados, hay otras manifestaciones SOS probablemente relacionadas con la reparación del ADN, pero de las que aún no se han identificado los genes y proteínas correspondientes que las determinan. Hay una función inducible que inhibe la actividad nucleolítica de RecBC, favoreciendo probablemente así las reacciones de reparación. Es posible que ésta sea consecuencia de los mayores niveles sintetizados de RecA tras la inducción, ya que estudios "in vitro" han mostrado que la proteína RecA protege al ADN de la degradación por la exonucleasa V. Otra función inducida inhibe la acción de ciertas enzimas de restricción (Witkin 1976; Little y Mount 1982; Walker 1984).

d.4.2- MUTAGENESIS INDUCIDA

El procesamiento activo de lesiones que conduce a la producción de mutaciones requiere las funciones de al menos 3 genes: *umuD*, *umuC* y *recA* (Rev. Walker 1984 y 1985). Mutaciones en los dos primeros incapacitan a la célula para ser mutada por una amplia variedad de agentes tales como UV, 4-nitroquinolina-1-óxido, metil-metanosulfonato y neocarcinostatina (Kato y Shinoura 1977; Steinborn 1978). Sin embargo, son mutables por otros agentes como la N-metil-N'-nitro-N-nitroso-

guanidina, que produce directamente lesiones de apareamiento erróneo, las cuales no requieren el procesamiento SOS para causar mutaciones. Estas mutaciones en *umuC* y *umuD* confieren a la célula mayor sensibilidad a la muerte por UV, pero no tanto como las *uvr⁻*.

Los genes *umuD* y *umuC* codifican proteínas de 16000 y 45000 daltons, respectivamente, están localizados en un operón, que es inducible y regulado por *recA-lexA* (Bagg *et al* 1981; Elledge y Walker 1983b; Shinagawa *et al* 1983). Un número de plásmidos naturales hacen a *E. coli* más mutable al UV y otros agentes químicos, y alteran su resistencia a estos agentes. El más intensamente estudiado, el pKM101, lleva dos genes, *mucA* y *mucB*, que suprimen la no mutabilidad de las estirpes *umuC* y *umuD*. Al igual que los genes *umuD* y *umuC*, los genes *mucA* y *mucB* se organizan en un operón, que es reprimido por LexA, y codifican proteínas de 16000 y 45000 daltons, respectivamente. Sin embargo, las secuencias de las proteínas Umu y Muc han sufrido una considerable divergencia evolutiva (Perry y Walker 1982; Elledge y Walker 1983a).

Por su parte, la proteína RecA debe jugar otro papel, aparte de regular la inducción del operón *umuDC*, en la mutagénesis. Esto se deduce del hecho de que mutantes *lexA(Def)recA(Def)* no son mutables al UV, a pesar de que en estas estirpes los genes *umuD* y *umuC* se expresan constitutivamente a altos niveles (Bagg *et al* 1981; Little y Mount 1982; Blanco *et al* 1982). Al parecer, es necesaria en forma activada, pero su papel real no está claro todavía. Es posible que se requiera para la proteólisis de alguna proteína que sea la que realmente intervenga en el procesamiento de las lesiones para producir las mutaciones, que se una a la polimerasa III, disminuyendo su fidelidad en la replicación, o bien, que sea ella misma la que intervenga mecánicamente en él (Ennis *et al* 1985). Las proteínas UmuD y MucA comparten homología con la LexA, en la región que incluye el lugar de rotura, y con los represores de λ , 434 y P22. Existe por tanto también la posibilidad de que el papel mecánico de la RecA sea el de interactuar con

esta proteína e incluso escindirlas como lo hace con los represores (Walker 1985; Perry *et al* 1985).

Los diferentes mutágenos influyen en el espectro de mutaciones a las que dan lugar, tanto en el cambio de secuencia como en la localización y la frecuencia relativa de estos cambios. El procesamiento SOS es en su gran mayoría un proceso localizado (esto es, la presencia de la lesión conduce a la introducción de mutaciones en el lugar mismo en que dicha lesión se localiza), e influido por la lesión premutagénica para el cambio de secuencia (Miller 1982; Miller 1983; Walker 1984). Los sitiosapurínicos-apirimidínicos (AP) y los fotoproductos (6-4) pirimidin-pirimidona son lesiones premutagénicas (Schaaper y Loeb 1981; Schaaper *et al* 1982; Brash y Haseltine 1982; Haseltine 1983). Una minoría del procesamiento es por su parte, también localizada, pero al azar con respecto al cambio de secuencia (Foster *et al* 1982). Por último, la inducción del sistema SOS conduce también a un aumento de frecuencia de mutaciones incluso en ADN no dañados, que podría ser consecuencia de un proceso de corrección de lesiones producidas espontáneamente y al azar (por incorporación errónea de bases, por ejemplo) (Caillet-Fauquet *et al* 1984).

El mecanismo más simple para explicar el hecho de que la naturaleza de la lesión premutagénica influya en el cambio de secuencia es que la polimerasa que introduzca la(s) base(s) enfrente de la lesión presente una especificidad relajada. Si la lesión retiene alguna capacidad de apareamiento de base influiría en el tipo de base que se introduciría, pero si no, la selección de esta base sería al azar o podría estar influenciada por alguna preferencia inherente a la polimerasa para insertar una base en particular.

Para ello, la mutagénesis SOS incluiría además una inhibición inducida de la actividad exonucleasa de corrección de pruebas 3'-5' de las ADN polimerasas. También sería necesaria una relajación en la ac-



tividad polimerasa de estas enzimas que permitiera incorporar nucleótidos pasando por la lesión, ya que ésta última bloquea la polimerización justo antes o en el lugar en el que está localizada. En este sentido se ha sugerido la posibilidad de que sea la holoenzima polimerasa III la que actúe (Briges y Mottershead 1978) y/o una ADN polimerasa I*, aislada de células inducidas (Lackey *et al* 1982), que tiene fidelidad reducida, probablemente debido a una reducción de la discriminación en la selección de dNTP (Lackey *et al* 1985). Por su parte, se ha sugerido también (Bridges y Woodgate 1985) que la proteína UmuC se requiere, no para incorporar la base sino para continuar la elongación de la cadena una vez pasada dicha base, incluida de forma errónea.

d.4.3.- INHIBICION DE LA DIVISION CELULAR (FILAMENTACION)

Una función que no presenta una relación obvia con la reparación del ADN es la producción del inhibidor de la división celular, codificado por el gen *sfIA* (o *sula*) (Huisman *et al* 1984). Su síntesis después de tratamientos que dañan el ADN causa una parada rápida de la división celular, y en consecuencia, se mantienen todos los cromosomas juntos en la misma célula. Es posible que esto aumente la posibilidad de la reparación por recombinación, aunque los mutantes *sfIA*⁻ no son especialmente sensibles a los agentes que dañan el ADN.

d.4.4.- FUNCIONES DE LETALIDAD

Una manifestación SOS singular es el cese de respiración durante cerca de una hora después de la irradiación con UV. Esto podría ser un signo de muerte celular. Quizás la supervivencia de la especie se incrementa si las células severamente dañadas (cuyo ADN no puede ser reparado en un espacio de tiempo dado) cesan de consumir los nutrientes ambientales.

d.4.5.- FUNCIONES DE RECUPERACION

Varias funciones SOS parecen jugar un papel en la fase de recuperación (Rev. D'Ari 1985). Cuando el daño en el ADN ha sido reparado, las horquillas de replicación preexistente reasumen la síntesis, y aparte se establecen nuevas horquillas en el origen de replicación *oriC* (Witkin 1976). Así, la proporción de masa de ADN que disminuye cuando se interrumpe la síntesis de ADN vuelve rápidamente a sus valores normales. Otra manifestación que aparece cuando se ha restablecido la síntesis de ADN es la replicación estable de ADN, incluso en ausencia de síntesis de proteínas. Esta replicación estable no requiere la proteína normal de iniciación DnaA y puede incluir reiniciaciones en orígenes secundarios.

Dentro de este apartado se puede incluir también la propia proteína LexA. Después del daño al ADN la tasa de transcripción del gen *lexA* es alta, aunque la concentración de la proteína LexA es baja debido a su escisión proteolítica por la RecA activada. Cuando la síntesis de ADN se restaura, desaparece la activación de la proteína RecA y por tanto la rotura del represor. La alta tasa de transcripción conduce a una rápida acumulación de LexA y represión de los operones SOS.

d.4.6.- FUNCIONES DESCONOCIDAS

El producto del gen *himA* está involucrado en la integración del profago λ y en el crecimiento lítico del fago Mu, pero su utilidad en el metabolismo bacteriano es desconocida.

Otros cuatro genes adicionales *dinA*, *dinB*, *dinD* y *dinF* codifican funciones SOS, como se ha visto en estudios de fusión de operón, pero su papel es desconocido.

d.4.7.- INDUCCION LISOGENICA

Aunque es una de las manifestaciones SOS con las que se inició el estudio de este sistema y ha jugado un papel central en él, la inducción lisogénica no parece guardar relación con el supuesto propósito de las funciones SOS, esto es, aumentar la supervivencia celular después de tratamientos que dañan el ADN. Se ha sugerido (Little y Mount 1982) que sea más bien una adaptación del virus, el cual reconoce a través de un indicador (la proteína RecA activada a proteasa) que la célula se encuentra en problemas. Los profagos no se inducen en el hospedador *recA⁻*, ni espontánea ni inducidamente, lo que indica el papel esencial de la proteína en la inducción. Los profagos no están reprimidos por LexA sino por represores codificados por el fago altamente específicos, que (al menos en el caso de λ , P22 y 434) presentan homología con LexA, y son escindidos por la proteasa RecA también en un enlace -ala-gly- (Hori et al 1981; Sancar et al 1982; Roberts y Devoret 1983).

d.4.8.- FUNCIONES SOS EXTRACROMOSOMICAS

Los fagos moderados no son los únicos agentes extraños conectados al circuito cromosómico SOS. Un cierto número de plásmidos que se dan naturalmente presentan genes que están directamente reprimidos por LexA. Entre estos, hay algunas bacteriocinas inducibles -colicina E1, E2, Ib y cloacina DF13- y, como ya se ha visto, genes análogos funcionalmente a *umuC* y *umuD*, que confieren una mayor resistencia al UV y una mayor mutabilidad (Rev. Walker 1984).

e.- LA RESPUESTA ADAPTATIVA

La respuesta adaptativa es un proceso inducible capaz de reponer las lesiones producidas en el ADN de *E. coli* por exposición de las células a bajas concentraciones de agentes alquilantes tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). La población celular se hace entonces resistente a los efectos mutagénicos y letales de una posterior exposición a altas dosis de MNNG y otros agentes alquilantes. Esta vía de reparación puede actuar sobre lesiones producidas por agentes alquilantes o etilantes. Requiere la síntesis "de novo" de proteínas y es independiente del sistema SOS.

La principal lesión mutagénica producida por los agentes alquilantes es el O⁶-metilguanina, que causa el apareamiento erróneo con la timina. Esta lesión es eliminada específicamente durante la adaptación. La 3-metil-adenina es otro producto de la metilación, también eliminado durante esta respuesta inducida.

Este sistema está bajo el control positivo del gen *ada*. Durante la respuesta se inducen al menos dos enzimas: la 3-metil-adenina ADN polimerasa II y la O⁶-metilguanina ADN metil-transferasa; esta última es también el producto del gen *ada* (Rev. Walker 1984; 1985; Defais 1985).

f.- SISTEMA INDUCIBLE POR SHOCK POR CALOR

El sistema de shock por calor es independiente de la red regulatoria SOS y de la respuesta adaptativa. No obstante algunos genes de este sistema son inducidos por agentes que determinan la expresión de las funciones SOS. No está claro sin embargo el papel fisiológico de



las proteínas que codifican (proteasas GroEL y DraK) en la respuesta SOS, ni si la señal inductora del sistema de shock por calor incluye algún tipo de daño al ADN. Este sistema está bajo el control positivo del gen *htpR* (Rev. Walker 1984).

ESTUDIOS DE LOS MECANISMOS DE REPARACION EN RHIZOBIUM.

Son escasos los estudios de reparación propiamente dichos en *Rhizobium*. Los primeros datos arrancan del año 1953, en que Kleczkowsky y Kleczkowsky determinaron la fotorreactivación de fagos de *R. leguminosarum* y *R. trifolii*. Posteriormente, en relación a este mecanismo de reparación sólo en 1984, Heuman *et al* citan la presencia del mismo en *Rhizobiaceae*, si bien no aportan datos ni referencias al respecto.

En lo que concierne a otros mecanismos de reparación, Walton y Moseley (1981a) aislan un mutante de *R. trifolii* semejante en sensibilidad a los *uvr*⁻ de *E. coli*, y en la incapacidad de reactivar fagos irradiados. Ballesteros (1980) obtiene también mutantes similares a los anteriores en *R. meliloti*.

Better y Helinski (1983) por su parte aislan e identifican el gen *recA* de *R. meliloti* por complementación específica, mostrando la homología estructural y funcional, en recombinación homóloga y supervivencia al UV, con el gen *recA* de *E. coli*. Estos autores observan que mutantes *recA*⁻, más sensibles al UV, no son deficientes en su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis.

Con otro método, basado en la inducción lisogénica, Olasz *et al* (1983) aislan también mutantes *rec*⁻, deficientes en la recombinación homóloga, que son también más sensibles al UV, defectivos en la inducción del fago moderado 16-3 por luz UV, mitomicina C y bleomicina, y que han perdido la actividad SOS responsable de las mutaciones inducidas. No obstante esta semejanza con los *rec*⁻ de *E. coli*, las diferencias cuantitativas de estos mutantes con respecto a los de *E. coli* son significativas.

En relación con las funciones SOS, Heumann et al (1984) indican que tratamientos inductores del sistema SOS llevan a una respuesta inmediata similar a la SOS de *E.coli*, pero el resultado final es diferente. *Rhizobiaceae* no sólo reparan el ADN dañado sino que también producen simultáneamente reordenamientos genéticos y nuevas formas que están, a causa de carotenoides, mejor protegidas frente a la fotooxidación por luz visible, y debido a su alto contenido en G y C, frente al daño por la radiación UV (Heumann et al 1984).

Por otra parte, Walker (1984) cita la presencia de un sistema semejante al SOS de *E.coli* en *R.meliloti*.

OBJETO DEL TRABAJO

Vista la importancia de las especies del género *Rhizobium* en la fijación de nitrógeno, todos los estudios genéticos que conduzcan a un mejor conocimiento de la simbiosis, y en consecuencia, a un mejor aprovechamiento del valor potencial de esta asociación, están altamente justificados.

Para llevar a cabo cualquier análisis genético es necesaria la obtención previa de mutantes. Como se ha visto anteriormente, son varios los sistemas inducibles que conducen a la formación de mutaciones en *E.coli*. Sin embargo, el número de mutaciones producido no depende solo de estos sistemas, sino que también va a venir dado por la eficacia con que actúen los otros mecanismos de reparación libre de error sobre las lesiones producidas en el ADN. El conocimiento de los distintos sistemas de reparación que actúan en la célula, aparte de ser interesante por sí mismo, permitirá una mejor utilización de los métodos y condiciones de mutagénesis.

Por este motivo, el objeto de este trabajo ha sido establecer la existencia de los distintos mecanismos de reparación presentes en *R. meliloti*. Concretamente, ha consistido en la determinación de los mecanismos de fotorreparación, reparación por escisión-resíntesis, reparación por recombinación y sistema SOS a través del estudio de fenómenos relacionados con cada uno de estos mecanismos que indiquen su presencia o ausencia y su contribución a la recuperación de las células dañadas por distintos agentes.

MATERIAL Y METODOS



RAZAS BACTERIANAS Y BACTERIOFAGOS

Las diferentes razas bacterianas y bacteriófagos utilizados en este trabajo, así como sus características más relevantes y referencias vienen indicados en la tabla 1.

MEDIOS DE CULTIVO

El medio base utilizado para la conservación de las razas de *Rhizobium* ha sido el medio 79 de Allen (1951) modificado, cuya composición se detalla a continuación:

K ₂ PO ₄ H	0.6 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr
CaCO ₃	3.0 gr
NaCl	0.2 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 gr
Manita	7.6 gr
Glucosa	2.4 gr
Extracto de levadura (BBL)	1.0 gr
Agua	1000 ml
Agar	18.0 gr

Se ajusta si es necesario el pH a 6.5-7 y se esteriliza durante 30 minutos a 115°C. Estas condiciones de pH y esterilización son las mismas para los demás medios.

El medio base utilizado en los distintos experimentos ha sido el YGT tanto para el crecimiento de *Rhizobium* en medio líquido como para recuento en placa:

Tabla 1.- Bacterias y Bacteriófagos utilizados

Razas bacterianas y bacteriófagos	Características relevantes	Referencia
<i>Rhizobium meliloti</i>		
GR4 (Rm4)	Raza silvestre: Nod ⁺ Fix ⁺	1
Mutantes derivados		
GR4B	Nod ⁺ Fix ⁺ . Compacta	1
GRP4 (Rm4C)	Nod ⁺ Fix ⁺ , obtenido por tratamiento con naranja de acridina, curada de plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	2
Rm2	Raza silvestre: Nod ⁺ Fix ⁺	1
Rm2 (AL1)	Rm2 lisogenizada con el fago AL1	3
AK631 (Rm41)	Raza silvestre: Nod ⁺ Fix ⁺	4
UR-1	Mutante derivado de L5.30, posible <i>pgi</i> ⁻ , con pasos del metabolismo de azúcares bloqueados.	5
<i>R. leguminosarum</i>	Raza silvestre: Nod ⁺ Fix ⁺	1
<i>R. trifolii</i>	Raza silvestre: Nod ⁺ Fix ⁺	1
<i>Escherichia coli</i> U9	Prototrofa. Hfr. K ₁₀ . <i>phoA</i> ⁻	6
Bacteriófagos		
DF2	Virulento; Lisa GR4, GR4B, GRP4, Rm2 y UR-1	7
AL1	Moderado; Lisa GR4, GR4B y Rm2.	7

Referencias.- (1) Estación experimental del Zaidín. Granada. (2) Palomares 1975. (3) Este trabajo. (4) Banfalvi et al 1981. (5) Arias et al 1979. (6) Este laboratorio. (7) Corral et al 1978.

Glucosa	1.5	gr
Triptona (BBL)	0.5	gr
Extracto de levadura (BBL)	0.25	gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.06	gr
Agua destilada	100	ml
Agar (para medio sólido)	1.8	gr

En los experimentos de influencia del medio de crecimiento se ha utilizado también el medio E3:

A) KPO ₄ H ₂	0.5	gr
K ₂ PO ₄ H	0.5	gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3	gr
ClNa	0.1	gr
Manita	5.0	gr
Glucosa	5.0	gr
Glutamato Na	0.1	gr
Agua destilada	1000	ml
Agar (en medio sólido)	18.0	gr

B) CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0	gr
FeCl ₃	0.05	gr
Agua destilada	100	ml

Esterilizar A y B por separado. Añadir a la solución A la cantidad necesaria de la B para una dilución 1:100 y mezclar bien.

En los ensayos de purificación, enriquecimiento y titulación de fagos, se han usado los medios YGT y mC. La composición de este último se detalla a continuación:

K ₂ PO ₄ H	0.5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr
NaCl	0.1 gr
Casaminoácidos	1.5 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 gr
Agua destilada	1000 ml

Para la preparación de medio semiblando, el agar se adiciona a la concentración del 0.7% y para la del medio sólido, al 1.8%.

Los cultivos de *E.coli* se han llevado a cabo en LB (Luria-Bertani) y LB sólido:

Triptona	1.0 gr
Extracto de levadura (BBL)	0.5 gr
NaCl	0.5 gr
Agua destilada	100 ml
Agar (para medio sólido)	1.5 gr

TAMPONES

Tampón fosfato 0.1M

KH ₂ PO ₄	13.9 gr/1000 ml
K ₂ HPO ₄	17.4 gr/1000 ml

Este tampón se preparó a pH 7.2 tomando 10 ml de la solución de KH₂PO₄ y 40 ml de K₂HPO₄.

Tampón Tris-maleato 0.05M (Jiménez Sánchez 1974)

Solución A: Tris-hidroximetil-aminometano	0.2 M
Acido maleico	0.2 M

Solución B: NaOH	0.2 M
------------------	-------

Se mezclan 50 ml de solución A y 56 ml de solución B, se ajusta el pH a 6.5 si es necesario, y se añade agua hasta 200 ml. El tampón se esteriliza por filtración.

ANTIBIOTICOS Y DROGAS

Estreptomicina, sulfato (Sm)(CEPA) 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Rifampicina (RF) (SIGMA) 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Novobiocina (Nb)(BOEHRINGER MANHEIM) 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Acriflavina (AF)(SIGMA) 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Cafeína (CF)(MERCK) 1 $\text{mg}.\text{ml}^{-1}$; Nitrosoguanidina (NTG)(SIGMA) 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Mitomicina C (MTC)(SIGMA) 0.1-5.0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

Alternativamente se prepararon soluciones concentradas en etanol o en agua y se conservaron repartidas en alícuotas a -20°C .

CONSERVACION DE LAS RAZAS BACTERIANAS

Se han utilizado los medios correspondientes ya indicados, manteniendo los cultivos en medio sólido a 4°C , en estria o en picadura, con pases de seis meses.

OBTENCION DE SUSPENSIONES DE FAGOS DE ALTO TITULO

Tubos con 5 ml de YGT fueron inoculados con 0.1 ml de cultivo crecido de la estirpe en estudio, y con 0.3 ml de una suspensión de fago. Después de inocularlos 12 horas a $28-30^{\circ}\text{C}$ y en agitación se

procedió a la titulación en medio mC por el método de la doble capa: A tubos con 2.5 ml de mC semiblando y mantenidos a 45°C se adicionan 0.3 ml de un cultivo crecido de la raza de *R. meliloti* apropiada (Rm2, GR4 o GR4B) y 0.1 ml de las diluciones de una suspensión del fago. Se agita la mezcla y se vierte sobre placas de mC sólido como base, incubándose a 28°C durante 24-36 horas. Se escogieron las placas que presentaron halos confluentes (6 por cada proceso de purificación) recogiendo las capas de agar blando y pasándolas a 20 ml de SO₄Mg 0.1M. Se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, y a continuación se centrifugó la suspensión a 7000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los restos de agar y restos celulares. El sobrenadante se recogió y se añadió a 90 ml de SO₄Mg 0.1M. Esta suspensión de fagos se titula igualmente por el método de la doble capa.

Este método, si bien no elimina totalmente los restos del medio de enriquecimiento, al ser utilizado como tal el medio mC, y debido a los pases por las soluciones de SO₄Mg, garantiza la homogeneidad de las curvas de supervivencia de unos experimentos a otros. Por otra parte, permite la obtención de títulos finales elevados de unidades formadoras de placas líticas (ufp) (1×10^{10} - 1×10^{11} ufp.ml⁻¹)

OBTENCION DE RAZAS LISOGENICAS

Se picó en el centro de las placas de lisis de AL1 sobre la estirpe Rm2, donde había crecimiento bacteriano, y se sembraron varias placas con medio YGT, a fin de obtener colonias separadas.

Se picaron cuatro de estas colonias y se sembraron en YGT líquido. Después de incubar 18 horas en agitación y a 28-30°C, se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos; los sobrenadantes se titularon y los sedimentos se diluyeron convenientemente, se sembraron en placa e incubaron. Una vez crecidas las razas elegidas, es decir, las que die-

ron lugar a placas de lisis al titular los sobrenadantes, se pasaron a tubos de semilla.

TRANSPARENCIA DE LOS CULTIVOS

Cultivos de *R. meliloti* en fase estacionaria (aproximadamente 3×10^8 células.ml⁻¹) se diluyeron en una proporción 1:100 y 1:1000 en una solución de SO₄Mg 0.1M. Estas suspensiones se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos a fin de eliminar los restos de medio que puedan absorber la radiación UV, y se resuspendieron en el mismo volumen de SO₄Mg 0.1M. Se tomaron muestras de 3 ml y se midió la absorbancia de las mismas al UV en cubetas de 1cm de recorrido óptico. La longitud de onda usada en estas medidas, 254 nm, es a la que emite mayoritariamente la lámpara germicida (alrededor del 95% del total de la emisión)

CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Cultivos crecidos de la estirpe a ensayar se diluyeron en medio YGT y se incubaron a 28°C y en agitación hasta alcanzar la densidad óptica adecuada a 730 nm: alrededor de 0.1 para células en fase logarítmica (1×10^8 células.ml⁻¹ aproximadamente) y de 0.7 para células entrando en fase estacionaria (alrededor de 1×10^8 células.ml⁻¹) y por encima de 0.8 para células en fase estacionaria bien establecida (de 2 a 3×10^8 células.ml⁻¹).

Se tomaron 4 ml de dichos cultivos, se lavaron dos veces en tampón fosfato 0.1M o en una solución de SO₄Mg -según experimentos-, y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón o solución lavadora. A continuación se diluyó 1:10 para los cultivos en fase logarítmica y 1:100 para los en fase estacionaria, en el mismo tampón o solución. Se repartieron muestras de 3 a 6 ml en placas de Petri de 5 cm de diáme-



tro, volúmenes en los que las suspensiones diluidas son todavía transparentes a la luz UV.

Las distintas alícuotas se irradiaron con agitación suave y en oscuridad, con diferentes dosis de luz UV, emitida por una lámpara germicida Sylvania, a una fluencia de $0.25 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, según calibración con un YSY-Ketbering Radiometer (Model C5A-Yellow Spring Instruments CO).

Inmediatamente después de la irradiación, se procedió a la siembra de alícuotas de 0.1 ml de la dilución apropiada.

Todo el ensayo tuvo lugar en oscuridad o bajo luz amarilla, a fin de evitar la fotorreactivación.

TRATAMIENTOS CON MITOMICINA C (MTC)

Cultivos en fase logarítmica ($DO_{730} \approx 0.1$) se lavaron dos veces en tampón fosfato 0.1M a fin de eliminar el medio de cultivo, y se resuspendieron en tampón al volumen inicial. Estas suspensiones se diluyeron 1:10 en el mismo tampón, y se repartieron en alícuotas de 2 ml, a las que se adicionó diferentes cantidades de una solución madre de MTC ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

Después de incubarlas a 30°C durante 30 minutos con agitación suave y protegidas de la luz, se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos, y se lavaron en tampón fosfato. Se resuspendieron al volumen inicial (2 ml) y se procedió a la dilución y siembra inmediatas.

OBTENCION DE MUTANTES SENSIBLES AL UV

Se han empleado diferentes métodos a fin de obtener mutantes que fueran en principio sensibles al UV, para una posterior caracterización de los mismos.

En el primer método seguido (Ballesteros 1980) se sometieron cultivos celulares a luz UV en la forma habitual, administrándoles una dosis que diera lugar a un nivel de supervivencia de 10^{-3} . Después de cinco días de incubación se llevaron a cabo dos réplicas de las colonias supervivientes. Una se mantuvo como control y la otra se sometió a una dosis de UV (12 J.m^2) para la cual la estirpe silvestre es resistente de forma natural, esto es, mantiene aproximadamente el 100% de supervivencia. Después de dos días de incubación, se seleccionaron las réplicas con ningún o muy escaso crecimiento en comparación con el control. Las réplicas seleccionadas se sometieron a un nuevo ciclo de dosis UV, réplica y selección para comprobar la estabilidad del carácter de sensibilidad al UV.

Otro método usado ha sido el denominado método del suicidio (Howard-Flanders y Theriot 1962). En éste se sometieron los cultivos celulares a un tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina (Goicoechea 1981): un cultivo en fase logarítmica de crecimiento ($\approx 10^8$ células. ml^{-1}) se centrifugó y lavó dos veces en tampón tris-maleato, resuspendiéndose finalmente en el volumen inicial de tampón. Se añadió NTG a una concentración final de $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$, y se incubó durante 30 min a $28^\circ\text{-}30^\circ\text{C}$. A continuación se lavó dos veces con una solución de Tween 80 al 0.1% en agua destilada, resuspendiéndose finalmente en medio líquido fresco.

El cultivo así mutagenizado se llevó a incubar para permitir la segregación de mutantes y después de 24 horas se sembraron placas con 500-1000 unidades formadoras de colonias (ufc) por placa y se dejó in-

cubando nuevamente otras 24 horas. Transcurrido este tiempo, se vertieron sobre las placas, en las que aún no son visibles las colonias, 2.5 ml de medio blando fundido y mantenido a 45°C, a los que se había inoculado alícuotas de suspensión de fagos DF2 irradiados (concentración final 10^8 ufp.ml⁻¹). Tras la incubación correspondiente, sólo deben aparecer aquellas colonias que sean procedentes de células resistentes al DF2 o carentes de sistemas de reparación que no han podido reactivar a los fagos dañados infectantes.

Se seleccionan, por tanto las colonias aparecidas y se comprueba su carácter de resistencia al fago DF2 y de sensibilidad a la radiación UV

Se aplicó igualmente una variación de este método del suicidio, descrita por Walton y Moseley (1981). Un lisado del fago DF2 con un título de 10^{10} ufp.ml⁻¹ se expuso a una dosis de UV tal que produjo un nivel de supervivencia de 10^{-3} . Se puso en contacto con un volumen igual de un cultivo en fase logarítmica (10^8 ufc.ml⁻¹), previamente mutagenizado y crecido para permitir la segregación de la mutación; se mantuvo en agitación suave y a 28° durante 30 minutos para lograr la máxima adsorción y a continuación se sembraron alrededor de 1000 bacterias por placa. Después de 3-4 días de incubación, se realizaron réplicas en placa, sometiendo la diferentes réplicas a 0, 15, 30 y 60 J/m² para identificar los clones sensibles al UV.

El último método utilizado sobre la estirpe GR4 parte del tratamiento mutagénico arriba descrito. Tras éste, se sembraron medios con y sin mitomicina C ($1\mu\text{g.ml}^{-1}$). Este compuesto produce entrecruzamientos de cadenas del ADN para cuya reparación se requiere la intervención de los genes involucrados en la reparación por escisión y la reparación por recombinación (Cole y Sindem 1975). Los mutantes deficientes en alguno de los dos sistemas no crecerán en las placas adicionadas de la droga, haciéndolo en las placas testigo. Las colonias



seleccionadas se comprueban para el carácter sensibilidad a la mitomicina C y a la radiación UV.

ESTUDIOS DE REPARACION CON CULTIVOS CELULARES

FOTORREACTIVACION

Los cultivos en fase logarítmica o estacionaria fueron irradiados con distintas dosis de luz UV, según el método anteriormente descrito. Trás la irradiación, las suspensiones bacterianas se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó como control, en oscuridad o bajo luz amarilla, para la determinación de la supervivencia celular, la otra alícuota fue sometida a radiación con luz fotorreactivante. Para esta segunda irradiación se han seguido varios métodos a lo largo de los diferentes experimentos, de acuerdo con las diferentes modalidades observadas en la bibliografía.

Así, antes de la exposición bajo la radiación fotorreactivante, algunas veces se dejaron transcurrir 20 min, en los que las suspensiones permanecieron en oscuridad, para permitir la unión de la enzima fotorreactivante a los dímeros de pirimidina.

La duración de la exposición a luz fotorreactivante varió entre 50 y 90 min, a fin de determinar el tiempo más adecuado.

Las lámparas utilizadas para la emisión de radiación fotorreactivante han sido:

- lámparas de luz de día (4x100W a 21 cm de distancia, o 1x60W a 12 cm de distancia).
- lámpara de luz negra EYE MERCURY LAMP H125.BL-GES de EYE.IWASAKI ELECTRIC CO. LTD.

Otro método utilizado consistió en someter placas sembradas con distintas diluciones de la suspensión irradiada con UV a iluminación con luz negra durante 1h, mientras que otras sembradas con las mismas diluciones se mantuvieron en oscuridad, para la determinación del nivel de supervivencia inicial. Estas placas se protegieron o no con cristal, que absorbe longitudes de onda de UV lejano, dañinas a las células.

ESTUDIO DEL EFECTO DE INHIBIDORES

Suspensiones procedentes de cultivos en fase logarítmica fueron tratadas e irradiadas tal como se ha descrito en el apartado curvas de supervivencia. Inmediatamente después de la irradiación, alícuotas de 0.1 ml de las diluciones apropiadas fueron sembradas en medio YGT adicionado o no de inhibidor.

Las drogas utilizadas fueron cafeína ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), acriflavina ($0.1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y novobiocina ($2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Una vez sembradas las placas fueron llevadas a incubación a 28°C durante 4-5 días para todos los medios excepto para los adicionados con cafeína, que requieren 1 ó 2 días más de incubación. La concentración de cafeína empleada no afecta la viabilidad de las células no irradiadas, pero sí su velocidad de crecimiento.

RECUPERACION POR MANTENIMIENTO EN LIQUIDOS (LIQUID HOLDING RECOVERY)

Se tomaron alícuotas de 3 ml de suspensiones celulares irradiadas en solución salina (solución salina fisiológica o tampón fosfato 0.1M) según el protocolo de curvas de supervivencia, y se pasaron a tubos estériles. Se llevaron a incubar a $28-30^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, y se sembraron alícuotas de las diluciones adecuadas a intervalos de tiempo regu-

lares. Después de 4-5 días de incubación se procedió al recuento de ufc.ml⁻¹.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA

Para estudiar el efecto de la temperatura como condición de post-irradiación en la supervivencia de cultivos irradiados, se usaron dos modalidades:

Los cultivos en fase estacionaria fueron tratados e irradiados según la forma habitual. Después de la irradiación con distintas dosis se procedió a la siembra de 15 alícuotas por dilución, y las placas sembradas se llevaron a incubar en grupos de 3 placas por dilución, de la siguiente forma: un lote a 30°C, dos a 20°C y los otros dos a 40°C. La incubación a estas temperaturas no óptimas se mantuvo durante 3 y 10 horas, transcurridas las cuales, se llevaron las placas a la estufa de 30°C, donde se incubaron los 4-5 días habituales.

La otra modalidad estudiada para la observación del efecto de la temperatura consistió en irradiar los cultivos en la forma ya establecida y sembrar alícuotas de las diluciones apropiadas formando dos lotes de 3 placas por dilución cada uno de ellos. Un grupo se llevó a incubar a 37°C y el otro a 30°C. Después del tiempo adecuado para la aparición de colonias, se procedió a su recuento.

FILAMENTACION

Una vez que las distintas suspensiones celulares fueron irradiadas o tratadas con MTC, se tomaron alícuotas de 1 ml y se inocularon en 4 ml de YGT precalentado a 30°C, llevándose a continuación a incubar a esta misma temperatura y en agitación. El crecimiento filamento-

so fue observado a las 8-12 horas de incubación, siendo 10 horas el tiempo óptimo para ello.

DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MUTACION INDUCIDA

Cultivos de GR4B irradiados con distintas dosis de UV o tratados con distintas concentraciones de MTC, se lavaron y se resuspendieron en YGT fresco al volumen inicial. Estas suspensiones se mantuvieron a 30°C durante el tiempo necesario para replicarse seis o siete veces como mínimo, de forma que la mutación producida pueda expresarse fenotípicamente (Walton y Moseley 1981a). A continuación se sembraron alícuotas de 0.1 ml de las diluciones apropiadas en medio YGT, a fin de determinar el número de supervivientes, y alícuotas de 0.1 ml de la suspensión, sin diluir, en medio YGT adicionado de estreptomycin (500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) o de rifampicina (50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), para la determinación de la tasa de mutación. Esta viene dada por el número de Sm^r o Rf^r por cada 10^7 supervivientes.

ESTUDIOS DE REPARACION CON FAGOS

CURVAS DE INACTIVACION DE FAGOS

Suspensiones de fagos purificados se dividieron en alícuotas de 15 ml y cada una de ellas se irradió en agitación suave con distintas dosis de luz UV. Las suspensiones irradiadas se pasaron a tubos estériles, y se les añadió cloroformo al 10% (v/v) para su conservación a 4°C. Es aconsejable que para los distintos experimentos con estas suspensiones irradiadas, dicha conservación no sobrepase las 3-4 semanas.

La determinación de las curvas de inactivación de los fagos se llevó a cabo por el método de la doble capa, añadiendo alícuotas de 0.1 ml de las diluciones apropiadas de cada suspensión irradiada a tubos de 2.5 ml de medio sobrefundido, e inoculados con 0.3 ml de cultivos bien crecidos de la estirpe a ensayar. La mezcla se vertió sobre placas de Petri con una capa base de medio, que después de 15 minutos, se llevaron a incubar. La lectura de los resultados se realizó a las 24-36 horas.

REACTIVACION POR LA CELULA HOSPEDADORA

Para la determinación de este fenómeno, suspensiones de fagos DF2 irradiadas con distintas dosis se diluyeron convenientemente y se repartieron alícuotas de 0.1 ml con aproximadamente 30-300 ufp (2 alícuotas por cada dilución y dosis de irradiación). A éstas se les añadió 1 ml de cultivo de la estirpe en estudio en fase logarítmica media ($DO_{730}=0.1-0.2$) irradiada a su vez o no con una dosis tal que produce un nivel de supervivencia de 1×10^{-2} - 5×10^{-3} . La multiplicidad es así mucho menor de 10^{-2} , y más del 99% de los fagos infecta una sola bacteria. Tras 30 minutos de incubación en agitación para permitir la adsorción, se procedió a la siembra por el método de la doble capa, añadiendo como contraste 0.2 ml de un cultivo bien crecido. La lectura de los resultados se llevó a cabo después de 36-48 horas de incubación.

EFFECTO DE LA CAFEINA EN CURVAS DE INACTIVACION DE FAGOS

Para la observación del efecto de la cafeína en la reparación de fagos irradiados, se siguió el mismo método que el descrito para las curvas de inactivación. Para cada dosis de UV aplicada a la suspensión de fagos, se sembraron alícuotas de 0.1 ml de la dilución apropiada en medio adicionado de cafeína (concentración final 1 mg.ml^{-1}) y en medio

carente de la droga. Las placas de lisis se contaron a las 36-48 horas en las placas de medio sin cafeína, y a las 48-72 horas en las placas que están adicionadas con cafeína.

REACTIVACION POR MULTIPLICIDAD DE INFECCION

Se repartieron alícuotas de 0.5 ml de suspensiones del fago DF2 purificadas e irradiadas con distintas dosis de UV, a las que se añadió 1ml de cultivo en distinta fase de crecimiento ($DO_{730} \approx 0.05$ y 0.5). A una de las alícuotas se le añadió sólo 1 ml de medio de cultivo. Se incubaron a 28-30°C en agitación durante 30 minutos para permitir la adsorción completa, y a continuación se procedió a la siembra de las diluciones adecuadas por el método de la doble capa, añadiendo 0.3 ml de un cultivo bien crecido como contraste. Las placas de lisis se contaron al cabo de las 36-48 horas de incubación. Por otro lado, se llevó a cabo la titulación de los cultivos iniciales para la determinación de la multiplicidad de infección.

REACTIVACION POR UV O REACTIVACION WEIGLE

Se siguió una adaptación del método descrito por Love y Yaskin (1984).

Cultivos de GR4B y Rm2 en fase logarítmica ($DO_{730} = 0.2$) se dividieron en alícuotas, unas que se llevaron a irradiar y otra que se mantuvo como control. Inmediatamente después del tratamiento con UV, se añadió 0.1 ml de la dilución apropiada de fagos no irradiados e irradiados (nivel de supervivencia 1×10^{-4}), y las diferentes alícuotas se llevaron a incubar a 28°C en agitación. Después de 20 minutos, se añadió 2.5 ml de YGT semiblando y fundido, conteniendo 0.1 ml de un cultivo en fase logarítmica como contraste, y cada mezcla se vertió



sobre placas de YGT. Se dejaron solidificar y se llevaron a incubar a 30°C durante 24-36 horas, transcurridas las cuales, se determinó el número de ufp.ml⁻¹.

El factor Weigle (WRF) viene dado por la relación de fagos supervivientes irradiados con una dosis dada cuando infectan células a su vez también irradiadas respecto a los que infectan células no irradiadas.

CINETICA DE LA REACTIVACION WEIGLE

Cultivos de GR4B fueron irradiados con una dosis que permita la máxima reactivación Weigle (22.5 J/m²), repartidos en alícuotas de 0.1 ml, y llevados a incubar a 28-30°C en agitación. Después de diferentes tiempos de incubación, se inoculó a estas muestras de 0.1 ml del cultivo irradiado, 0.1 ml de la suspensión de fagos irradiados. Tras 20 minutos de incubación para permitir la adsorción, se añadió 2.5 ml de YGT semiblando y fundido conteniendo 0.1 ml de cultivo en fase logarítmica de GR4B como contraste. Cada mezcla se vertió sobre placas de YGT. Las placas se incubaron a 30°C durante 24-36 horas, transcurridas las cuales se determinó el número de ufp.ml⁻¹. El WRF deducido se representa en función del tiempo de incubación comprendido entre la irradiación de las células con UV y la infección por el DF2 irradiado.

INDUCCION LISOGENICA

Para estos experimentos se ha seguido el método descrito por Silva y Leitao (1984).

Suspensiones de la estirpe lisogénica de Rm2 (AL1) se lavaron dos veces a fin de eliminar los fagos libres, y se irradiaron con distintas dosis de UV o bien se trataron con diferentes concentraciones de MTC; a continuación se repartieron en diferentes alícuotas de 1.0 ml. Para la detección de fagos libres, se centrifugaron las alícuotas correspondientes 3 minutos a 12000 g en una microfuga Eppendorf, y el sobrenadante se tituló por el método de la doble capa, usando como contraste 0.3 ml de cultivos bien crecidos de Rm2. Para determinar la fracción de células inducidas, se procedió a la dilución inmediata de las suspensiones tratadas y a la siembra en placa (que proporciona el número de ufc.ml⁻¹) y por el método de la doble capa (que indica el número de células que sufre inducción), usando también la estirpe Rm2 como indicadora. La relación entre las ufp detectadas y el número de ufc antes de la irradiación es la que indica la fracción de células inducidas.

Estas medidas de fagos libres y células inducidas se realizaron en distintos tiempos.

CINETICA DE LA INDUCCION LISOGENICA

Cultivos de Rm2 (AL1) fueron lavados y resuspendidos en medio fresco, e irradiados con dosis que produjesen el 50-90% de supervivencia. Después del tratamiento, se llevaron a incubar a 28-30°C en agitación. A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras con las que se determinó el número de fagos libres, ufc y fracción de células inactivadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

CONDICIONES OPTIMAS DE IRRADIACION. TRANSPARENCIA AL UV DE LA SUSPENSION BACTERIANA.

Para asegurar una radiación homogénea, semejante de un experimento a otro, se determinaron previamente las condiciones óptimas de irradiación, esto es:

a.- irradiación de suspensiones bacterianas "cuasi" transparentes al UV. Para ello, la absorbancia o densidad óptica, A, debe ser mucho menor que la unidad ($A \ll 1$). Este requisito se cumple cuando:

a.1. el líquido de suspensión es una solución transparente al UV, como una solución de SO_4Mg 0.1 M o tampón fosfato 0.1 M.

a.2. la concentración de las células en la suspensión oscila entre 5×10^6 y 2×10^7 cel.ml⁻¹, y las capas a irradiar presentan un espesor de uno a tres mm. Esto corresponde a cultivos diluidos 1:10 ó 1:100 según estén en fase logarítmica o fase estacionaria y a volúmenes de tres a seis ml en placas de Petri de 5 cm de diámetro.

b.- agitación suave pero continua de la suspensión bacteriana durante la exposición al UV, de modo que todas las células estén expuestas estadísticamente de igual forma a la misma radiación. Si bien el uso o no de agitación, no altera los resultados en las suspensiones "cuasi" transparentes, sí es fundamental cuando la irradiación se realiza en medio de cultivo.

CURVAS DE SUPERVIVENCIA

La inactivación de una suspensión bacteriana se caracteriza convenientemente por las curvas de supervivencia, que representan la fracción de individuos no inactivados o supervivientes como una fun-

ción de la dosis de UV. Las características de estas curvas para un organismo dado, dependen no sólo de sus propiedades genéticas y fisiológicas específicas, sino también de otros parámetros experimentales externos que influyen a veces en alto grado (Harm 1980).

Así, se observó en primer lugar la importancia del medio de soporte en el cual se llevaron a cabo los experimentos de inactivación. Si éste era medio de crecimiento, por ejemplo, YGT, rico en moléculas absorbentes del UV, las estirpes bacterianas ensayadas se mostraban muy resistentes a la radiación, precisamente por el efecto protector que dichas moléculas ejercen y que se traduce en una supervivencia mucho mayor a la correspondiente a la dosis aplicada en medios transparentes al UV (figura 1 y tabla 2).

Tabla 2.- Niveles de supervivencia de cultivos irradiados con luz UV en medio de crecimiento y en tampón fosfato 0.1 M.

DOSIS UV ($J.m^{-2}$)	MEDIO YGT	TAMPON FOSFATO 0.1M
7.5	9.9×10^{-1}	NP
15	9.7×10^{-1}	8.1×10^{-1}
30	8.8×10^{-1}	4.4×10^{-1}
45	NP	2.6×10^{-1}
60	6.4×10^{-1}	6.5×10^{-2}
75	NP	1.6×10^{-2}
90	4.3×10^{-1}	1.1×10^{-3}

NP= no probado

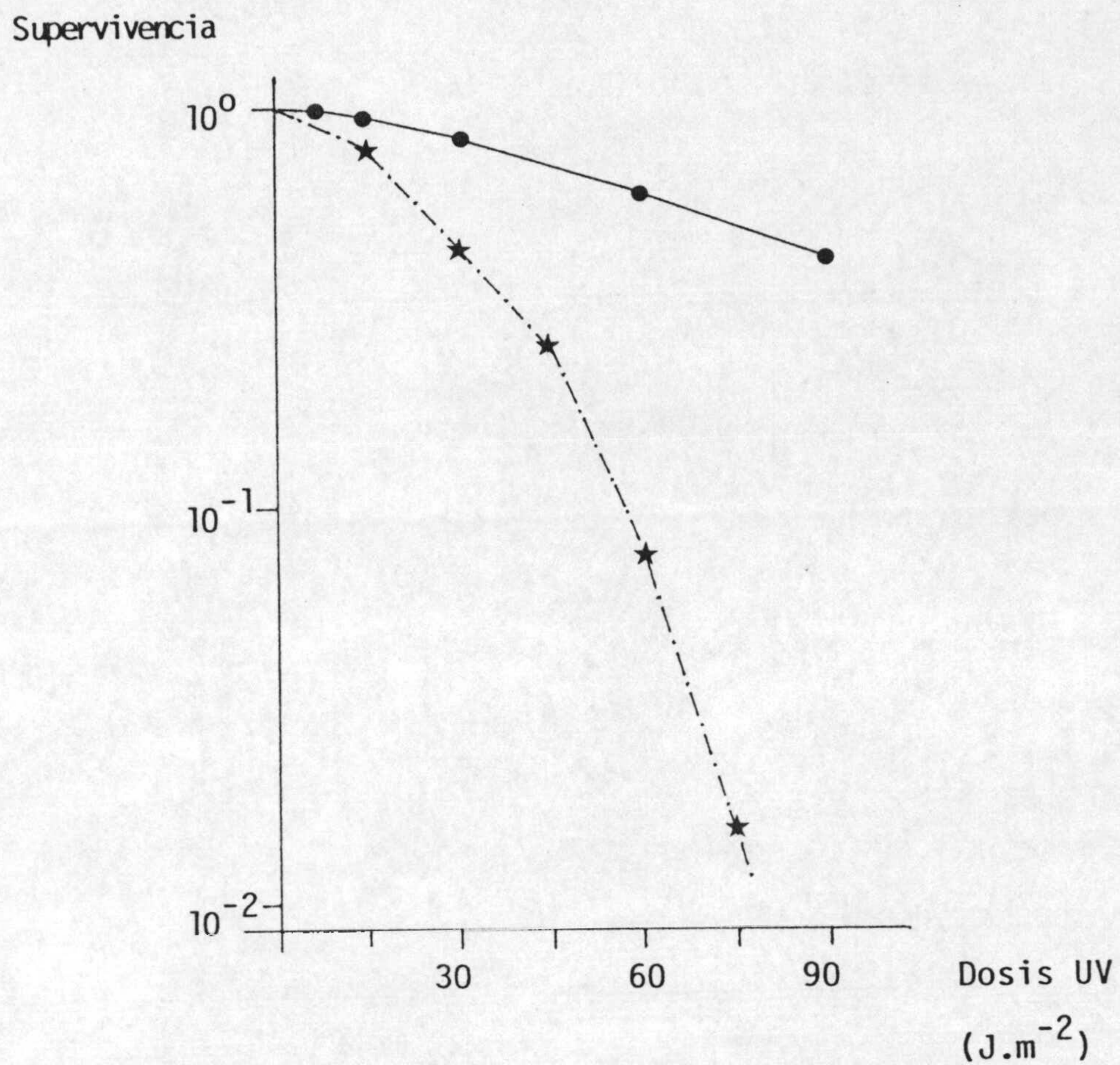


Figura 1.- Efecto del medio de soporte en la supervivencia de cultivos de *R. meliloti* Rm2 en fase logarítmica irradiados con luz UV. (●) YGT, (★) tampón fosfato 0.1 M.

Por otro lado y por esta misma causa, pequeñas variaciones en la composición del medio determinan a su vez variaciones en la sensibilidad a la radiación de unos experimentos a otros. Debido a esto, todos los experimentos de inactivación, a no ser que se indique lo contrario, fueron llevados a cabo utilizando como soporte de los mismos una solución de sales transparente a la UV.

En segundo lugar, otro factor que influye sobremanera en las curvas de supervivencia es el estado fisiológico de las suspensiones irradiadas. Así, como se indica en la tabla 3 y figura 2, existe una clara diferencia en la resistencia celular a la radiación UV entre una suspensión irradiada procedente de un cultivo en fase logarítmica media y otra procedente de otro en fase estacionaria bien establecida. En la zona de transición entre ambos estados de crecimiento, esto es, final de la fase logarítmica-inicio de la fase estacionaria, tanto la densidad óptica del cultivo como el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por ml. varían muy poco y se aproximan mucho a las alcanzadas en fase estacionaria. El grado de inactivación celular en esta zona de transición es intermedio entre los determinados para la fase logarítmica y la fase estacionaria bien establecida, y variable de un experimento a otro según su mayor o menor entrada en la fase estacionaria.

El estado fisiológico celular es uno de los factores que influyen en la efectividad de los mecanismos de reparación; esta variación es debida a que pequeñas modificaciones en la extensión de la reparación llevada a cabo por las células sobre su ADN dañado, pueden alterar considerablemente la porción del hombro de la curva así como la supervivencia total.

Una vez establecidas las condiciones de experimentación, se caracterizaron parcialmente las curvas de supervivencia en los términos de dosis letal media y dosis umbral a partir de la zona en que las

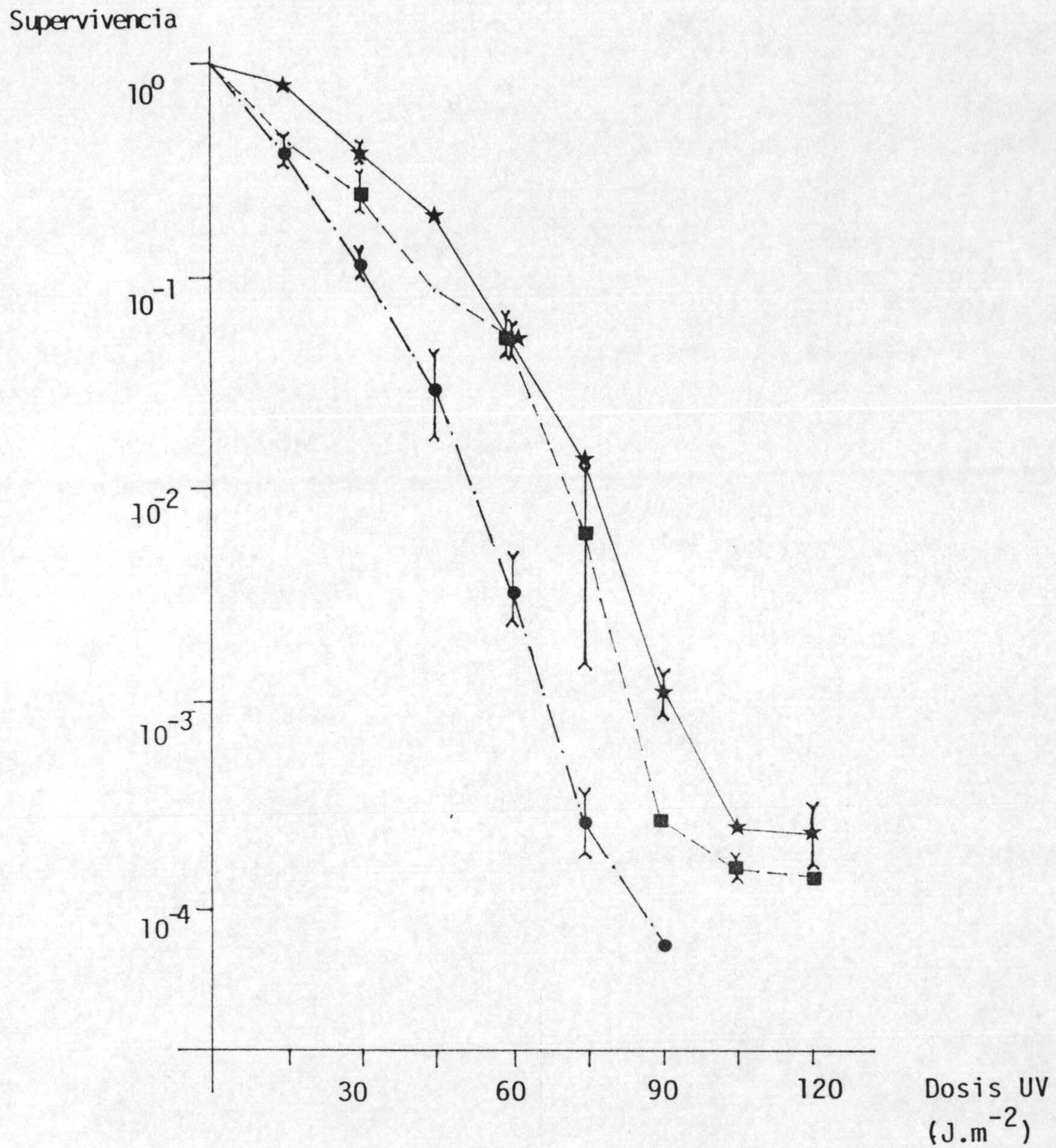


Figura 2.- Influencia del estado fisiológico celular en la sensibilidad a la radiación UV de la estirpe GR4B de *R. meliloti*. (●) Fase logarítmica, (★) fase estacionaria, (■) transición a fase estacionaria.



curvas se hacen exponenciales -línea recta en representación semilogarítmica- (Harm 1980) (figura 3).

Tabla 3.- Nivel de supervivencia de la estirpe GR4B de *R. meliloti* al ser irradiada con luz UV en distintas fases de crecimiento.

DOSIS (J. m ⁻²)	% SUPERVIVENCIA		
	FASE LOG.	EVOLUCION A FASE ESTAC.	FASE ESTAC.
0	1.0×10 ⁰	1.0×10 ⁰	1.0×10 ⁰
15	3.9×10 ⁻¹	4.0×10 ⁻¹	8.1×10 ⁻¹
30	2.0×10 ⁻¹	2.6×10 ⁻¹	3.9×10 ⁻¹
45	3.0×10 ⁻²	8.5×10 ⁻²	2.0×10 ⁻¹
60	3.2×10 ⁻³	5.6×10 ⁻²	4.9×10 ⁻²
75	2.6×10 ⁻⁴	6.6×10 ⁻³	1.3×10 ⁻²
90	7.0×10 ⁻⁵	2.6×10 ⁻⁴	1.1×10 ⁻³
105	ND	1.5×10 ⁻⁴	2.4×10 ⁻⁴
120	ND	1.5×10 ⁻⁴	2.4×10 ⁻⁴

ND= no detectado

La dosis letal media (F_{0.37}) para la parte de línea recta es definida como el incremento de dosis requerido para disminuir la supervivencia por un factor de e⁻¹ (ó 0.368). La estirpe GR4B presenta un valor F_{0.37} de 6 J. m⁻².

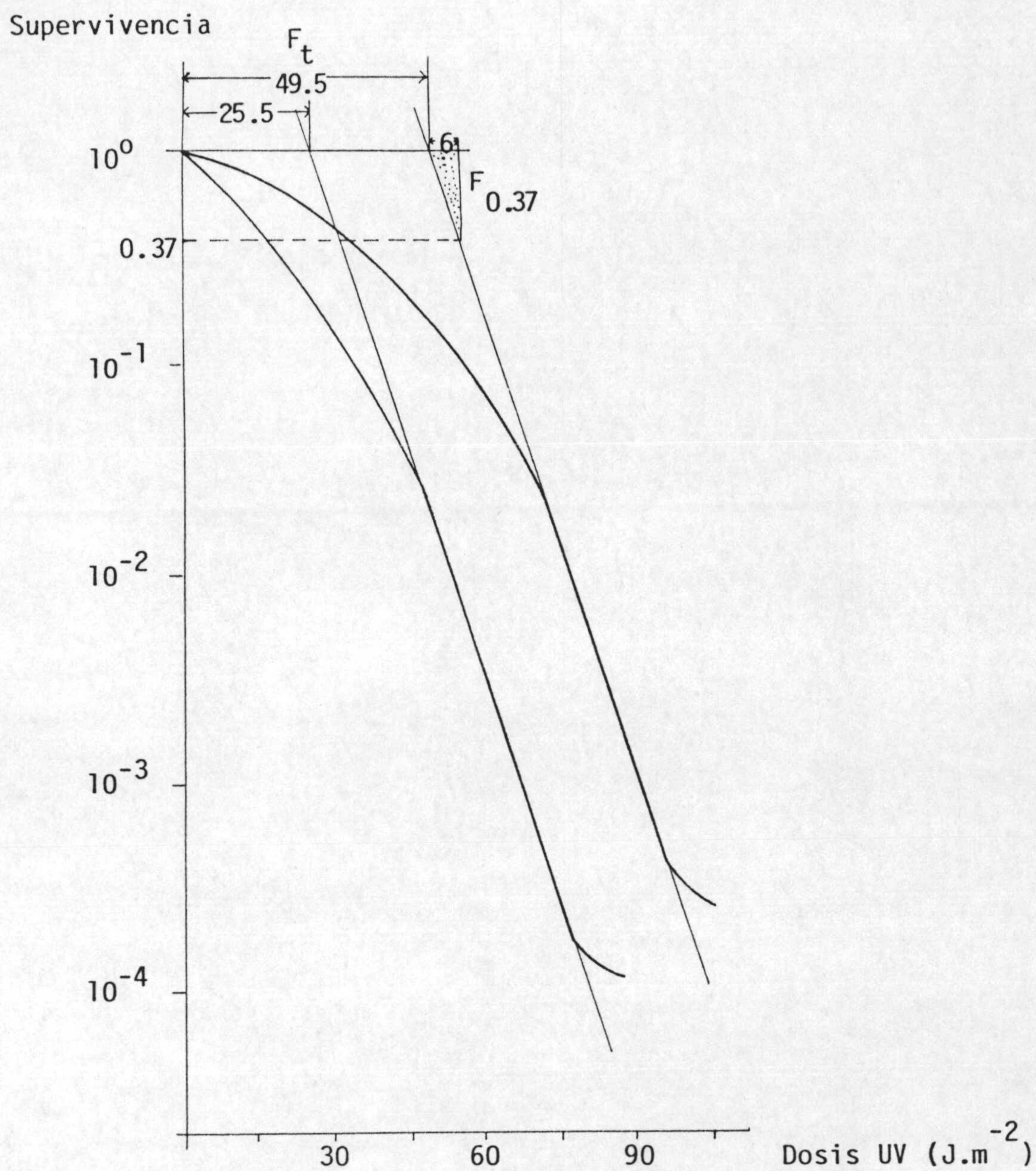


Figura 3.- Caracterización de las curvas de supervivencia de la estirpe GR4B en función de los valores de fluencia letal media ($F_{0.37}$) y fluencia umbral (F_t).

La dosis umbral (Ft -del inglés threshold fluence-) se define como la dosis a la cual la extrapolación de la línea recta de la porción exponencial alcanza el nivel de 100% de supervivencia. Esta dosis umbral expresa la magnitud aproximada de dosis a la cual un sistema biológico puede hacer frente con éxito, independientemente del mecanismo utilizado para ello. El valor de Ft en esta estirpe GR4B es de 25.5 $J.m^{-2}$ en fase logarítmica y de 49.5 $J.m^{-2}$ en fase estacionaria.

ESTUDIOS DE REPARACION

FOTORREACTIVACION

Para comprobar que el método usado en la determinación del fenómeno de fotorreactivación era el adecuado, se utilizó un control positivo, *E. coli* U9, tanto en fase estacionaria como en fase logarítmica. En ambos casos, tras la irradiación con luz UV y toma de la alícuota correspondiente para la determinación del porcentaje de supervivencia, bajo luz amarilla, se dejaron transcurrir 20 min en oscuridad. Este tiempo es suficiente para permitir la unión de la enzima fotorreactivante a los dímeros de pirimidina producidos por la radiación UV (Moss y Davies 1974). A continuación se sometieron las alícuotas a la luz fotorreactivante, en este caso luz negra con protección de cristal para eliminar las longitudes de onda inferiores a 300 nm, presentes en aproximadamente el 3% de la emisión de estas lámparas. Esta emisión se realizó durante 50 min. Este tiempo garantiza el efecto total de la fotorreactivación en *E. coli* (Harm 1968), ya que se indica normalmente una exposición de 30 a 45 min para ella.

Como puede observarse en la fig 4, el tratamiento ulterior con luz fotorreactivante de las células de *E. coli* irradiadas con luz UV, aumenta notablemente su supervivencia; el decremento de la dosis, ΔF (Harm 1980) a la dosis de UV aplicada de 135 J.m^{-2} es de 55.5 J.m^{-2} . Esto es, se alcanza la misma supervivencia que en una suspensión irradiada con 79.5 J.m^{-2} , en ausencia de dicho tratamiento.

Por tanto, las condiciones usadas con *E. coli* eran en principio, adecuadas para la determinación de la existencia del mecanismo de fotorreparación.

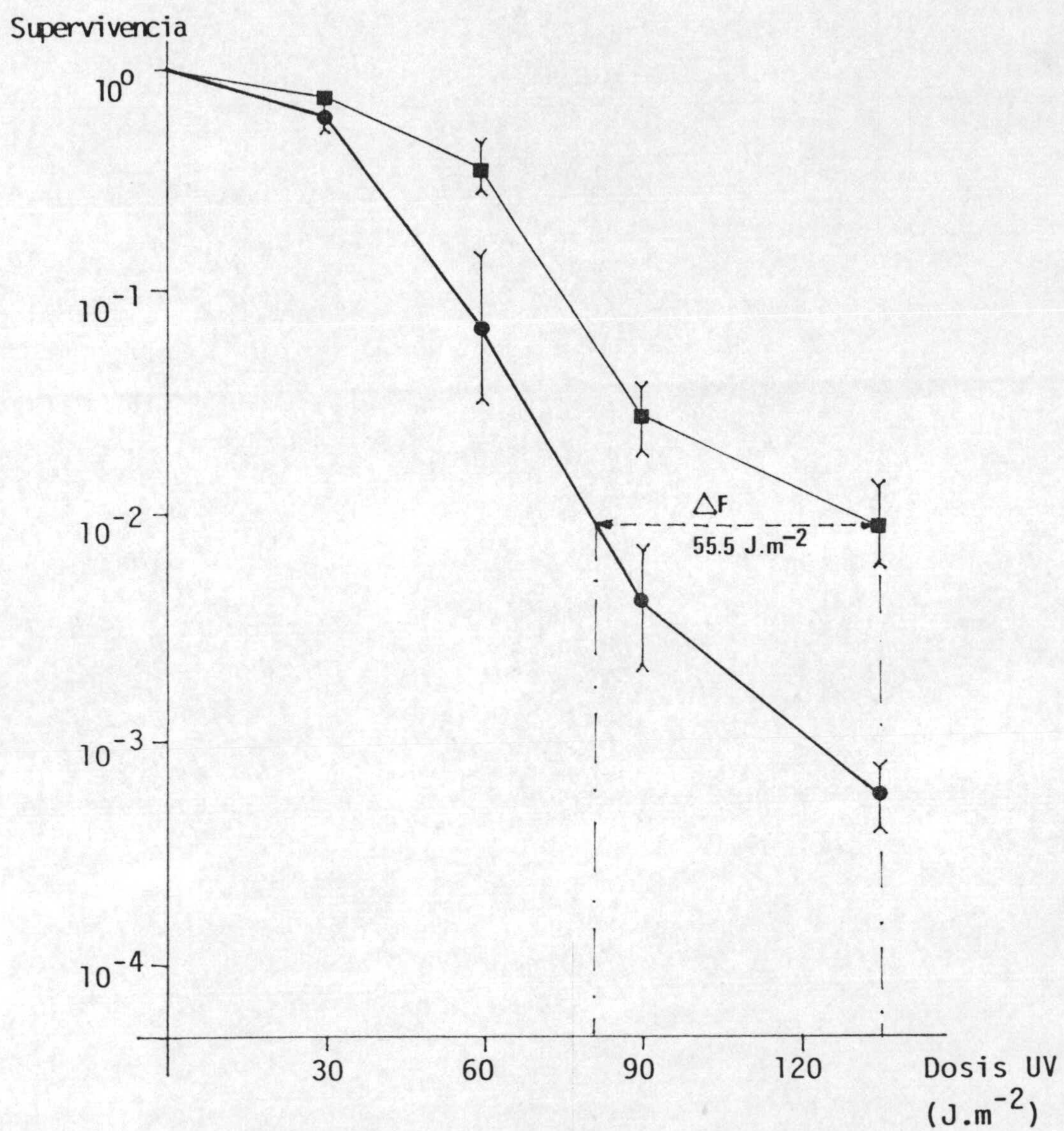


Figura 4.- Curvas de supervivencia de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* U9 irradiados con UV en oscuridad (●) y con irradiación posterior con luz fotorreactivante (■).

Sin embargo, en *R. meliloti* no se ha podido detectar la presencia de este mecanismo de reparación. Esto ha llevado a probar distintas estirpes de esta especie disponibles en la colección, la GR4, GR4B, Rm2, UR1 y Rm41 (AK631), a fin de constatar si esta ausencia del fenómeno era un rasgo común a la especie, o si por el contrario, era propio de una estirpe, posible mutante *phr*- de una original silvestre poseedora del sistema reparador. Por otra parte, también se han probado otras especies diferentes del género *Rhizobium*, como *R. trifolii* y *R. leguminosarum*.

Tal como puede observarse en las figuras 5 y 6, correspondientes a las estirpes AK631, Rm2 y UR1 de *R. meliloti*, y a las especies de *R. leguminosarum* y *R. trifolii* respectivamente, en ninguno de los experimentos llevados a cabo con todos ellos pudo encontrarse un aumento en la supervivencia tras tratamientos con luz negra o con luz del día, posteriores a la irradiación con UV.

Ahora bien, pudiera ser que, debido a las diferencias en los caracteres fisiológicos, genéticos, etc. de estas dos especies, *R. meliloti* y *E. coli*, las condiciones utilizadas en el control positivo no fueran ni las adecuadas ni las suficientes como para permitir la detección clara de la fotorreactivación en *Rhizobium*. En principio, hay una diferencia en el ritmo de crecimiento de ambas especies, ya que *R. meliloti* tiene un tiempo medio de generación de 2h-2h½ en aireación, a 28°C-30°C, en medio de cultivo completo - condiciones habitualmente usadas - frente a los 20-30 min de *E. coli* en aireación, 37°C y medio completo. Esta diferencia en el tiempo medio de generación refleja una distinta actividad metabólica en ambas especies, que podría afectar a la eficacia de la reparación en las condiciones en que se llevaron a cabo los experimentos. Así, por ejemplo, el tiempo dejado en la oscuridad para permitir la unión de la enzima a los dímeros, al igual que el de exposición a la luz

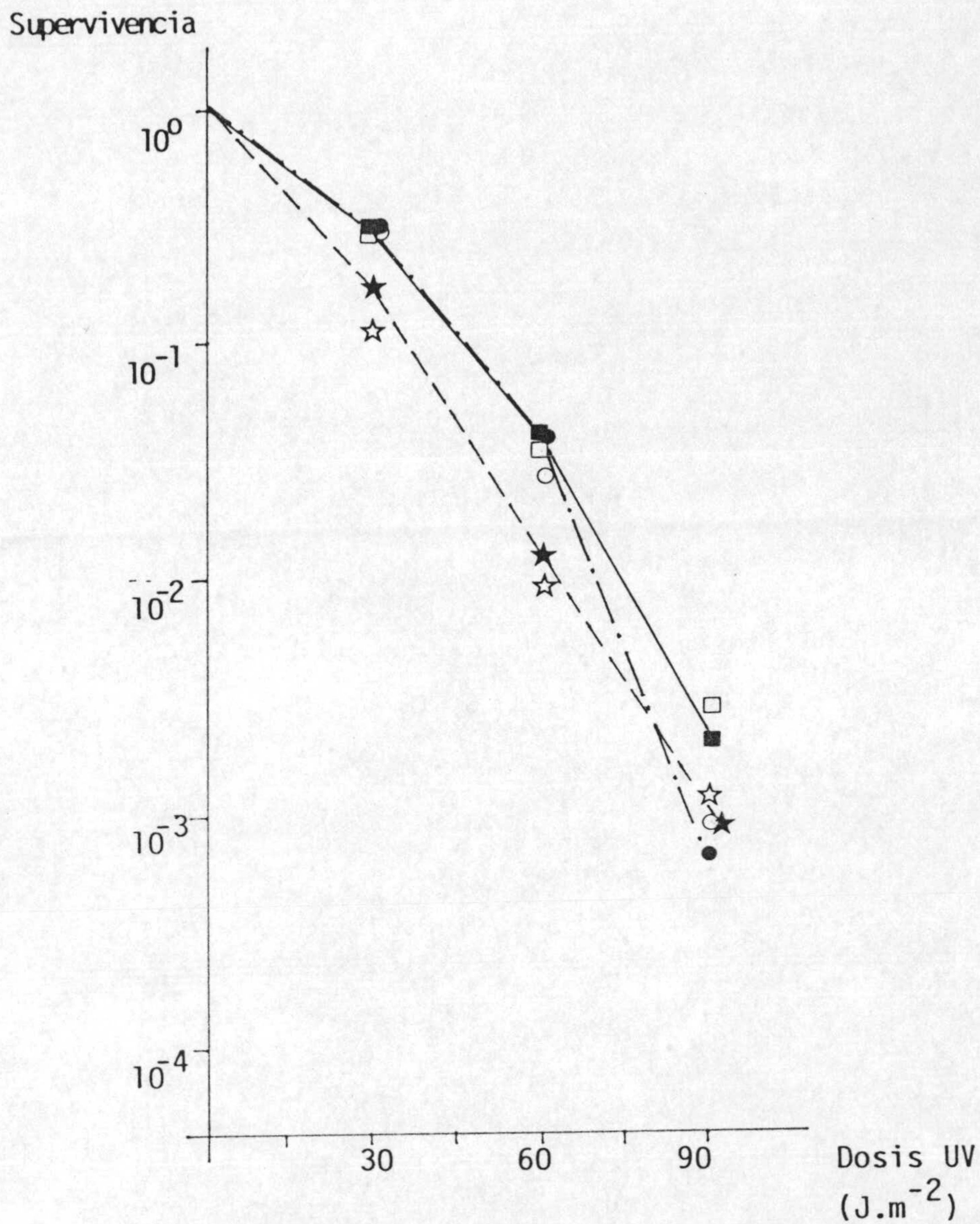


Figura 5.- Curvas de supervivencia de diferentes estirpes de *R. meliloti* en fase logarítmica irradiadas con luz UV y sometidas a un tratamiento posterior con luz fotorreactivante. Símbolos cerrados: control en oscuridad. Símbolos abiertos: con tratamiento fotorreactivante. (■□) Rm2, (●○) UR1, (★☆) AK631.



Supervivencia

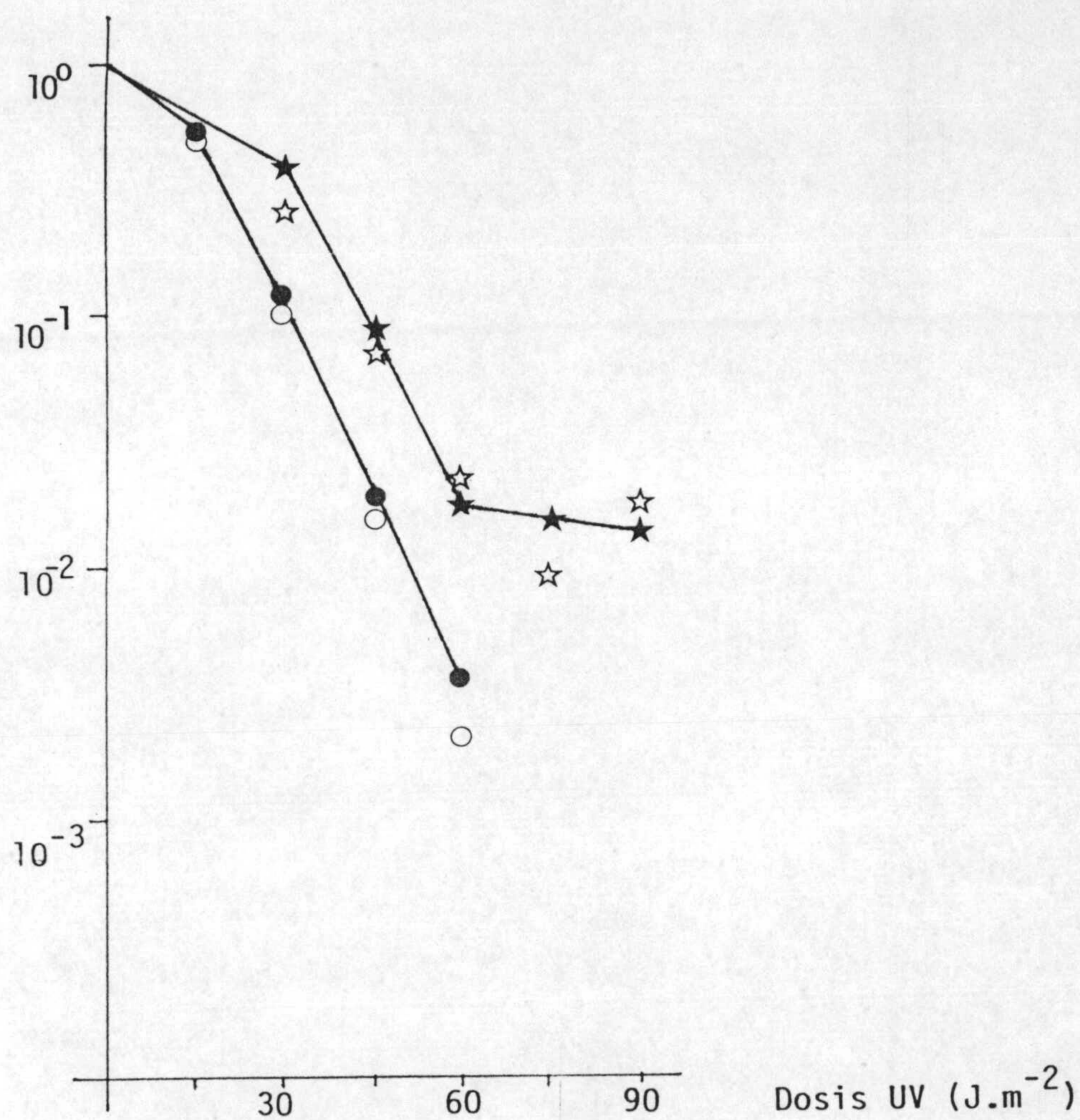


Figura 6.- Curvas de supervivencia de *R. leguminosarum* (★☆) y *R. trifolii* (●○) al ser irradiadas con luz UV en oscuridad (símbolos cerrados) y con un tratamiento posterior con luz fotorreactivante (símbolos abiertos).

fotorreactivante, podrían no ser suficientes para detectar un efecto positivo claro.

Por todo esto, se aumentó el tiempo de oscuridad previo a la exposición bajo luz fotorreactivante a 30 min, y el tiempo de exposición a ésta, pasó de forma gradual de 50 min a 90 min. Esta es mayor que la utilizada para levaduras, cuyo tiempo de generación es similar a *Rhizobium*. En este caso, dicha exposición no sobrepasa los 60 min (Rupert 1960; Fukui *et al* 1982). No obstante, también en este caso, los resultados fueron negativos.

Sin embargo, Heuman *et al* (1984) indican la presencia en "todas las estirpes de *Rhizobiaceae* de un equipo muy eficiente de fotorreparación, inducido por luz comprendida entre 310-400nm" -luz negra-, por lo que es necesario trabajar bajo luz amarilla-roja o en oscuridad para evitar este fenómeno. Sin embargo, estos autores no aportan datos experimentales al respecto ni citan referencias anteriores a dicho trabajo, tan sólo describen las condiciones de trabajo.

Por otra parte, en 1953 Kleczkowski y Kleczkowski trabajando con fagos de *R. leguminosarum* y *R. trifolii*, encontraron que los fagos irradiados aumentaban su supervivencia si las células a las que infectaban eran sometidas a 3h de luz del día, inmediatamente después de la siembra. El aumento así detectado era de seis veces respecto a la supervivencia del testigo no irradiado.

Por este motivo, se realizó un control con la estirpe Rm2. Se irradiaron las suspensiones durante 6 min, con lo que se produjo un nivel de supervivencia de 10^{-2} , y se repartieron en alícuotas que se dejaron en la oscuridad, se expusieron durante 60 min bajo luz negra a 28°C, durante 60 min bajo tres lámparas de luz de día de 100 W de potencia y durante 3h en el ambiente (luz solar indirecta). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4. Como puede observarse, no hay

efecto positivo alguno en la supervivencia de las células irradiadas, en ninguno de los casos experimentados.

Tabla 4.- Niveles de supervivencia tras diferentes tratamientos foto-
rreactivantes sobre cultivos de Rm2 irradiados con luz UV germicida.

EXPOSICION	TIEMPO (min)	SUPERVIVENCIA
oscuridad	--	5.6 x 10 ⁻²
luz negra (310-400nm)	60	4.5 x 10 ⁻²
luz de día	60	5.2 x 10 ⁻²
luz solar indirecta	180	5.3 x 10 ⁻²

Aparte de las condiciones de tiempo de pre-exposición en oscuridad, de exposición a la luz fotorreactivante, de fuentes de luz fotorreactivante, etc. se probaron diferentes estados de crecimiento celular, ya que en *E.coli* está descrito que el número de moléculas de enzima fotorreactivante se afecta profundamente por el estado fisiológico de las células. Estas presentan un mínimo de moléculas activas de enzima en fase exponencial y un máximo en fase estacionaria tardía (Tyrrel *et al* 1972).

En las figuras 7 y 8, correspondientes a las estirpes GR4 y GR4B respectivamente, se puede observar cómo las curvas de supervivencia se modifican según el estado fisiológico celular, tal como ya se determinó previamente y cómo no hay un aumento en la supervivencia de

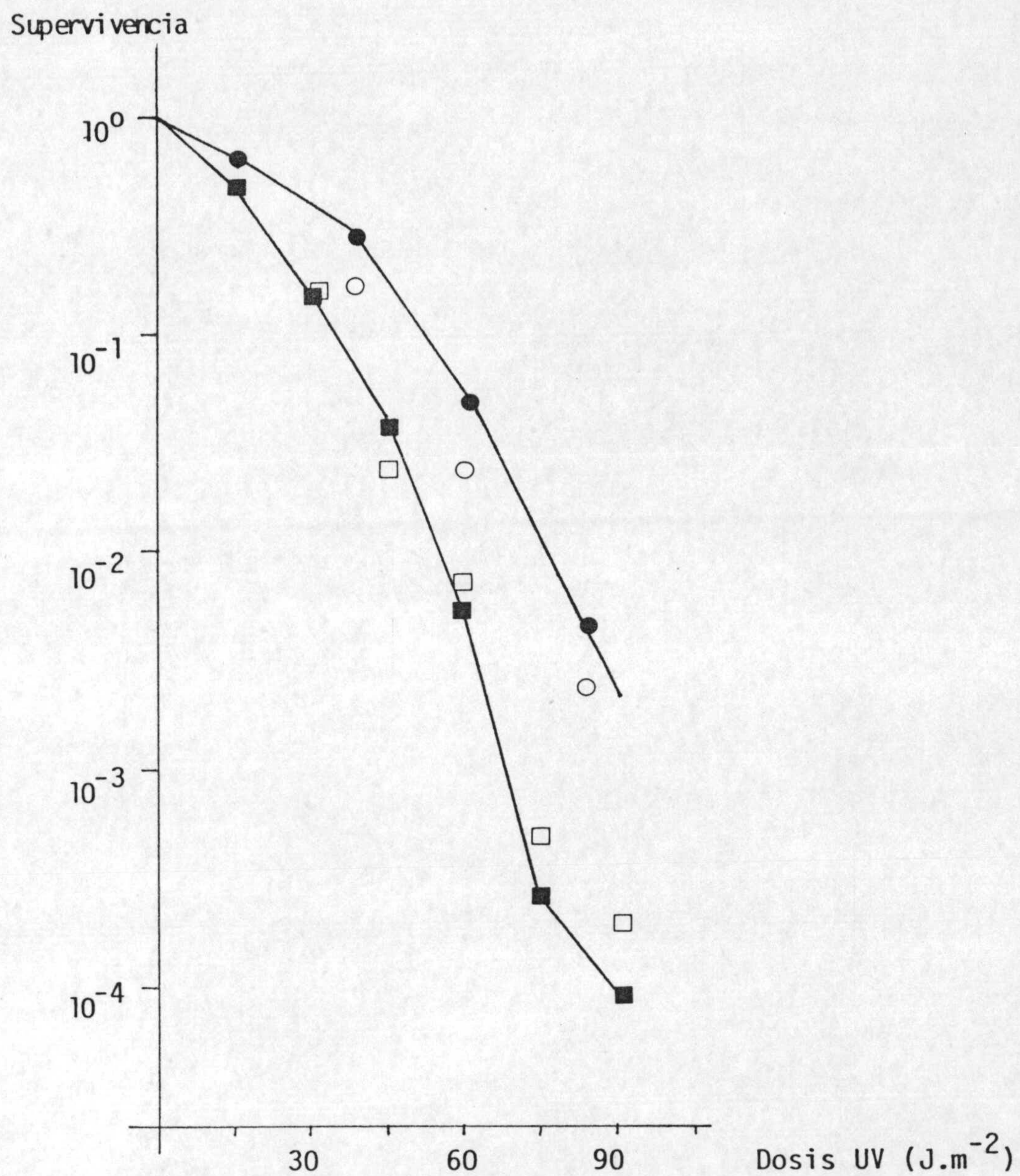


Figura 7.- Ausencia de fotorreactivación en cultivos de la estirpe GR4 en fase logarítmica (■ □) y en fase estacionaria (● ○). Símbolos cerrados: control en oscuridad. Símbolos abiertos: con tratamiento de luz fotorreactivante.

Supervivencia

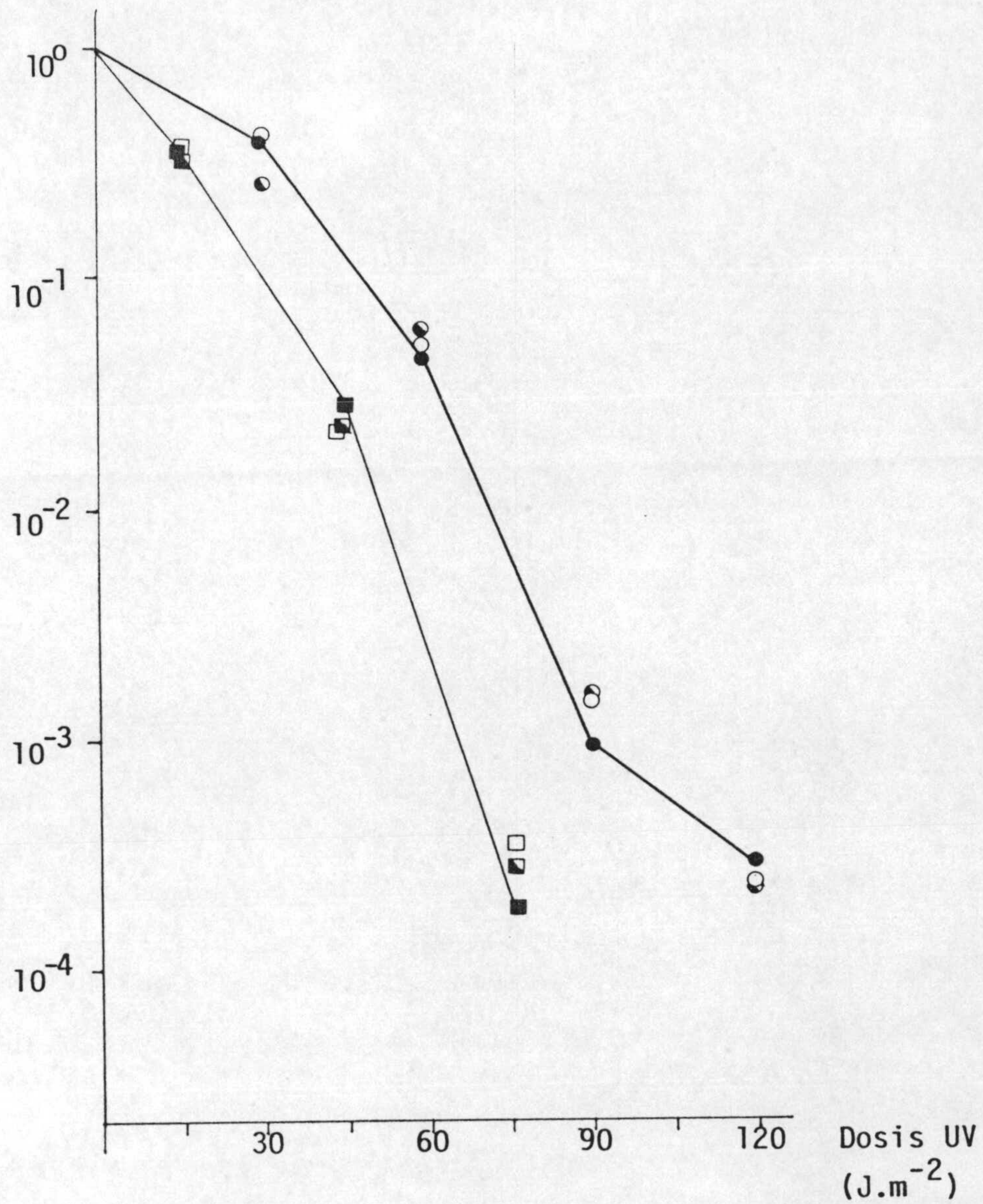


Figura 8.- Ausencia de fotorreactivación en cultivos de la estirpe GR4B en fase logarítmica (■ ▨ □) y en fase estacionaria (● ● ○) sometidos a luz fotorreactivante emitida por una lámpara de luz de día (símbolos partidos) o de luz negra (símbolos abiertos). Símbolos cerrados: control en oscuridad.

las células sometidas a tratamiento fotorreactivante en sus distintas modalidades.

Todo esto lleva a concluir que, al menos las estirpes de *R. meliloti* ensayadas, carecen del mecanismo de fotorreparación.

La presencia del mecanismo de fotorreparación ha sido descrita en especies de toda la escala biológica, tanto procariotas como eucariotas (Rupert 1979). Sin embargo, se ha descrito la ausencia del mismo en bacterias que tienen la capacidad de ser competentes, y sufrir transformación. Así se ha demostrado su ausencia, aparte de en *Haemophilus influenzae* (Goodgal et al 1957), en *Bacillus subtilis* (Kelner 1964), *Neisseria gonorrhoeae* (Campbell y Yasbin 1979), etc. En este sentido, se ha tratado de establecer una relación entre esta capacidad para sufrir transformación de forma natural y la ausencia de la enzima fotorreactivante.

Ya que las estirpes de *Rhizobium* usadas hasta la fecha en análisis genéticos no presentan un sistema natural de transformación como las especies mencionadas, habría que descartar la idea de que la ausencia de fotorreactivación en *Rhizobium* se deba o esté ligada a esta capacidad de transferencia genética.

Por otro lado, también se ha descrito la ausencia del mecanismo de fotorreparación en *Deinococcus radiodurans* (Al Bakri et al 1985) y *Micrococcus luteus* (Elder y Beer 1965). En el caso de este último, se ha demostrado que la enzima que lleva a cabo la escisión de los dímeros en la oscuridad, una UV-endonucleasa, compite con la enzima fotorreactivante en la unión a los dímeros, el sustrato de ambas. La presencia de las dos enzimas en la célula restaría efectividad a su estrategia frente a los daños producidos en su ADN (Sancar et al 1984a). Esto no ocurre en *E. coli*, en el que la enzima fotorreactivante contribuye positivamente a una mayor eficacia en la eliminación de los dímeros, in-

cluso en la oscuridad, cuando la reparación por escisión es el único mecanismo que actúa en la reparación. (Yamamoto et al 1983 a y b).

En el caso de *D. radiodurans* existe igualmente una UV-endonucleasa específica para los dímeros de pirimidina (Evans y Moseley 1985), si bien no se ha comprobado su competencia con la enzima fotorreactivante por dichos dímeros.

Por todo esto es interesante notar la fácil tentación que es especular si tanto *Rhizobium* como otras bacterias carentes del mecanismo fotorreactivante y que no sean transformables de forma natural, presentan un mecanismo de escisión-resíntesis semejante al de *M. luteus* iniciado por una UV-endonucleasa más que por una escinucleasa.

REPARACION POR ESCISION-RESINTESIS

El estudio de este mecanismo de reparación fue abordado según el siguiente diseño de experimentos:

a) Experimentos con cultivos celulares:

a.1.-Obtención de mutantes carentes del mecanismo de reparación.

a.2.-Efecto de inhibidores específicos al mecanismo de reparación

a.3.-Estudio de la influencia de las condiciones de post-irradiación.

b) Experimentos con suspensiones de fagos:

b.1.- Reactivación por hospedador.

b.2.- Efecto de inhibidores sobre la reparación por hospedador.

a) EXPERIMENTOS CON CULTIVOS CELULARES

a.1) Obtención de mutantes

La baja tasa de mutagénesis de *R. meliloti* GR4 tanto frente a la nitrosoguanidina (Goicoechea 1981) como frente a la radiación UV, así como la imposibilidad de uso de antibióticos bactericidas en el método de selección a causa del carácter buscado (*uvr⁻*), llevaron al diseño y utilización de distintos métodos de obtención y enriquecimiento de mutantes, todos ellos con resultados negativos.

En el primero de ellos, el de réplica de clones y selección de los que no crecieron al ser irradiados con bajas dosis de UV, dosis a las que la estirpe silvestre era resistente de forma natural y no afectaban por tanto a su supervivencia, se seleccionaron 8 posibles mutantes entre 1540 clones replicados. Sin embargo, en un segundo ci-

clo de comprobación del carácter de sensibilidad al UV, tuvieron que ser rechazadas como tales mutantes *uvr⁻*.

Por otra parte, el método del suicidio fue desechado; la estirpe GR4, de la que se estaba tratando de obtener los mutantes, presenta una gran cantidad de exopolisacárido, que dificulta en muy alta proporción la adsorción del fago DF2. Debido a esto, en las placas sembradas con cultivos mutagenizados e inoculados con DF2 irradiado, aparecía un gran número de colonias, prácticamente el mismo que en las placas control, con medio sin fago vertido sobre ellas. El contacto fago-bacteria no se daba al nivel esperado, y la selección proyectada a través de los fagos irradiados y reactivados no era por tanto eficaz.

Por último, con el método de selección por la sensibilidad a la MTC, se aislaron en principio 40 posibles mutantes entre 7.800 réplicas de colonias. De éstos se seleccionó tan sólo una estirpe, más sensible al UV pero en menos grado del esperado, y que presentó un alto porcentaje de reversión, por lo que finalmente hubo de ser desechada. Este método por otra parte, tampoco era eficaz a la hora de la selección, ya que el carácter de sensibilidad a la mitomicina C no es estable y tampoco se corresponde con una mayor sensibilidad a la radiación UV.

En cuanto a la estirpe GR4B, al presentar menos exopolisacárido celular proporciona unos índices mayores de adsorción con el fago DF2. Por este motivo se aplicó a esta raza el método de Walton y Moseley (1981), variación del método del suicidio. A pesar del bajo número de clones necesitado por estos autores para la obtención de un mutante *uvr⁻*, tampoco se han podido obtener mutantes con este carácter en dicha estirpe.



a.2) Efecto de inhibidores

Debido a la carencia hasta el momento de mutantes *uvr⁻* de las estirpes en estudio, se plantearon experimentos con inhibidores específicos de los mecanismos de reparación que mimetizasen en cierto grado al menos, a dichos mutantes *uvr⁻*. Campbell y Yasbin (1984) usan también la cafeína como instrumento para la demostración del mecanismo por escisión en *N. gonorrhoeae* al no poder obtener estos autores mutantes *uvr⁻* de esta especie.

La reparación por escisión resíntesis puede ser inhibida por la cafeína o por la acriflavina. La cafeína se une al ADN de cadena simple y al ADN de doble cadena irradiado (pero no al no irradiado), al parecer en las regiones localmente desnaturalizadas del ADN, resultado de la formación de los dímeros de pirimidina. Sin embargo, esta inhibición dista normalmente de ser total en el ADN bacteriano, afectándose menos la supervivencia al UV en estirpes silvestres que con mutaciones *uvr⁻*. Otro tanto ocurre con la acriflavina, que puede unirse a los pares de bases tanto externamente como intercalándose entre ellos (Harm 1980).

Como se refleja en la figura 9, la cafeína y la acriflavina muestran un efecto inhibitorio en la reparación, siendo mayor el de la primera que el de la segunda. El grado de inhibición (fig 10), esto es, la relación células supervivientes en medio adicionado de la droga, respecto a las células supervivientes en medio no adicionado, ambas irradiadas con la misma dosis, aumenta progresivamente con la dosis de UV. Este aumento, que indica un mayor efecto inhibitorio y por tanto una menor eficacia de la reparación en presencia del inhibidor, alcanza un máximo cuando el nivel de supervivencia celular del testigo se sitúa entre 10^{-2} a 10^{-3} . A medida que la supervivencia celular del control desciende aún más, el efecto inhibitorio es menor. Debe estar presente otro mecanismo de reparación insensible a la cafeína y que

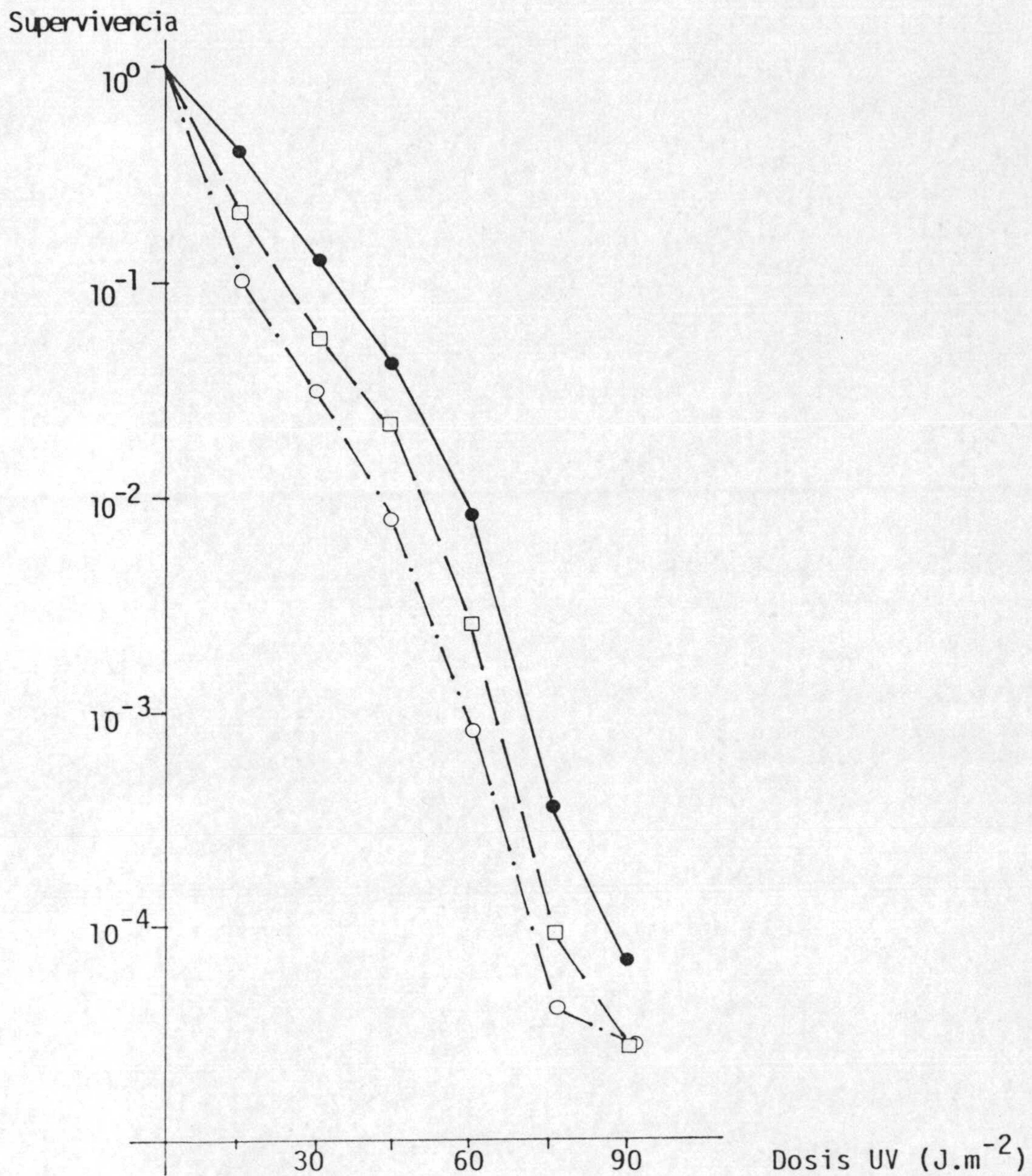


Figura 9.- Efecto de la cafeína en la supervivencia de cultivos de la estirpe GR4B irradiados con luz UV y sembrados en medio YGT (●) adicionado de 1 mg.ml^{-1} de cafeína (○) o de 0.1 mg.ml^{-1} de acriflavina (□).

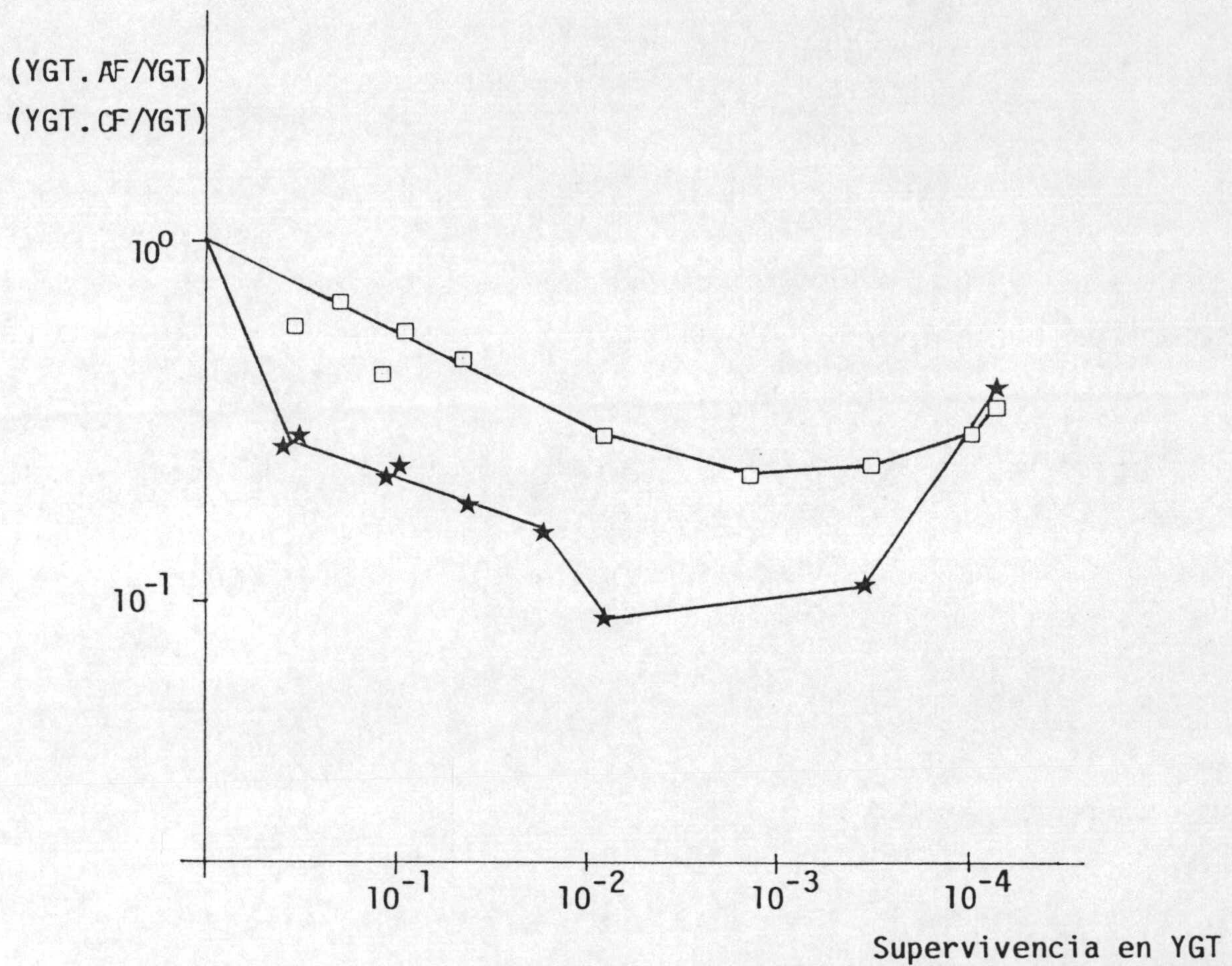


Figura 10.- Relación entre células supervivientes en medio YGT adicionado de cafeína (★) o acriflavina (□) y células supervivientes en medio sin droga, irradiadas con la misma dosis de UV. En abscisas se representa el nivel de supervivencia de las células control sembradas en YGT.

actúa en menor proporción, de modo que una vez se alcance determinado nivel de supervivencia, se ponga de manifiesto y tienda a aumentar la resistencia al UV. El máximo de inhibición alcanzado es de un orden de magnitud para la cafeína sobre la GR4B. Por su parte, con la acriflavina, el mayor grado de inhibición observado ha sido de 2.36×10^{-1} .

Si bien con la utilización de estos dos inhibidores no se puede cuantificar la extensión del mecanismo de reparación (pues como ya se ha dicho, la inhibición no es total y no se alcanzan los niveles de supervivencia que con los mutantes *uvr⁻*), se puede, sin embargo, indicar su presencia.

El mecanismo de escisión-resíntesis puede iniciarse con dos tipos de enzimas:

a) glicosilasas de bajo pm (alrededor de 15.000 d), productos de un solo gen, independientes de cofactores, insensibles a la cafeína y a la acriflavina, como son las UV-endonucleasas de T4 y de *M.luteus* (Demple y Linn 1980).

b) sistema escinucleasa multicomponente, dependiente de Mg^{++} , ATP y sensible a la cafeína y acriflavina, demostrado de forma exhaustiva en *E.coli* (Seeberg *et al* 1980) (Sancar y Rupp 1983).

La sensibilidad de *R.meliloti* GR4B a la cafeína y a la acriflavina apunta hacia la existencia en esta estirpe de un mecanismo de reparación por escisión-resíntesis que sea semejante al descrito en *E.coli* iniciado por la escinucleasa *uvrABC* de amplio rango de sustrato.

Anteriormente, en el capítulo de fotorreactivación se ha indicado la fácil tentación que era especular si la carencia del mecanismo fotorreactivante de *Rhizobium* era debida a la presencia de un mecanismo de escisión-resíntesis semejante al de *M.luteus*, competidor con la fotoliasa por el mismo sustrato. Como se puede deducir de estos experi-

mentos con inhibidores, *Rhizobium* no presenta un sistema semejante al de *M. luteus*, ya que se afecta por la cafeína y la acriflavina. Ahora bien, pudiera ser que *Rhizobium* se asemejara a *D. radiodurans* también carente de mecanismo fotorreactivante. En esta bacteria coexisten dos tipos de UV-endonucleasa; la α , de amplio rango de sustrato que parece similar a la escinucleasa uvrABC de *E. coli*, y la β , específica para los dímeros de pirimidina e insensible a la cafeína y a la acriflavina, como la UV-endonucleasa de *M. luteus* (Evans y Moseley 1985).

Como en el caso de la fotorreactivación, se llevó a cabo un control del efecto de la cafeína con *E. coli* U9. En este caso la concentración utilizada ha sido también de 1 mg.ml^{-1} en lugar de los 2 mg.ml^{-1} habitualmente usados en estos estudios con *E. coli*, a fin de igualar las condiciones de estos experimentos y los llevados a cabo con *Rhizobium*. Estudios previos indican que concentraciones superiores a 1 mg.ml^{-1} de cafeína afectan a la viabilidad de los cultivos de *Rhizobium*, mientras que esta concentración no la altera y permite observar un efecto en la supervivencia de las células irradiadas. A concentraciones más bajas, el efecto inhibitorio es apenas perceptible.

En la figura 11 se muestra la acción inhibitoria de la reparación en esta estirpe, mucho más marcada que en *Rhizobium*. Esto no es de extrañar, ya que el efecto de esta droga varía de unas especies a otras, y dentro de una misma especie, varía también según las estirpes utilizadas.

No obstante, la disminución de la supervivencia es de tres órdenes de magnitud, frente a sólo un orden observado en la GR4B.

Esta diferencia tan notable en el efecto de la cafeína en la supervivencia de células irradiadas de estas dos especies, se puede explicar por la distinta eficacia de la droga en las diferentes especies, tal como ya se ha dicho. No obstante, podría también apoyar la

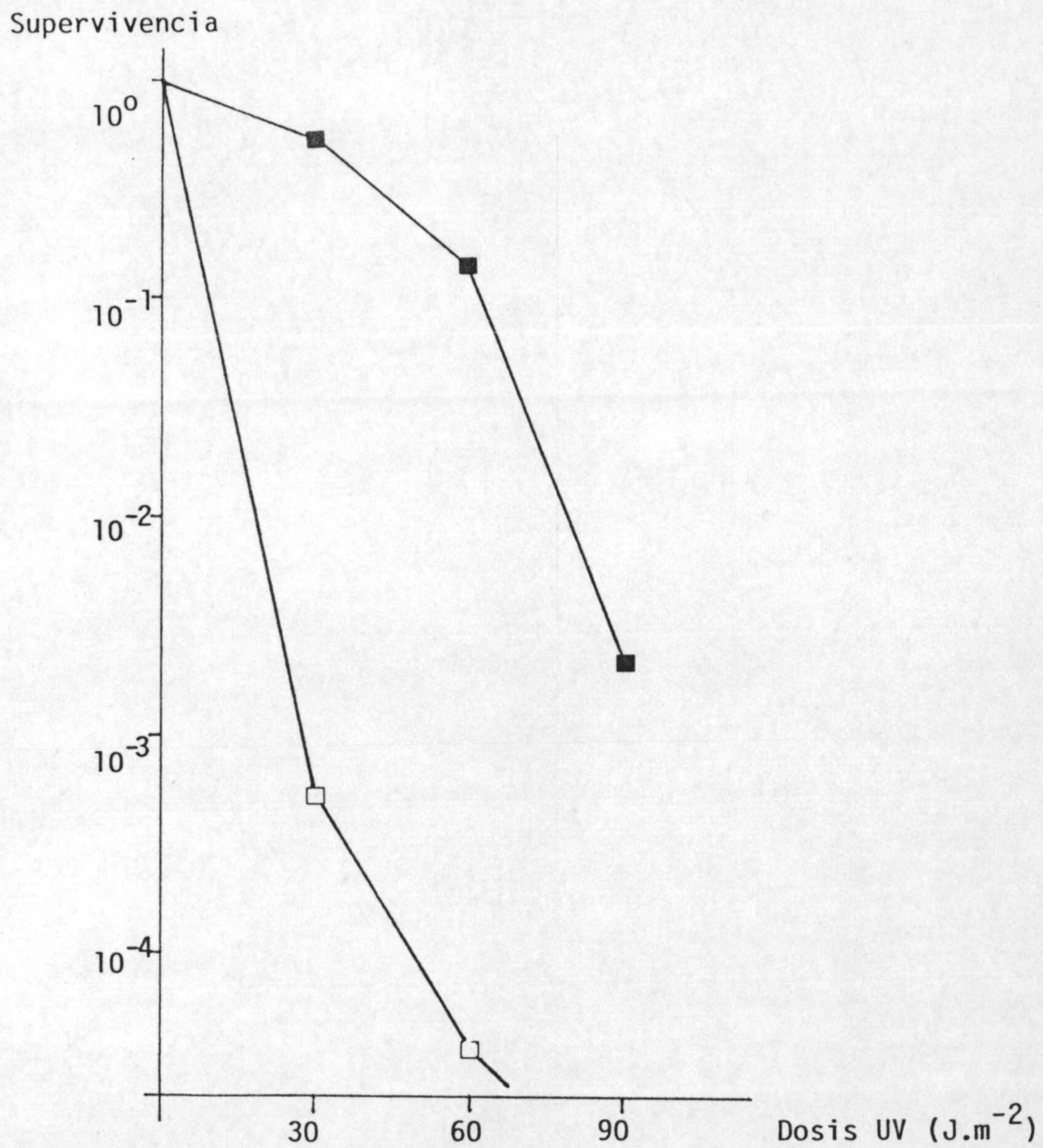


Figura 11.- Efecto de la cafeína en la supervivencia de cultivos de *E. coli* U9 irradiados con UV. Símbolos cerrados: cultivos sembrados en LB
 Símbolos abiertos: cultivos sembrados en LB con 1 mg.ml⁻¹ de cafeína.

hipótesis arriba mencionada de que en *Rhizobium* estuviesen presentes dos tipos de enzimas iniciadores del mecanismo de escisión-resíntesis, y que sólo uno de ellos se viese afectado por la cafeína. El efecto de la droga sobre la supervivencia celular sería por tanto menor que si sólo actuase iniciado por el complejo enzimático inhibible por la droga.

La actuación de los inhibidores fue estudiada también en los distintos estados fisiológicos celulares. En la figura 12 se muestra la variación del grado de inhibición de la cafeína según la fase de crecimiento. El máximo detectado se da en cultivos en fase logarítmica y va disminuyendo a medida que se establece la fase estacionaria. Estos datos resultaron sorprendentes ya que se esperaba un igual si no un mayor efecto de la cafeína en los cultivos en fase estacionaria respecto a los cultivos en fase logarítmica, ya que las células en aquella fase disponen de mayor tiempo para la actuación del mecanismo de reparación.

Este resultado, no obstante, podría explicarse asumiendo de nuevo lo ya indicado de que realmente *Rhizobium* fuera similar a *D. radiodurans* en el sentido de la presencia de los dos tipos de enzimas iniciadores del mecanismo de escisión: uno sensible a la cafeína y el otro insensible a ella, siendo la contribución del primero mayoritaria. En el caso de la presencia de cafeína, que lo inhibe, y con células en fase estacionaria, el segundo mecanismo podría actuar en mayor extensión de modo que el efecto final sería una disminución en la relación entre las supervivencias de las células irradiadas y crecidas en medio con cafeína respecto de las crecidas en medio sin cafeína.

a.3) Influencia de las condiciones de postirradiación

El mecanismo de reparación por escisión-resíntesis es un proceso de reparación complejo que requiere la intervención de varias enzimas

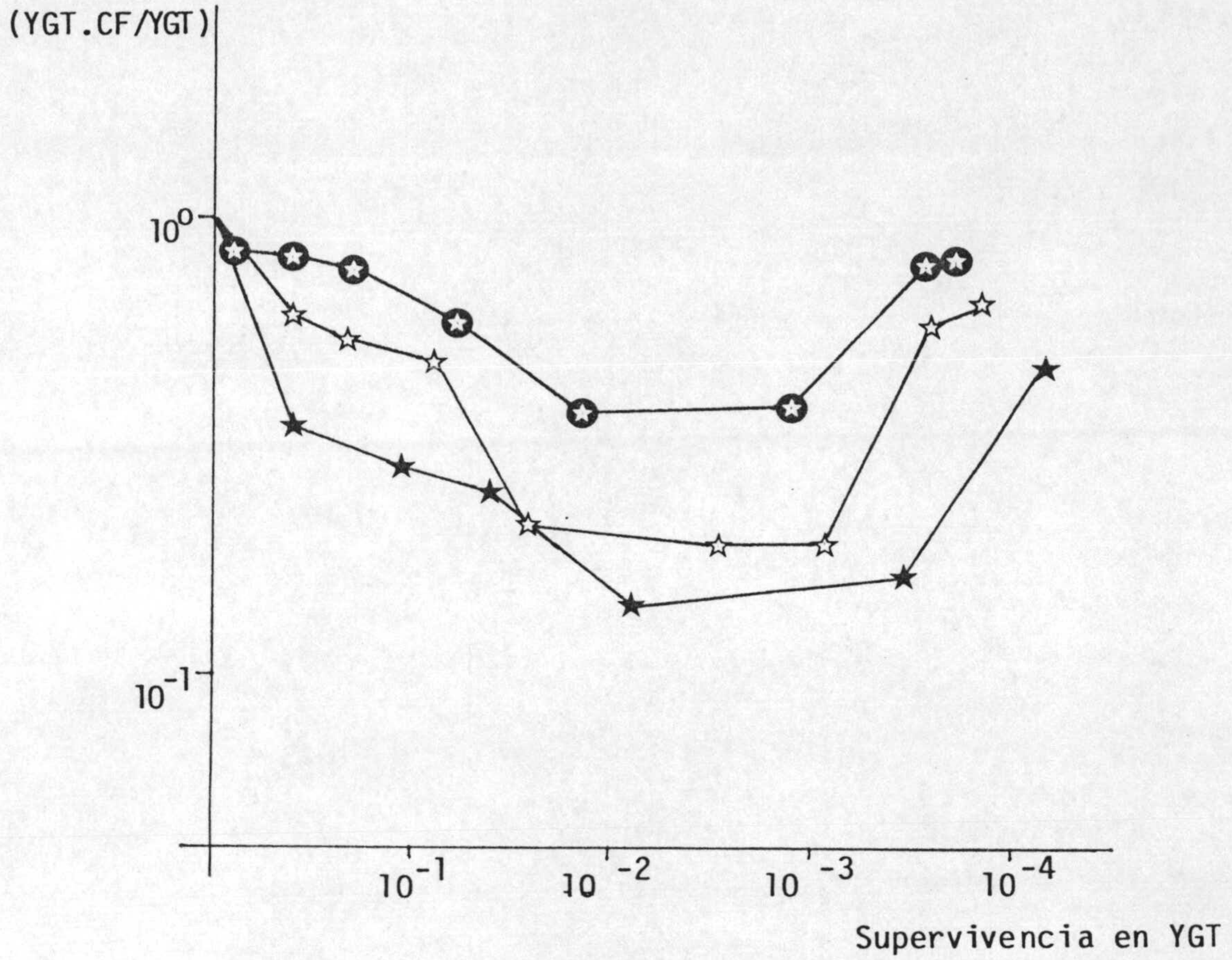


Figura 12.- Variación en el grado de inhibición de la cafeína según la fase de crecimiento del cultivo irradiado: (★) fase logarítmica, (⊙) fase estacionaria, (☆) transición a fase estacionaria. En abscisas se representa el nivel de supervivencia de las células control sembradas en YGT.

diferentes con un balance óptimo entre sus reacciones para una eficacia máxima en su actuación. Las condiciones experimentales pueden afectar este equilibrio de reacciones, y de este modo, la extensión de la reparación. Parámetros tales como el medio de crecimiento, la temperatura, etc. del período de postirradiación, pueden por tanto influir en la recuperación de las células irradiadas, más aún teniendo en cuenta que pequeñas diferencias en la fracción de lesiones reparadas por escisión pueden ocasionar una gran diferencia en la supervivencia celular.

a.3.1.- Recuperación por mantenimiento en líquido ("liquid holding recovery", LH).

En 1949 Roberts y Aldous describieron este fenómeno consistente en que la supervivencia de las células de *E. coli* irradiadas con UV aumentaba grandemente si dichas células se mantenían durante varias horas en soluciones no nutritivas (solución salina o solución de sales tamponadas). En los organismos en los que ha sido estudiado, este fenómeno de LH es consecuencia de un aumento de la extensión del mecanismo de reparación por escisión: los diferentes pasos que comprende (incisión, escisión y algo de resíntesis de ADN) se producen mientras las células están mantenidas en la solución no nutritiva, de modo que éstas disponen de mayor tiempo para que actúe este mecanismo de reparación.

En *R. meliloti* los estudios del LH llevados a cabo no han aportado datos concluyentes acerca de su existencia y extensión. Como medios de soporte del LH se usaron fundamentalmente solución salina fisiológica y tampón fosfato 0.1 M.

La solución salina fisiológica tuvo que ser desechada ya que *R. meliloti* es muy sensible a ella y el mantenimiento de los cultivos en dicha solución durante horas provocaba una disminución en la viabili-

dad de las células testigo no irradiadas. Esta disminución, que comenzaba a detectarse ya en las primeras cuatro horas de incubación, era variable de unos experimentos a otros y llegó a alcanzar incluso hasta dos órdenes de magnitud después de 24 horas de incubación, siendo más pronunciada en la estirpe GR4 que en la Rm2.

Las suspensiones irradiadas se afectaban también en su supervivencia por el mantenimiento en solución salina, en un grado variable de unos experimentos a otros.

Estudios del efecto sobre la viabilidad de distintas soluciones de sales indicaron que la más adecuada era el tampón fosfato 0.1 M.

Los diferentes experimentos de LH con la GR4 y tampón fosfato no han aportado datos concluyentes en lo que respecta a este fenómeno. En los distintos ensayos con cultivos en fase estacionaria se ha detectado, dentro de una considerable variabilidad, un efecto negativo sobre la supervivencia de cultivos irradiados cuyo nivel inicial fuera de alrededor de 10^{-1} ; un efecto positivo en mayor o menor grado, si el nivel de supervivencia inicial abarcaba de 10^{-2} - 10^{-4} ; y un efecto positivo algo menor o casi nulo si la supervivencia en el tiempo cero era menor de 10^{-4} (Fig 13).

Ganesan y Smith (1968) indicaron que la recuperación por el LH sólo es observable cuando la reparación por escisión es operativa, pero la postreplicativa no. Incluso la supervivencia en estirpes silvestres puede presentar una disminución después de 8 horas de incubación en tampón. Estos datos son contrarios a los obtenidos en las mismas condiciones por Harm (1968). Por su parte, Moss y Davies (1974) indican que la disminución de la supervivencia por LH en estirpes silvestres depende de la dosis de UV inicialmente aplicada, detectándose un aumento con dosis mayores a 100 J.m^{-2} , que producen un nivel de supervivencia inferior a 10^{-2} . Los datos obtenidos con *R. meliloti*, concuer-

Supervivencia

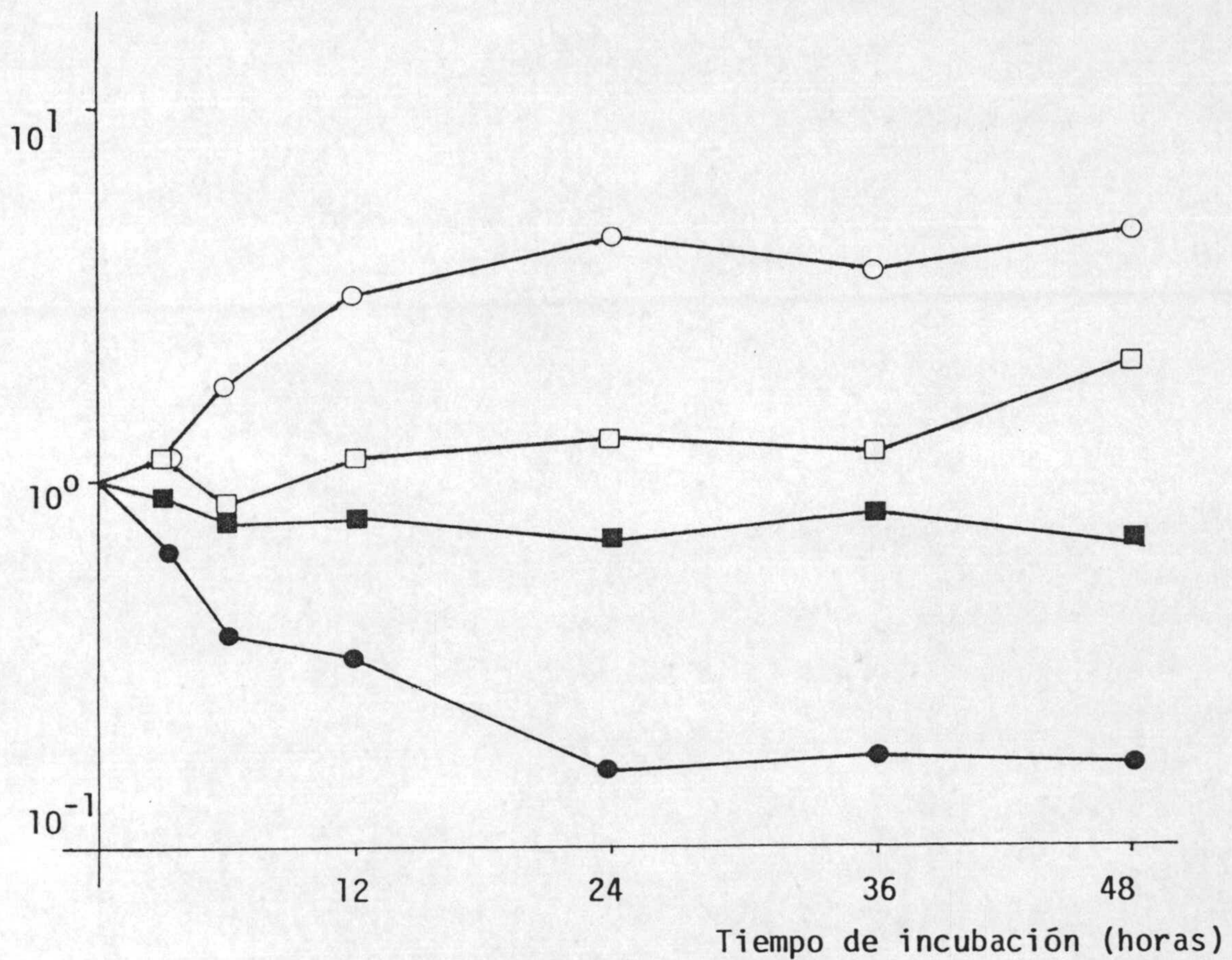


Figura 13.- Influencia del mantenimiento en tampón fosfato en la supervivencia de cultivos en fase estacionaria de la estirpe GR4 irradiados con distintas dosis de luz UV. Las supervivencias alcanzadas en el tiempo cero son tomadas como el 10^0 : 10^0 (■); 2.3×10^{-1} (●); 10^{-2} - 10^{-4} (○); $<10^{-4}$ (□). Los puntos indicados son la media de tres experimentos independientes.

dan por una parte con los obtenidos por Harm, en el sentido de observar un efecto positivo, y por otra, con los resultados de Moss y Davies en el sentido de la dependencia del efecto observado de la dosis aplicada. No obstante, la gran variabilidad observada de unos experimentos a otros aconseja tomar con cautela los datos obtenidos.

Para aclarar si el aumento detectado era realmente un proceso de LH, se llevó a cabo una prueba consistente en mantener los cultivos irradiados en tampón fosfato adicionado o no de cafeína y tomar muestras cada 20 minutos a lo largo de una hora. Si el aumento en los niveles de supervivencia era debido al LH, la cafeína lo anularía. Por tanto debería detectarse un aumento paulatino en los cultivos irradiados mantenidos en tampón, y un mantenimiento en el nivel de supervivencia de los cultivos irradiados mantenidos en tampón y cafeína.

Como puede observarse en la figura 14, las células mantenidas en tampón fosfato y cafeína experimentan también un incremento en su supervivencia incluso mayor que el que experimentan las mantenidas en tampón fosfato. Por tanto, si este aumento observado es debido a una mayor extensión de la reparación por escisión, ésta debe ser iniciada por un mecanismo independiente de la cafeína.

Por su parte, el mantenimiento en tampón fosfato de las suspensiones procedentes de cultivos en fase logarítmica, ejerce una fuerte acción negativa en la viabilidad de las células testigo no irradiadas. Esta desciende hasta alcanzar un 20% de la población inicial al cabo de 24 horas de incubación. Las células irradiadas muestran igualmente una gran disminución en la supervivencia respecto a la alcanzada en el tiempo cero. Esta disminución no corresponde a un LH negativo, ya que las células mantenidas en tampón adicionado de cafeína presentan un descenso incluso más acentuado. De ser un LH negativo, la cafeína anularía su acción; se trata por tanto de un efecto del mantenimiento en

Supervivencia

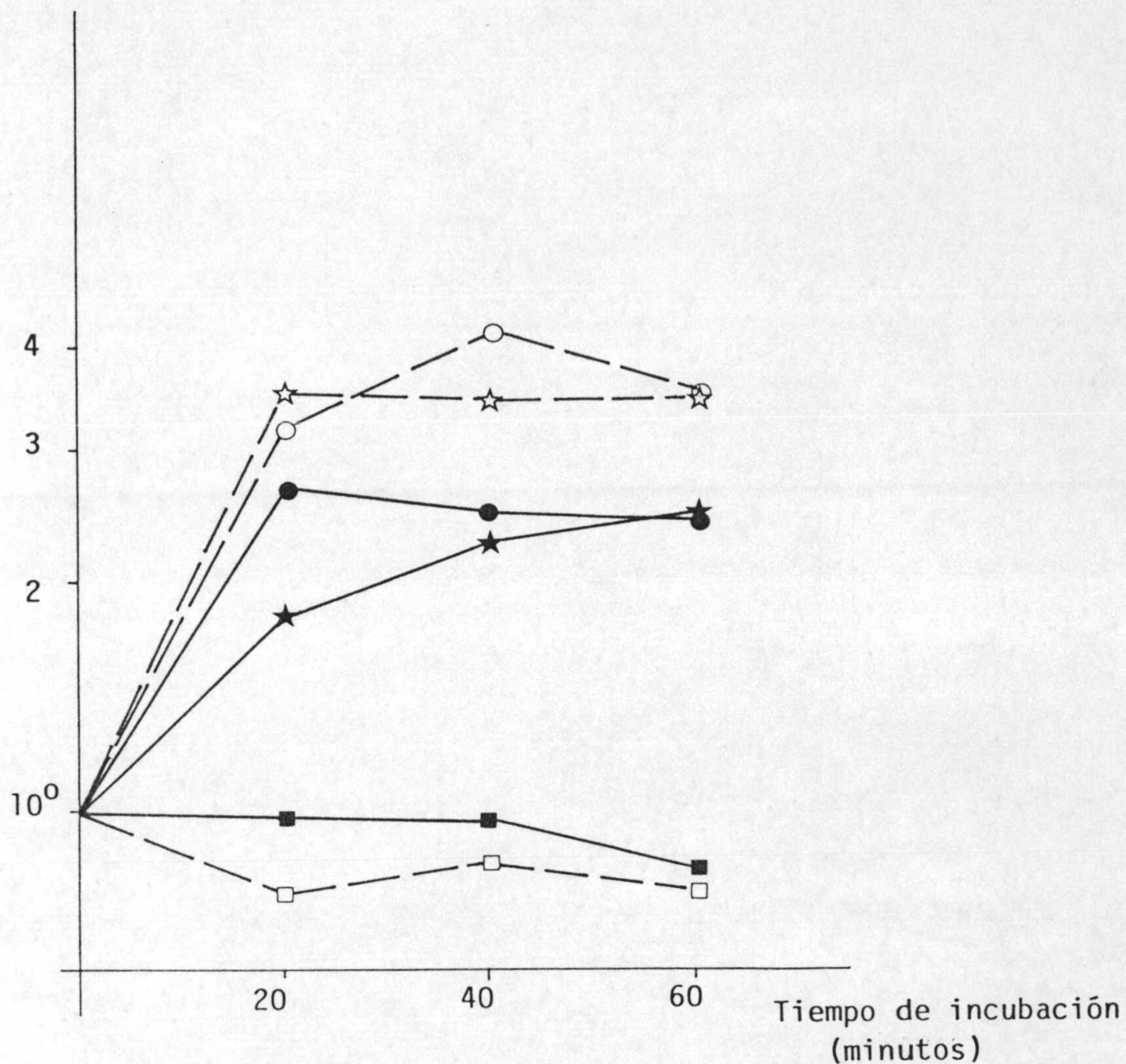


Figura 14.- Efecto de la cafeína presente en la solución tamponada soporte del LH, en la supervivencia de la estirpe GR4 irradiada con UV. Los niveles iniciales de supervivencia son tomados como 10⁰: 10⁰ (■ □) 1 × 10⁻³ (★ ☆) y 3 × 10⁻⁴ (● ○). Símbolos cerrados: YGT. Símbolos abiertos: YGT adicionado con 1 mg.ml⁻¹ de cafeína.



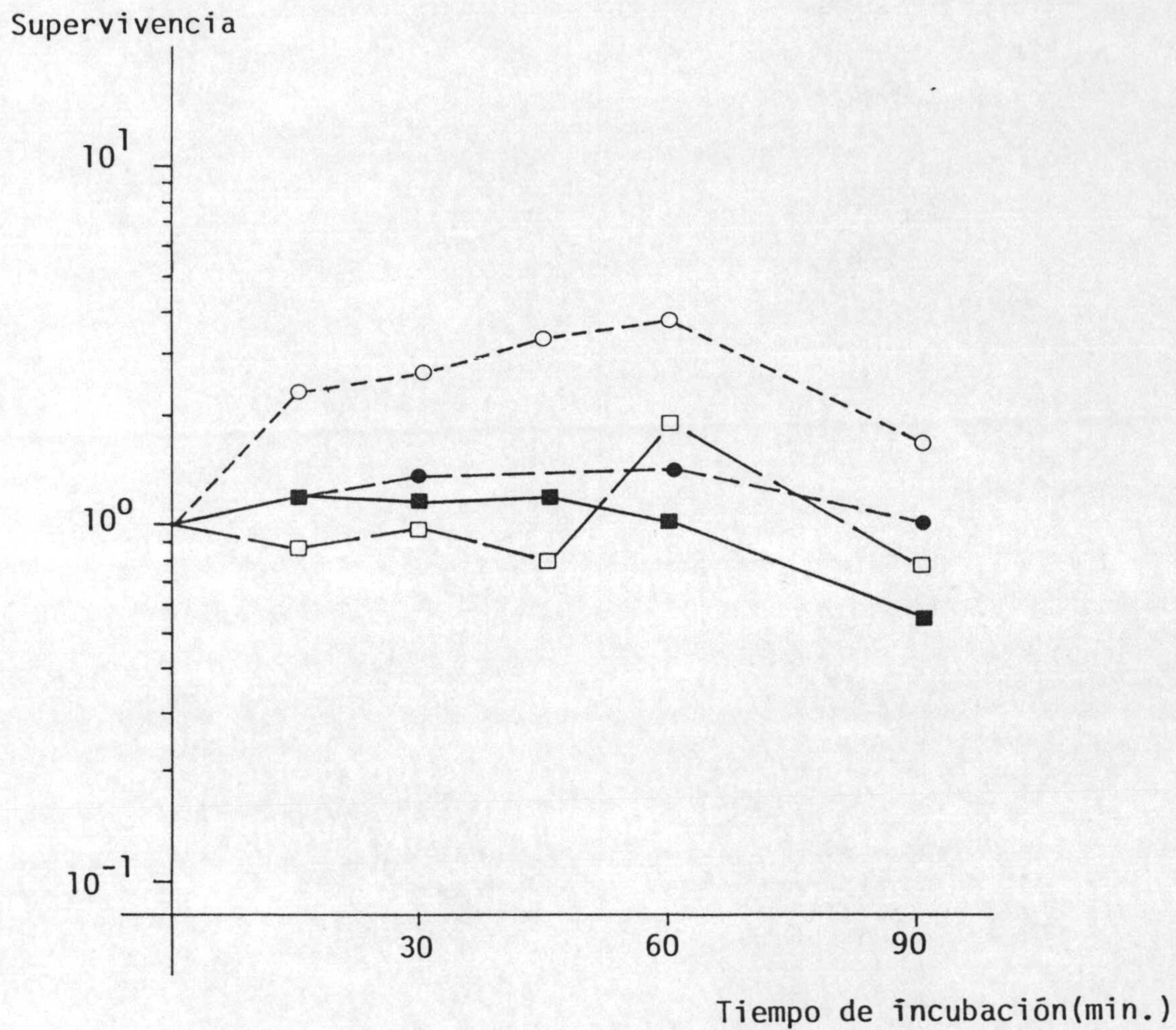


Figura 15.- Efecto del mantenimiento en tampón fosfato en la supervivencia de cultivos en fase logarítmica de la estirpe GR4B irradiados con distintas dosis de UV. Las supervivencias iniciales se igualan a 10^0 : 10^0 (■), 6×10^{-3} (□), 4×10^{-4} (○) y 1×10^{-4} (●). Los puntos corresponden a la media de al menos dos experimentos independientes.

tampón en la viabilidad celular, que oculta la influencia, si alguna, que pudiera ejercer sobre la reparación de los cultivos.

Por el contrario, si el tiempo de mantenimiento en líquido de estos cultivos se ve reducido a una o dos horas, como era el caso del control en oscuridad en los experimentos de fotorreactivación, se observa un ligero aumento en la supervivencia celular, mayor cuanto mayor sea el grado de inactivación inicial de las suspensiones irradiadas. Este aumento es de 2 ó 3 veces como máximo. Como puede observarse en la figura 15 el efecto negativo del mantenimiento en tampón sobre estos cultivos en fase logarítmica se hace notar rápidamente.

a.3.2.- Efecto de la temperatura.

Para estudiar el efecto de la temperatura como condición de post-irradiación en la supervivencia de las células irradiadas con UV, se ensayaron dos modalidades distintas.

En la primera de ellas se observó la influencia que ejercía el mantenimiento de los cultivos irradiados a temperaturas de 20° y 40°C, muy alejadas de la óptima de *Rhizobium* (30°C) durante diferentes períodos de tiempo. Estudios preliminares indicaron que por debajo de cuatro horas de incubación a estas temperaturas, los niveles de supervivencia no se alteraban respecto al control, incubado desde el principio a 30°C. Sin embargo, el aumento del tiempo de incubación a diez horas, tampoco influye positivamente en la recuperación de las células irradiadas, más bien se observa (figura 16) una disminución, no sólo de la supervivencia, sino también de la viabilidad de las células incubadas a 40°C (disminución al 60-37% respecto a las incubadas a 30°C).

Toro y Olivares (1986), utilizando la incubación a altas temperaturas (39.5°C) como método de mutagénesis, observan también una dismi-

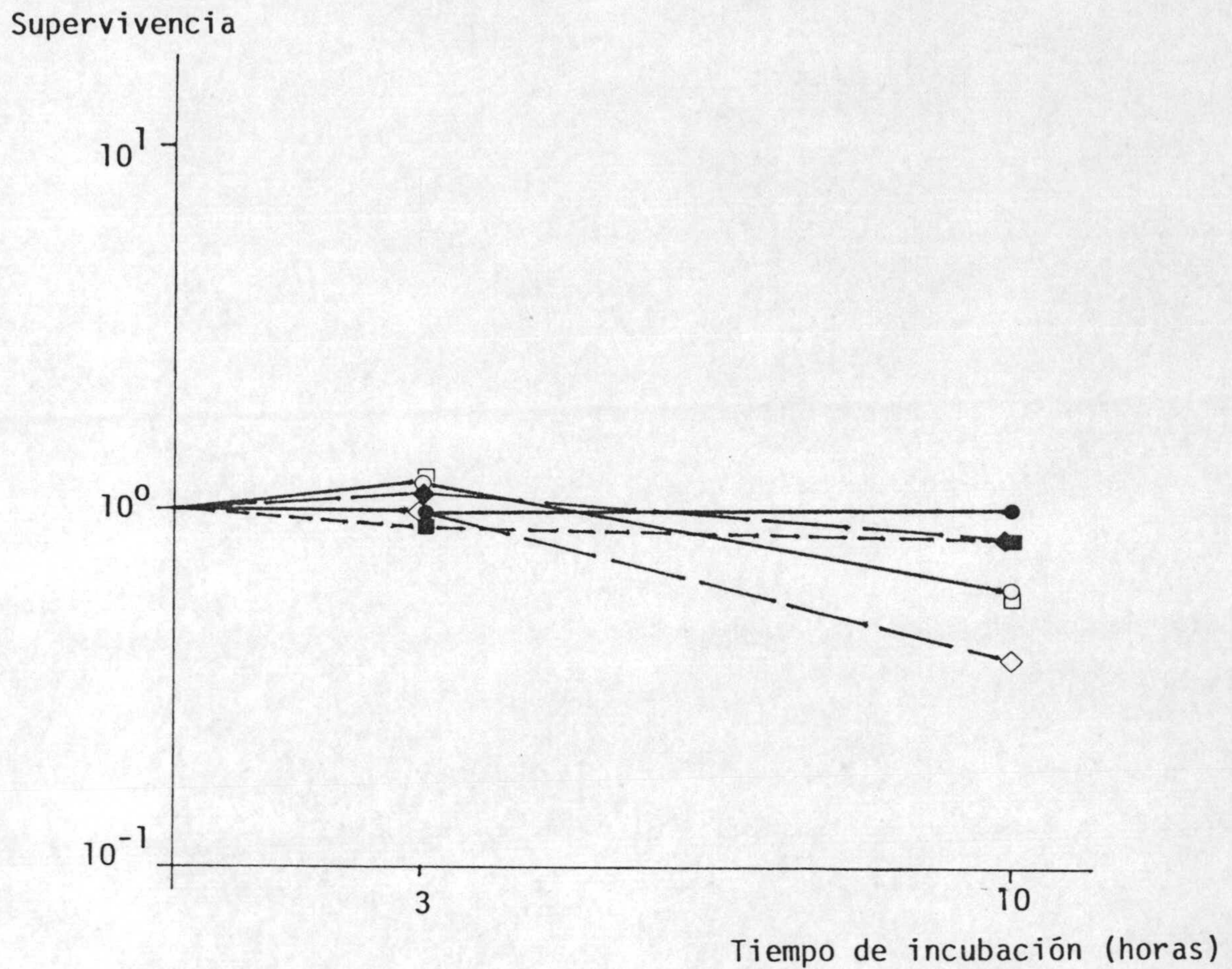


Figura 16.- Influencia de temperaturas extremas durante el período de postirradiación sobre la supervivencia y viabilidad celulares. Cultivos irradiados con 0 J.m^{-2} (\circ), 48 J.m^{-2} (\diamond) y 72 J.m^{-2} (\square), fueron incubados a 20°C (símbolos cerrados) y a 40°C (símbolos abiertos) durante 3 y 10 horas, y luego llevados a incubar a 30°C .

nución en la viabilidad celular, si bien amplía el tiempo de incubación a varios días. Los resultados aquí obtenidos están de acuerdo con los de estos autores, indicando una gran sensibilidad de la estirpe a las altas temperaturas, que se superpone al efecto, si alguno, de las mismas sobre la reparación del ADN dañado.

En cuanto a los datos obtenidos a bajas temperaturas, están de acuerdo con los aportados para *E. coli* B (Harm 1980), con el que no se detecta ningún aumento de supervivencia si las células se incuban a temperaturas por debajo de la óptima.

En el segundo método empleado, se usaron temperaturas de 30°C y 37°C durante todo el período de incubación. Como puede observarse en la figura 17, la incubación a 37°C da lugar a una curva de supervivencia con una pendiente más pronunciada. La temperatura aquí tiene un efecto negativo, que debe recaer en el proceso de reparación, ya que los cultivos no irradiados no ven alterada su viabilidad si se incuban a 37°C respecto a los incubados a 30°C. Esta mayor sensibilidad al UV a 37°C se explica al observar las curvas de crecimiento a esta temperatura y a 30°C. Sorprendentemente la GR4B crece más rápidamente a 37°C que a la indicada siempre como temperatura óptima (figura 18). Al darse esta situación, a 37°C el mecanismo de reparación por escisión dispone de menos tiempo para actuar, ya que las rondas de replicación se suceden con mayor rapidez, y por tanto su eficacia es menor.

b) EXPERIMENTOS CON SUSPENSION DE FAGOS

b.1.- Reactivación por la célula hospedadora (HCR)

Como ya se indicó en la introducción, la HCR es un fenómeno consecuencia del mecanismo de reparación por escisión de la célula, que depende al menos de los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*, y que tiene lu-

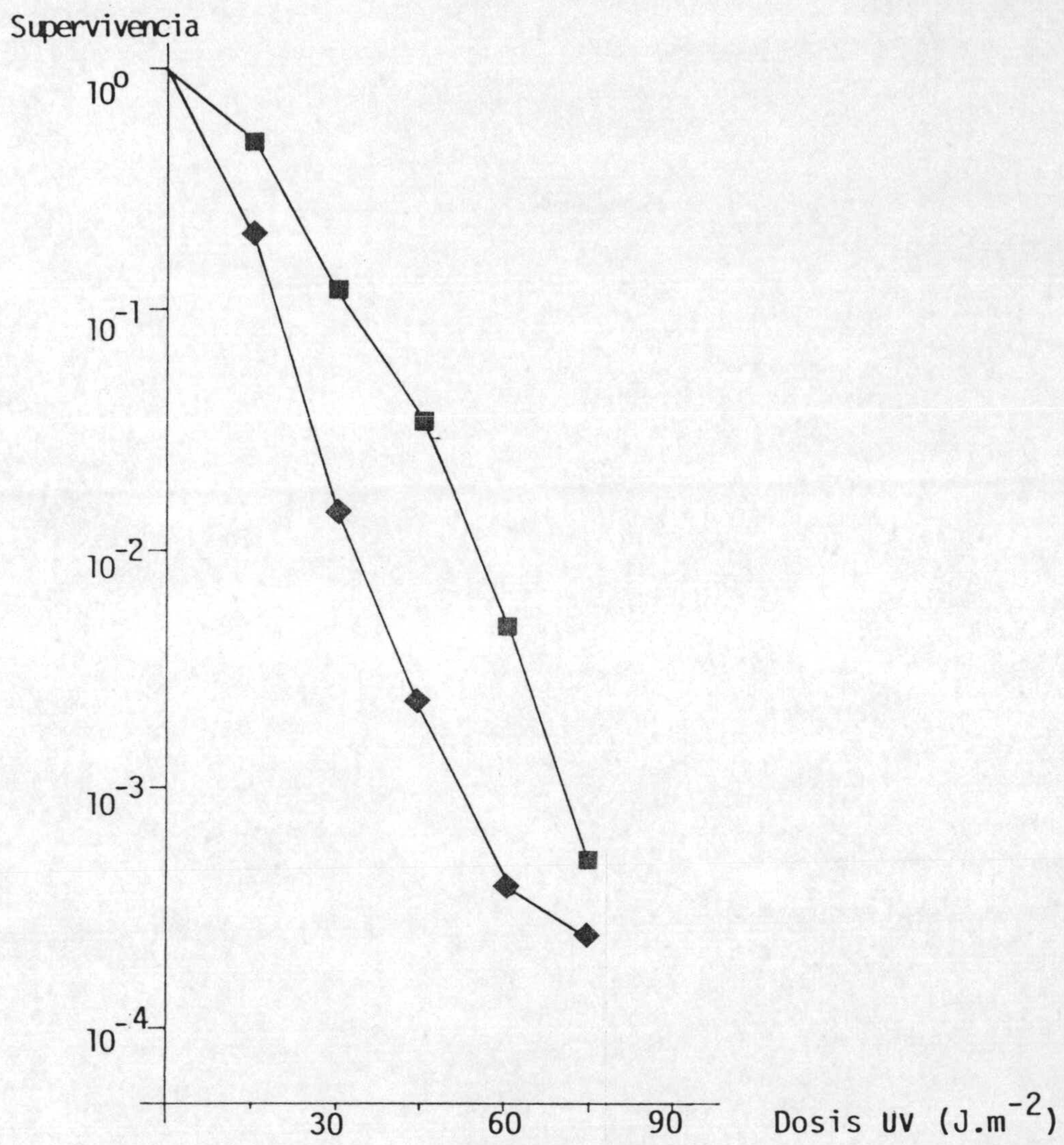


Figura 17.- Influencia de la temperatura durante el período de post-irradiación sobre la supervivencia de cultivos de GR4B en fase logarítmica: (■) 28°C, (◆) 37°C.

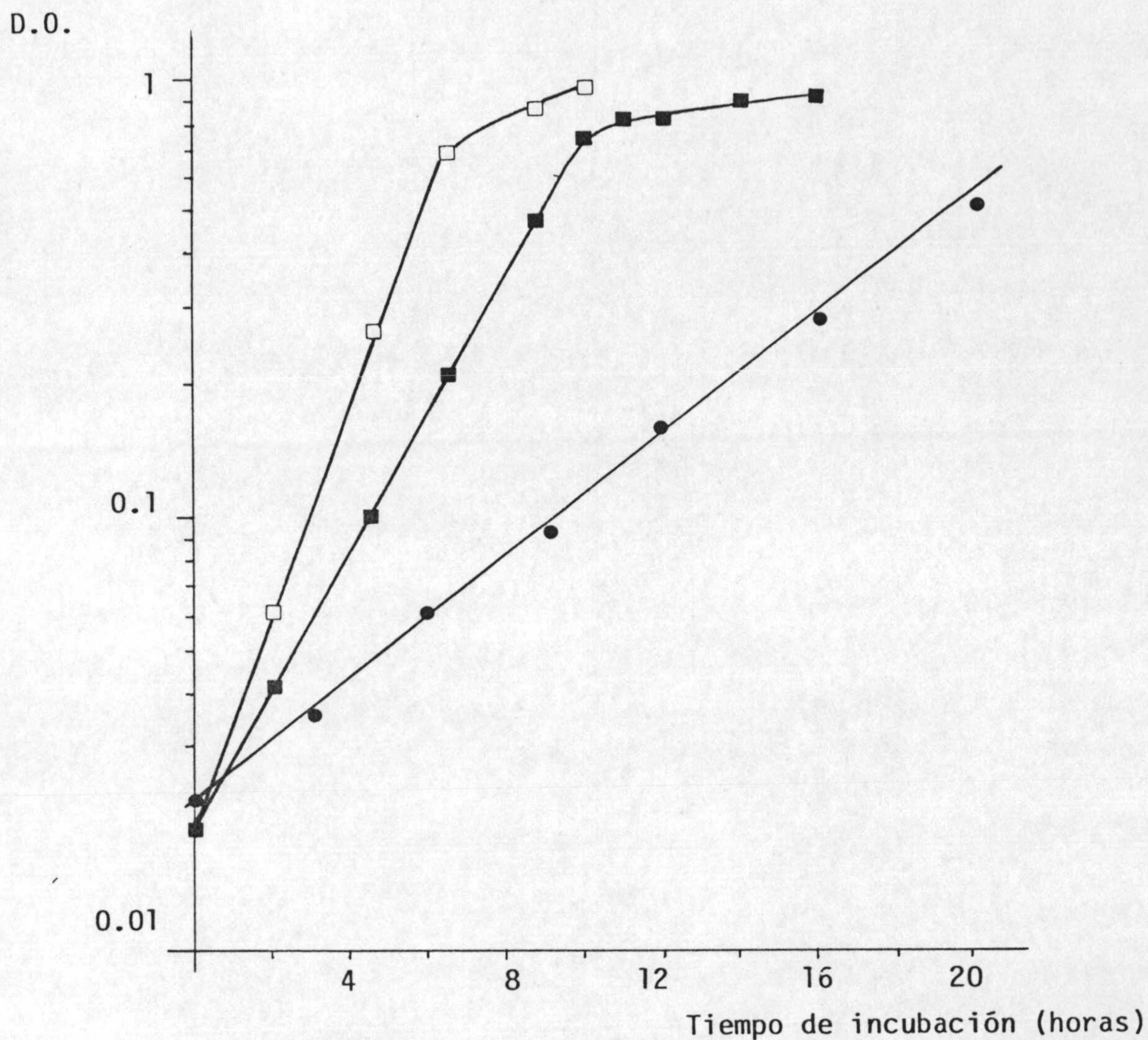


Figura 18.- Curvas de crecimiento de *R. meliloti* GR4B incubadas en agitación a 30°C (■●) y a 37°C (□), en medio YGT (■□) o en medio E3 (●○).



gar antes de la replicación del fago (Bernstein 1981; Devoret *et al* 1975). Fue originalmente descrita con el fago P22 de *S.typhimurium*, y se observa normalmente en los fagos moderados y los moderadamente virulentos; sin embargo, no se ha encontrado en los fagos altamente virulentos T5 y los de la clase T par de *E.coli*. Tampoco se da en los fagos de ADN de cadena sencilla ni en los de ARN.

Los estudios de HCR llevados a cabo con el fago DF2 en las estirpes GR4B y Rm2 arrojan resultados negativos. Como puede observarse en la figura 19A, la irradiación con altas dosis de UV sobre las células no supone una disminución en la supervivencia del fago irradiado, sino más bien un ligero aumento de la misma. Esto es debido a que el valor absoluto de las supervivencias de los fagos irradiados no varía, independientemente de que infecten células a su vez fuertemente irradiadas o no. Pero por el contrario sí se observa una ligera variación en el número de placas detectadas en el testigo, consistente en una disminución cuando los fagos no irradiados infectan células irradiadas respecto a las células no irradiadas. Esta disminución es mayor cuanto mayor sea la dosis de UV suministrada a los cultivos celulares (figura 19B).

La ausencia de este fenómeno en el fago DF2 no es de extrañar ya que éste es un fago virulento y podría asemejarse a los de la clase T par en lo que respecta a la HCR. Al parecer estos fagos producen una proteína que podría ser vital para ellos y que interfiere con la reparación proporcionada por las células. Tal podría ser el caso del fago DF2.

En lo que concierne al fago moderado AL1, no se han podido realizar los estudios de este fenómeno en la estirpe GR4B. Experimentos previos en medio líquido indicaron que el fago se adsorbe e infecta las células de esta raza, pero en su detección en placa no se pueden observar halos de lisis.

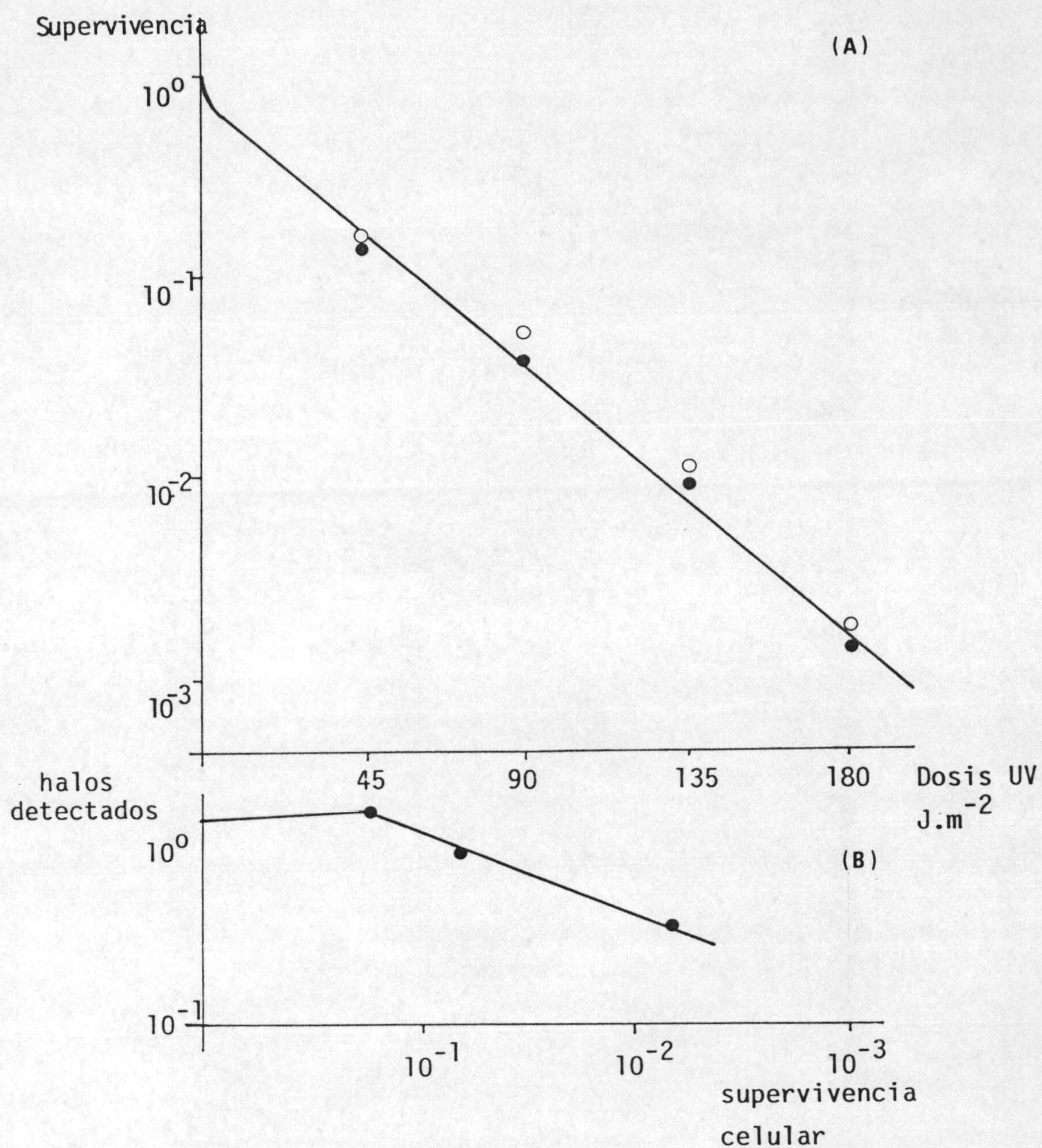


Figura 19.- A) Ausencia de HCR en el fago DF2 infectando células de GR4B no irradiadas (●) o irradiadas con $75 J.m^{-2}$ - 6.5×10^{-3} de supervivencia - (○). B) Disminución en el número de halos detectados al infectar fagos no irradiados a células irradiadas.

b.2.- Efecto de inhibidores sobre la reparación por hospedador

En *E. coli* la HCR se inhibe casi completamente con la presencia en las placas de siembra de 2 mg.ml^{-1} de cafeína, concentración que todavía permite el crecimiento de muchas estirpes indicadoras y la formación de placas de lisis de fagos tanto irradiados como no irradiados (Harm 1980). Con esta concentración, las curvas de inactivación del fago se asemejan a las obtenidas con células fuertemente irradiadas, o con células deficientes en la reparación por escisión.

A pesar del resultado negativo obtenido en la HCR con el fago DF2 cuando infecta a células fuertemente irradiadas se procedió al estudio del efecto que ejerce la cafeína sobre la reparación de los daños ocasionados en el fago por la radiación UV cuando está presente en el medio de siembra. En estos experimentos la concentración utilizada ha sido de 1 mg.ml^{-1} , como en los llevados a cabo con cultivos celulares, ya que esta concentración no afecta la viabilidad celular.

En este caso, sí se observa un efecto inhibitorio de la droga en la reparación del fago irradiado (figura 20). La cafeína ejerce su acción casi totalmente ya con las primeras dosis de UV ensayadas. La supervivencia de los fagos irradiados desciende bruscamente en más de un orden de magnitud (7×10^{-2} - 2×10^{-1}) con respecto a la supervivencia de fagos irradiados con la misma dosis pero infectando células sembradas en medio sin cafeína. Este porcentaje se mantiene aunque se hace algo mayor a medida que la dosis aplicada a los fagos aumenta. Estos datos indican que el 80-93% de los fagos ve inhibida su reparación por este mecanismo, en presencia de la cafeína.

Por tanto, aunque los experimentos de HCR con células fuertemente preirradiadas parecen indicar su ausencia en este fago y esta raza de *R. meliloti*, la inhibición por la cafeína de la reparación de fagos irradiados apunta a la existencia en la célula del mecanismo de repa-

Supervivencia

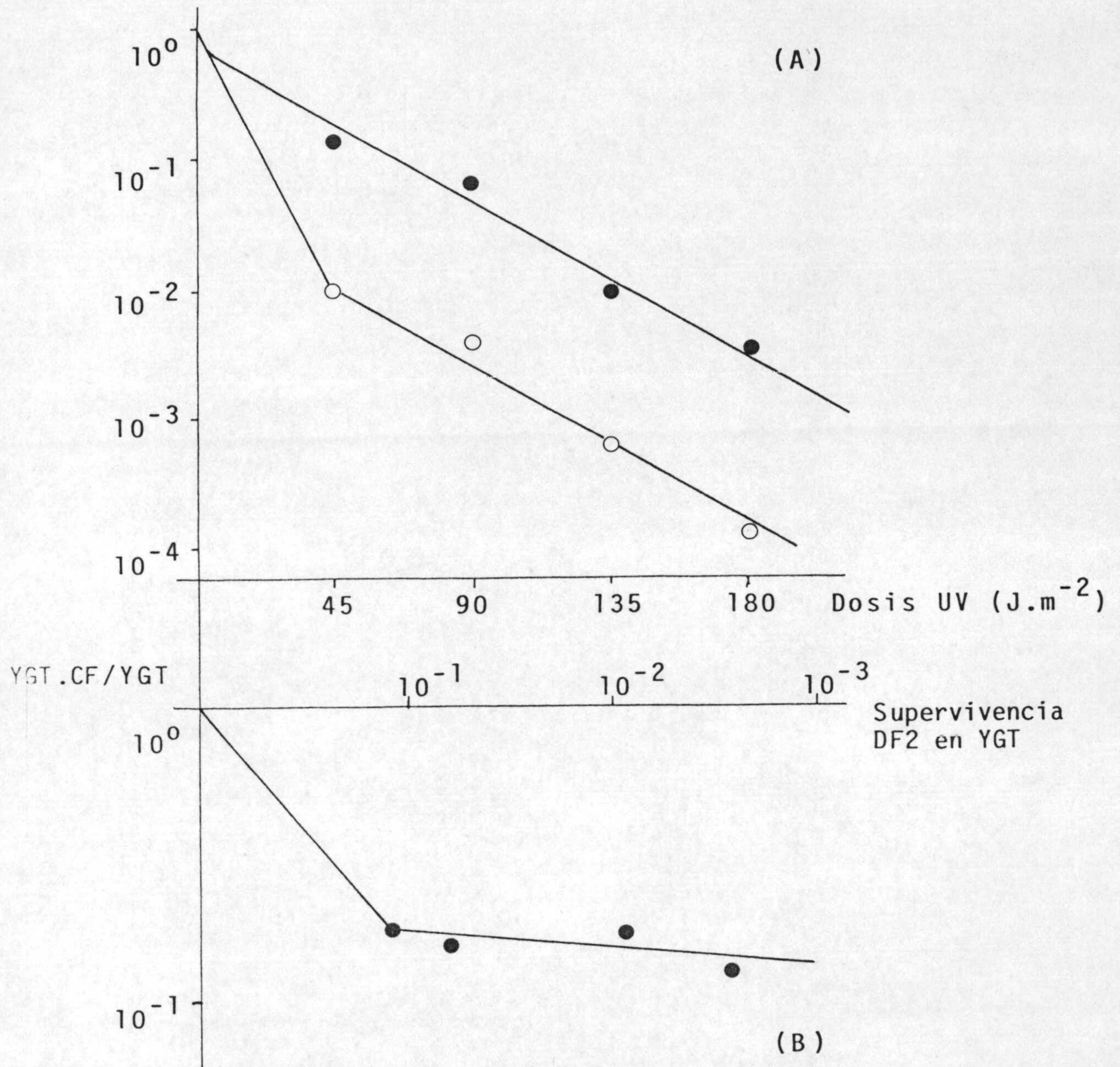


Figura 20.- A) Efecto de la cafeína en la supervivencia del fago DF2 irradiado con UV. (●) YGT (○) YGT+CF (1 mg.ml⁻¹). B) Relación entre la supervivencia de fagos irradiados con la misma dosis cuando infectan células sembradas en YGT+CF respecto a las sembradas en YGT.



ración por escisión-resíntesis, que es el principal responsable de este fenómeno de HCR (Devoret *et al* 1975) ya que el postreplicativo si desempeña algún papel en él, es minoritario (Harm 1980). Ballesteros (1980) obtuvo un mutante Uv^m de *R. meliloti* GR4 con mayor sensibilidad al UV y con incapacidad de la HCR. La inactivación del fago DF2 en dicho mutante se ajusta a la sufrida por este fago cuando infecta células crecidas en cafeína, respecto a la inactivación del mismo cuando infecta a las células silvestres y en medio YGT. Estos resultados están de acuerdo por tanto, con los datos obtenidos hasta ahora de la existencia en *R. meliloti* de un mecanismo de reparación por escisión. El estudio de su funcionamiento real y bases moleculares y genéticas queda relegado hasta la obtención de los mutantes adecuados.

REPARACION POR RECOMBINACION

La presencia del mecanismo de reparación por recombinación en *R. meliloti* se estudió fundamentalmente observando el fenómeno de reactivación por multiplicidad de infección, una prueba indicadora de la existencia de sistemas de recombinación tanto en bacterias como en fagos (Huskey 1969). Aparte, se observó la influencia de factores y condiciones de postirradiación que pueden afectar a ese mecanismo de reparación.

a.- REACTIVACION POR MULTIPLICIDAD DE INFECCION (MR)

El fenómeno de reactivación por multiplicidad de infección (MR) puede darse cuando dos o más cromosomas fágicos dañados entran en la célula hospedadora. Esta reactivación depende tanto de funciones de recombinación del fago como de la bacteria (Huskey 1969).

La extensión de este mecanismo viene dada por dos índices, el factor MR y la presencia de hombros en las curvas de inactivación, que juntos indican la reparación adicional debida a los procesos de recombinación habida cuando se encuentra más de un cromosoma fágico en la célula hospedadora respecto a cuando sólo es uno el que penetra en la misma (Bernstein 1981).

En la figura 21 se puede observar la reactivación por multiplicidad de infección que presenta el fago DF2 cuando infecta con multiplicidad de 6 a la estirpe GR4B (multicomplejos) en relación a cuando lo hace con multiplicidad de 1, en la que cada célula es infectada por una sólo partícula fágica irradiada (monocomplejos).

El factor MR, deducido de la porción de línea recta de las curvas de inactivación, viene dado por la relación R_{mono}/R_{multi} , donde R_{mono} es la constante de inactivación de monocomplejos y R_{multi} es la cons-

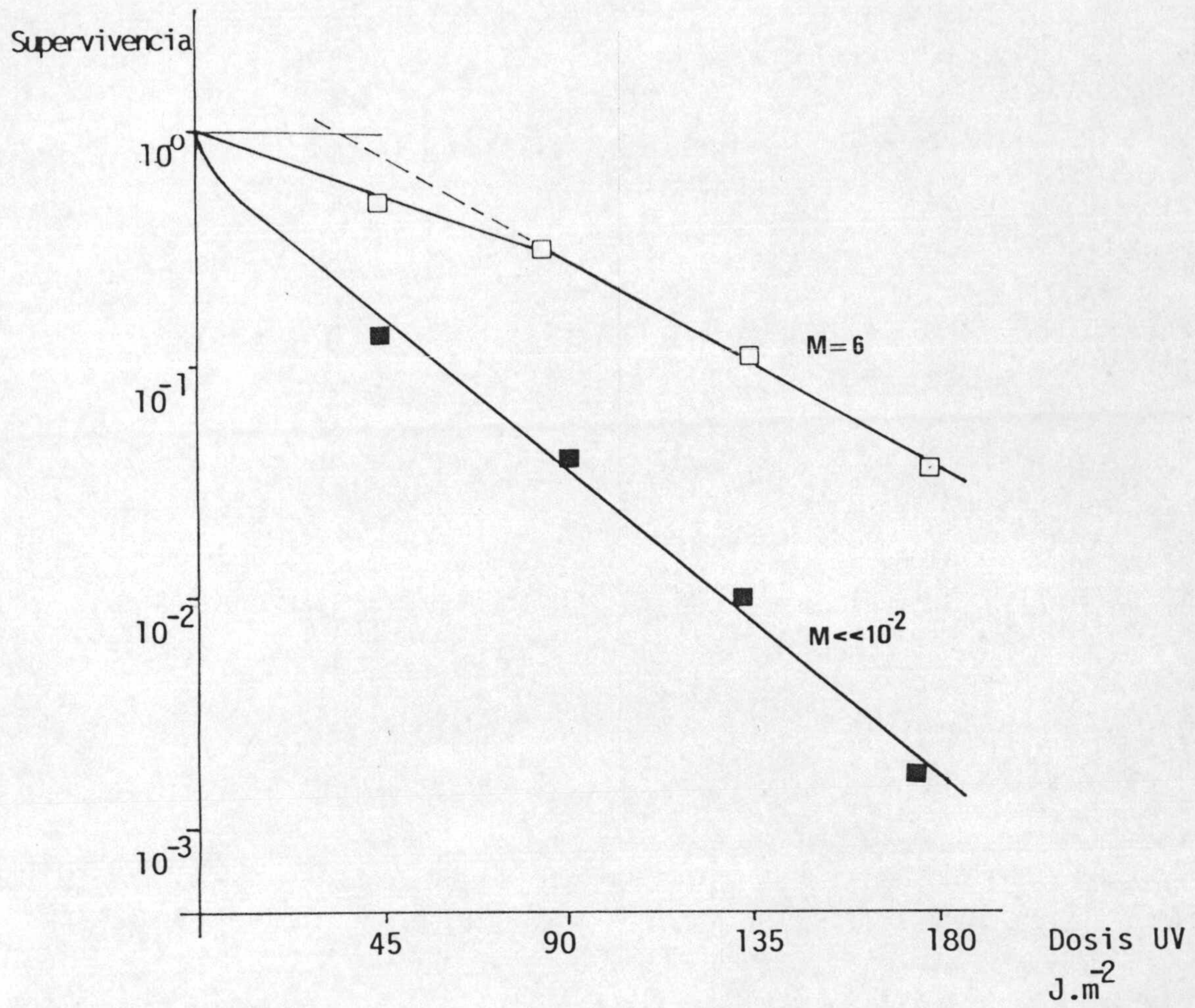


Figura 21.- Reactivación del fago DF2 por multiplicidad de infección en la estirpe GR4B. (□) M=6, (■) M << 10⁻².

tante de inactivación de multicomplejos. Este factor MR, calculado para una supervivencia de 10^{-1} , es de 22 y está en concordancia con valores observados para *E.coli* y el fago T4, si bien en este último la MR suele ser más potente (Bernstein 1981).

Por otra parte, la presencia en la curva de hombro puede reflejar la acción de un proceso adicional de MR que se satura cuando se alcanza un cierto número de lesiones totales. La extensión del hombro viene definida por la dosis de UV necesitada para alcanzar la transición a la porción de línea recta de la curva (32 J.m^{-2}).

Según lo indicado más arriba, el fenómeno de MR en *R.meliloti* apunta a la existencia en esta bacteria del mecanismo de reparación por recombinación. Ya que este proceso es consecuencia de las funciones de recombinación del fago y de la bacteria, sería necesario disponer de mutantes de ambos deficientes en esta función para poder cuantificar la contribución de cada uno a este fenómeno.

b.- RECUPERACION EN MEDIO MINIMO (MMR)

Un fenómeno relacionado con este mecanismo de reparación es el denominado recuperación en medio mínimo (MMR -del inglés minimal medium recovery-), consistente en que hay una mayor supervivencia de los cultivos irradiados con UV cuando estos se siembran en medio mínimo que si se hace en medio completo. Este fenómeno se observó en *E.coli* B (Roberts y Aldous 1949) y en diferentes mutantes de *E.coli* K-12 (Ganesan y Smith 1968) todos ellos con la reparación por recombinación funcional. Sharma *et al* (1982) mostraron que el medio rico inhibía una porción de la reparación postreplicativa en células *uvrA*⁻ y *uvrB*⁻. Por su parte Wang y Smith (1984a) indicaron que este efecto en mutantes *ssb* era debido a la inhibición de la división celular.

Para la observación de este fenómeno en *R. meliloti*, se han utilizado los medios YGT y E3, en los cuales el ritmo de crecimiento difiere de forma apreciable. Este es, a 28-30°C y en agitación, considerablemente mayor en el primero que en el segundo. En el medio YGT, un medio completo, el tiempo de generación es de 2 horas mientras que en E3, un medio mínimo suplementado con casaminoácidos, es de 4½ horas (figura 18). Las células se crecieron en el medio mínimo, y después del tratamiento con UV se sembraron en ambos medios.

Como puede observarse (figura 22), la supervivencia de las suspensiones irradiadas es mayor cuando se siembran en E3 que en YGT. La MMR es medida (Sharma et al 1982) por la relación F_{10} en medio mínimo / F_{10} en medio completo, siendo F_{10} la dosis necesaria para producir el 10% de supervivencia. En el caso de *R. meliloti*, la F_{10} se reduce 1,24 veces al sembrar en medio YGT. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sharma et al con estirpes *uvrB*⁺ de *E. coli*, y mayores a los que se pueden deducir de los datos de Wang y Smith con estirpe silvestre de *E. coli* K-12. En el primer caso, el mecanismo de reparación que actúa fundamentalmente es el postreplicativo, y parte de él se ve inhibido por el medio completo de crecimiento. Esto podría sugerir que en *R. meliloti* GR4 la reparación post-replicativa supone una contribución considerable en la reparación de ADN, y la inhibición de una fracción de la misma, aunque no la totalidad, por el medio completo de crecimiento repercute ya en las curvas de supervivencia. Esta repercusión es mayor a la observada en estirpes silvestres de *E. coli*. Sin embargo, no hay que olvidar que la mera presencia de aminoácidos no requeridos en el medio de siembra puede disminuir la supervivencia celular (Sharma et al 1982) y que el medio completo influye también en otros mecanismos, como el de división celular en mutantes *ssb* a la que inhibe (Wang y Smith 1984). Cuál de éstos es el fundamento real de este fenómeno de MMR en *Rhizobium* no puede conocerse mientras se carezca de mutantes bien caracterizados que permitan determinar la contribución de cada mecanismo de reparación en el mismo.

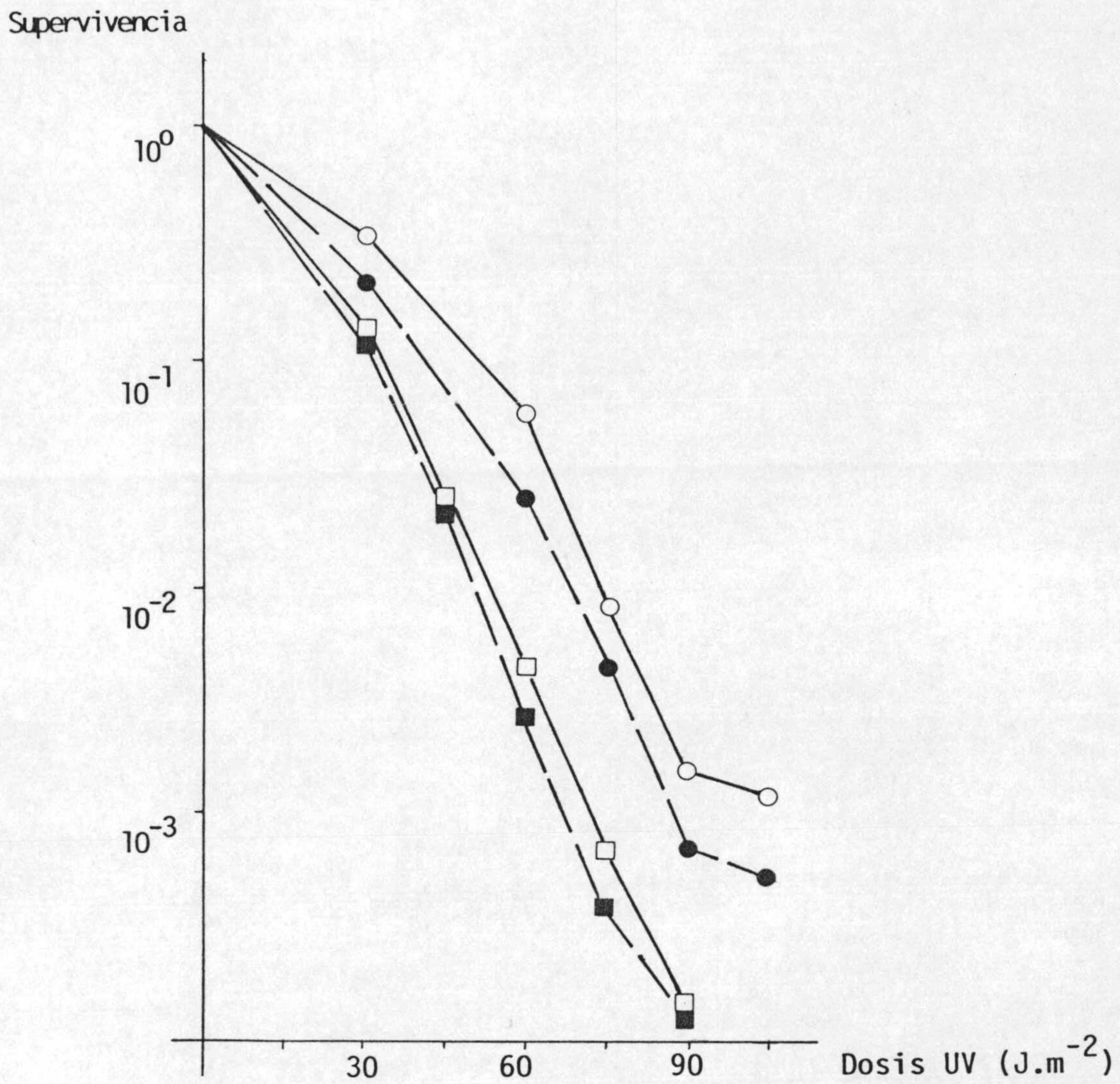


Figura 22.- Influencia del medio de crecimiento empleado antes y después de la irradiación con UV sobre la supervivencia de la estirpe GR4 en fase logarítmica. Células crecidas en YGT (■□) o en E3 (●○) fueron irradiadas y sembradas en el medio completo (símbolos cerrados) o en el medio mínimo (símbolos abiertos).

Por otra parte, se estudió el efecto en la supervivencia del medio de crecimiento antes del tratamiento con UV. Como se puede observar en la figura 22, en *R. meliloti* GR4 éste ejerce mayor influencia que el medio de siembra. Este resultado difiere de los obtenidos por Sharma *et al*, en los cuales el medio que afecta primordialmente a la supervivencia es el de después de la irradiación con UV. La base molecular y genética de este efecto es, como en el caso anterior, desconocida.

c.- INFLUENCIA DE LA NOVOBIOCINA

Von Wright y Bridges (1981) observaron que tanto las mutaciones en el gen *gyrB*, que codifica la subunidad B de la girasa, como la novobiocina, inhibidor de esta subunidad, al disminuir el grado de superenrollamiento cromosómico, dificultan la reparación post-replicativa y aumentan la reparación por escisión. El efecto de esta mutación en una estirpe con los dos mecanismos de reparación funcionales, depende de la contribución de los dos procesos en el aumento de supervivencia. Cualquier tendencia a aumentarla por un incremento en la reparación por escisión se opondría a la tendencia a reducirla por una disminución en la reparación post-replicativa, siendo el balance entre éstas difícil de predecir.

El estudio de la influencia en la supervivencia que ejerce la novobiocina en la estirpe GR4B indica que este antibiótico inhibe la reparación, con una inhibición incluso en grado mayor que la ejercida por la cafeína (figura 23). Esto indica que, según lo anteriormente dicho, en la reparación del ADN irradiado de esta estirpe, la reparación post-replicativa supone una fuerte contribución. De hecho, el grado de disminución en la supervivencia al sembrar las células irradiadas en medio adicionado de novobiocina, se asemeja al que recogen Von Wright y Bridges (1981) con una raza *uvrAgyrB* de *E. coli* respecto a

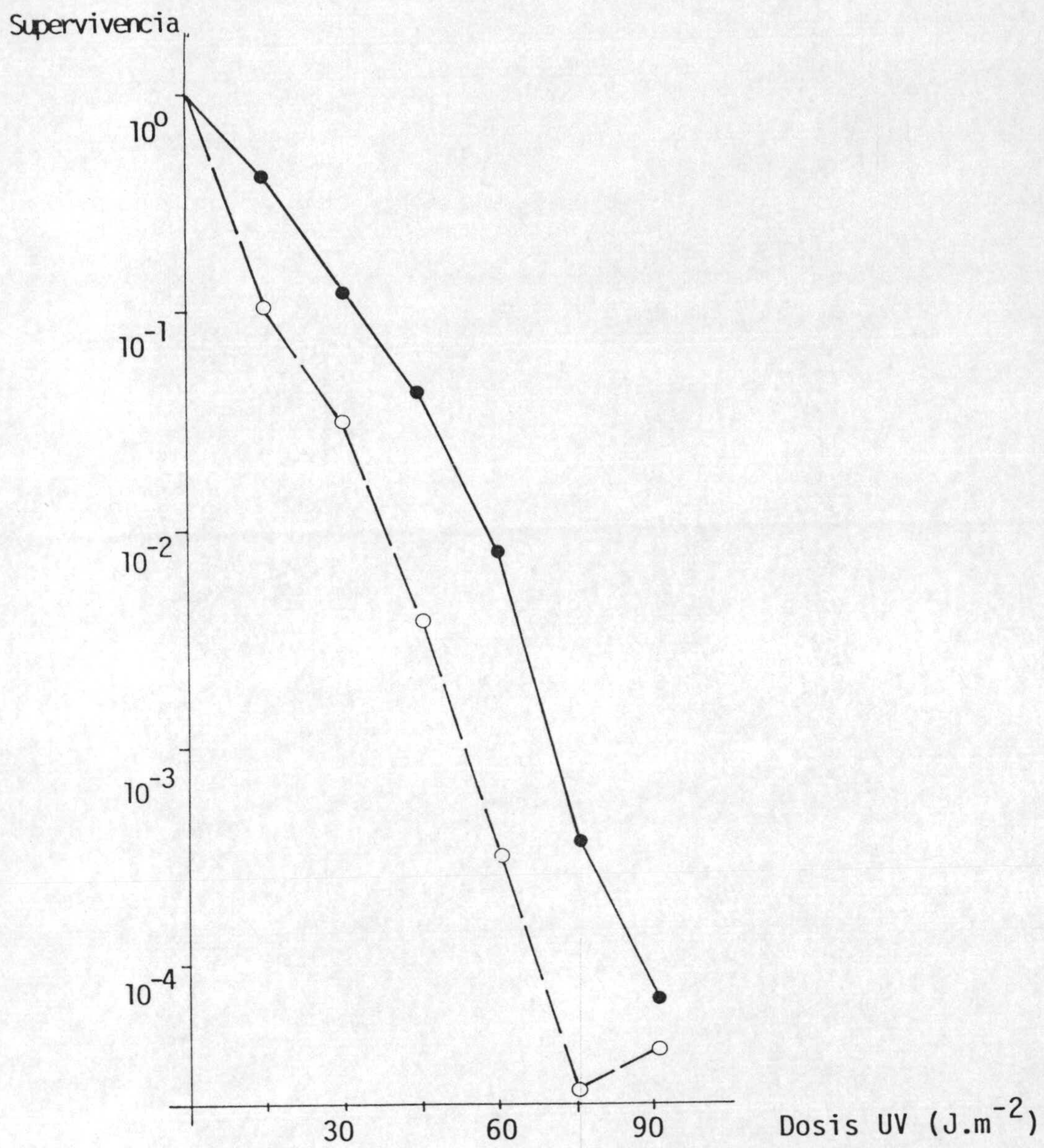


Figura 23.- Efecto de la novobiocina sobre la supervivencia de cultivos de GR4B en fase logarítmica irradiados con luz UV. (●) YGT, (○) YGT adicionado con $2\mu g.ml^{-1}$ de novobiocina.

su isogénica *uvrAgyrB*⁺. Ahora bien, en el caso de la GR4B aparece, como en el caso de la cafeína y la acriflavina, una tendencia al aumento de la inhibición hasta un máximo cuando el nivel de supervivencia del cultivo control es de 10^{-2} - 10^{-3} para luego tender a la disminución de esta inhibición (figura 24). La relación entre las supervivencias de la estirpe *uvrAgyrB/uvrAgyrB*⁺ obtenida por estos autores muestra un aumento continuo a medida que es mayor la dosis de UV aplicada. En la GR4B coexisten los dos mecanismos de reparación, tal como se ha indicado hasta el momento. El post-replicativo sería el que se viera gravemente afectado por la presencia de la novobiocina, pero al llegar a determinados niveles de inhibición, la acción negativa del antibiótico se vería detenida y rebasada por un efecto positivo sobre el mecanismo de escisión-resíntesis; el balance final sería entonces una disminución en el grado de inhibición ejercido por la novobiocina sobre la reparación.

Esto se corrobora en los experimentos con cultivos en distintos estados fisiológicos. Las células en fase estacionaria experimentan un menor efecto de la novobiocina, de forma que la relación entre los supervivientes en medio con el antibiótico respecto a los supervivientes crecidos en medio sin él, es menor en esta fase de crecimiento que en fase logarítmica. El mecanismo de escisión dispone de mayor tiempo para actuar en las células en fase estacionaria, y por ello, su contribución a la reparación será mayor. El efecto negativo de la novobiocina, por tanto, disminuirá.

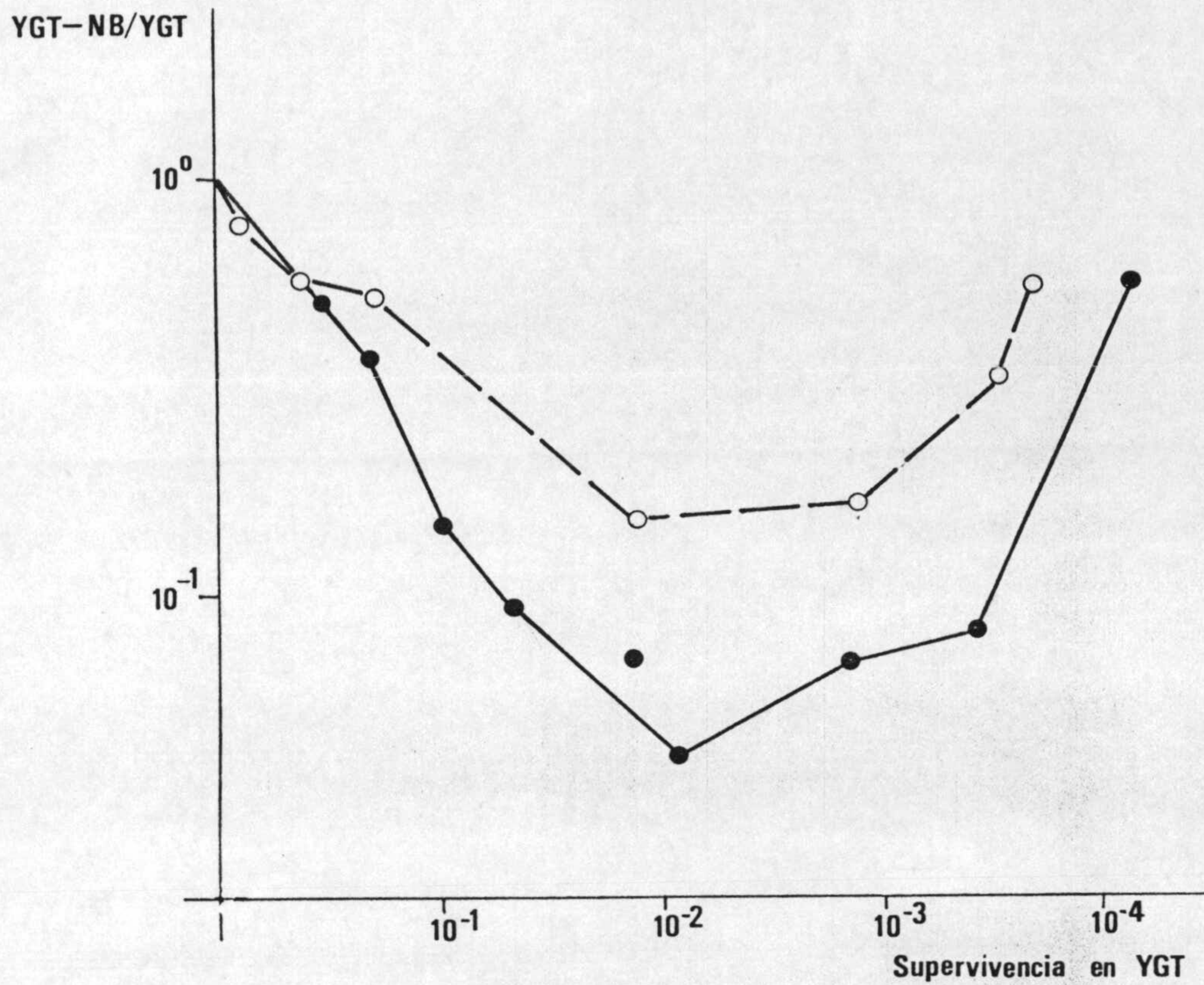


Figura 24.- Efecto inhibitorio de la novobiocina en la reparación de la estirpe GR4B. En ordenadas se representa la relación entre la supervivencia de células irradiadas sembradas en YGT+novobiocina y la de células irradiadas con la misma dosis sembradas en YGT. En abscisas se representa el nivel de supervivencia del cultivo control. (●) fase logarítmica, (○) fase estacionaria.

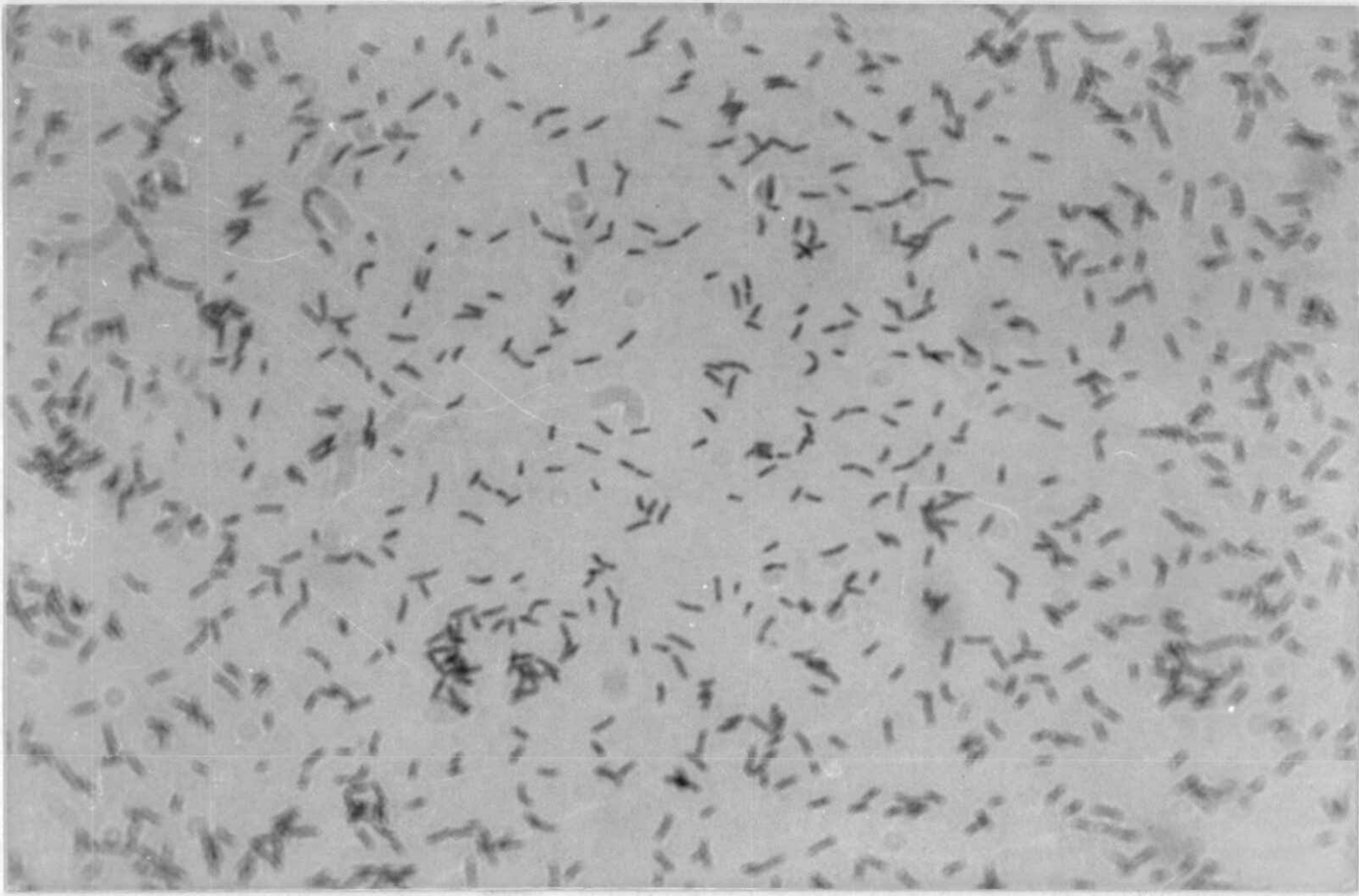
RESPUESTAS SOS

a.- FILAMENTACION

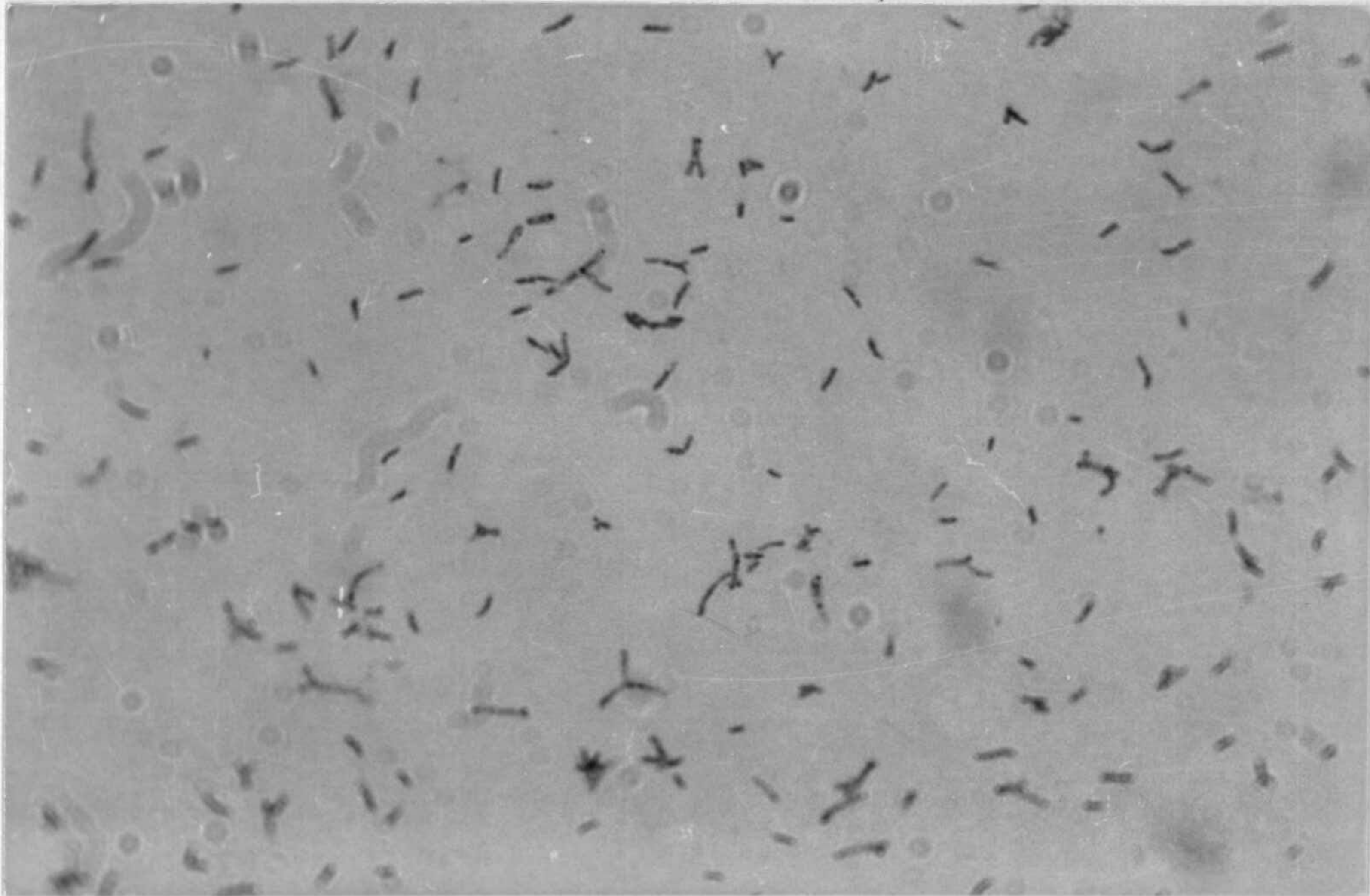
La inducción del sistema SOS en *E. coli* lleva a la expresión coordinada de una serie de nuevos fenómenos fisiológicos, entre los que se incluye la inhibición de la división celular o filamentación. Por este motivo, para la determinación de la existencia en *R. meliloti* de este sistema o uno similar al mismo, se estudió la aparición de filamentación tras el tratamiento con dos agentes que provocan la inducción del sistema SOS en *E. coli*: mitomicina C (MTC) y radiación UV. El tratamiento de cultivos de GR4 y GR4B con estos agentes dió lugar, después de la incubación durante varias horas, al crecimiento filamentosos de parte de las células tratadas. La observación cualitativa, no cuantitativa, de estas formas filamentosas, apreciables en la figura 25, fue realizada después de 10 horas de incubación. Este tiempo es considerablemente mayor al necesitado por otras bacterias, ya que Love y Yasbin (1984) indican un tiempo de 60-90 minutos para su apreciación clara con *B. subtilis* y Barbé et al (1983a) indican 45-60 minutos para *S. typhimurium*.

Así, este primer estudio apunta ya a la existencia de un sistema similar al SOS descrito para *E. coli*. La filamentación es provocada por ambos agentes, MTC y radiación UV. Es más clara cuando el tratamiento da lugar a un alto nivel de supervivencia (superior a 10^{-1}) y es notable el predominio de la filamentación en forma de X e Y (figura 25).

La inhibición de la división celular en *E. coli* parece ser debida al producto del gen *sulA*, cuya transcripción está bajo el control de *lexA*. Los niveles de la proteína Sula están también regulados por la actividad proteolítica del producto del gen *lon*, la proteína Lon (CapR) (Schoemaker et al 1984), una proteasa dependiente de ATP. Las



A



B

Figura 25.- Filamentación de las células de la estirpe GR4B a las 10 horas del tratamiento con luz UV. A) células no irradiadas. B) células irradiadas con una dosis de 15 J.m⁻².

formas filamentosas de GR4B observadas tras el tratamiento con UV se asemejan enormemente a las de los bacteroides aislados de nódulos (Olivares. Comunicación personal). Los bacteroides son las formas activas de fijación de nitrógeno en la simbiosis con la planta, y son células que aparte de otras modificaciones fisiológicas, han perdido la capacidad de dividirse. Los datos obtenidos de producción de filamentación, tras el tratamiento con UV, semejante a la observada en los bacteroides, inducen a pensar que el responsable de la filamentación en la respuesta al daño al ADN se active también en el proceso de infección y formación de nódulos en la planta, posiblemente por alguna (s) sustancia(s) procedente(s) de ésta. El hecho de que la filamentación se de no sólo con la luz UV, sino también con la MTC, apoyaría la posibilidad de que fuera en el caso de los bacteroides, un agente químico el inductor de dicho gen.

Por otra parte, el hecho de que la filamentación sea más clara con altos índices de supervivencia, apuntaría a una alteración subletal por parte de esa hipotética sustancia, suficiente para inducir la expresión del gen responsable de este fenómeno.

Por otra parte, Zurkowski (1982) utilizando el método de someter cultivos de *R. trifolii* a elevadas temperaturas para la obtención de mutantes *Nod*⁻, detecta al cabo de 5 días de incubación formas semejantes a las aquí obtenidas, esto es, células con la división celular y la síntesis de pared celular alteradas. Dicho autor observó que el proceso que se veía más inhibido por el sometimiento a elevadas temperaturas era el de síntesis de ADN. Así, las formas filamentosas podían ser consecuencia de la inducción del sistema SOS, debido a la parada en la replicación del ADN; no obstante, también existe la posibilidad de que sea una consecuencia más inespecífica del stress a que se ven sometidas estas células, ya que este tratamiento conduce también a la pérdida completa o parcial de plásmidos. Estos resultados por tanto indican la necesidad de un estudio genético más completo y profundo.

b.- MUTAGENESIS

La mutagénesis por UV es uno de los fenómenos que llevaron a la formulación del sistema SOS (Defais et al 1971; Radman 1975).

Para el estudio de este fenómeno en *R. meliloti* se han usado como marcadores la resistencia a la estreptomycin y la resistencia a la rifampicina, que son fácilmente seleccionables y que presenta una frecuencia de mutación espontánea baja (3-5 mutantes por cada 10^8 supervivientes), lo que permite una alta resolución en estos estudios de mutagénesis inducida.

La exposición de cultivos de GR4B a distintas dosis de UV dio lugar a un aumento en la tasa de mutación, variable de unos experimentos a otros, pero siempre significativo. Dicho aumento se mantiene constante en sus valores hasta dosis de 45 y 60 $J.m^{-2}$ para la resistencia a la rifampicina y estreptomycin respectivamente. Mayores dosis de UV conducen a una disminución en la tasa de mutación, alcanzando a veces valores incluso menores que los de la tasa espontánea.

El máximo incremento sobre la frecuencia de mutación espontánea ha sido de 12.6 (valor medio de cuatro experimentos) y de 92 veces (en un ensayo aislado) para la estreptomycin, y de 17.5 (media de dos experimentos) y 18.6 veces (en un ensayo aislado) para la rifampicina.

Estos valores están dentro de los obtenidos para otras bacterias y estos mismos marcadores (Thompson y Hart 1981; Walton y Moseley 1981a; Witkin 1966; Bridges et al 1983) para razas silvestres, y con los obtenidos por Olasz et al 1983, con *R. meliloti* 41 (AK631) y Rfr. Así, parece que en principio existe en *R. meliloti* una función inducible por UV que conduce a la formación de mutaciones.

Como puede observarse en las figuras 26 y 27, el aumento en la tasa de mutagénesis es función de la dosis aplicada, al menos hasta una determinada, independientemente del nivel de supervivencia alcanzado por los cultivos irradiados. En la figura 26 se muestra el incremento en la frecuencia de mutación de cultivos en fase logarítmica y en fase estacionaria. Como puede observarse, este incremento es similar para ambos cultivos cuando se representa en función de la dosis de UV suministrada (A). Ahora bien, si se representa en función de la supervivencia alcanzada con estas dosis (figura 26 B), la mutagénesis es más eficaz en fase logarítmica, donde el mecanismo de reparación por escisión es menos extensivo. Esta eficacia, a diferencia de la observada por Witkin con mutantes *uvr⁻*, no consiste en un aumento mayor de la frecuencia de mutación, sino en una mayor extensión de la misma, en el sentido de que los cultivos en fase estacionaria eliminan la mutagénesis con un nivel de supervivencia de 10^{-2} , mientras que los cultivos en fase logarítmica lo hacen con un nivel de supervivencia de 5×10^{-4} . Un resultado similar se obtiene con cultivos incubados a 28°C y a 37°C (figura 27). Como se vio anteriormente, las células incubadas a esta última temperatura crecen más rápido que a 28°C siendo por ello la existencia de la reparación por escisión aún menor. El rango en que se extiende la mutagénesis es mayor a 37°C que a 28°C.

Estos datos están en concordancia con lo recogido en la bibliografía. Witkin (1966) en *E. coli* indica ya que la pérdida de una capacidad detectada de reparación por escisión (en este caso, una disminución de tal actividad) no se ve acompañada por incrementos iguales en la sensibilidad a los efectos letales y a los efectos mutagénicos. Por otro lado, hoy día está claro que la secuencia local del ADN juega un papel en la determinación de la eficacia con que un mutágeno determinado causa mutaciones en un sitio particular. Para la mayoría de los "hotspots", dicha secuencia local no afecta la eficacia de la reparación exacta, sino más bien la eficacia con que se introducen las le-

$Sm^r/10^7$ supervivientes

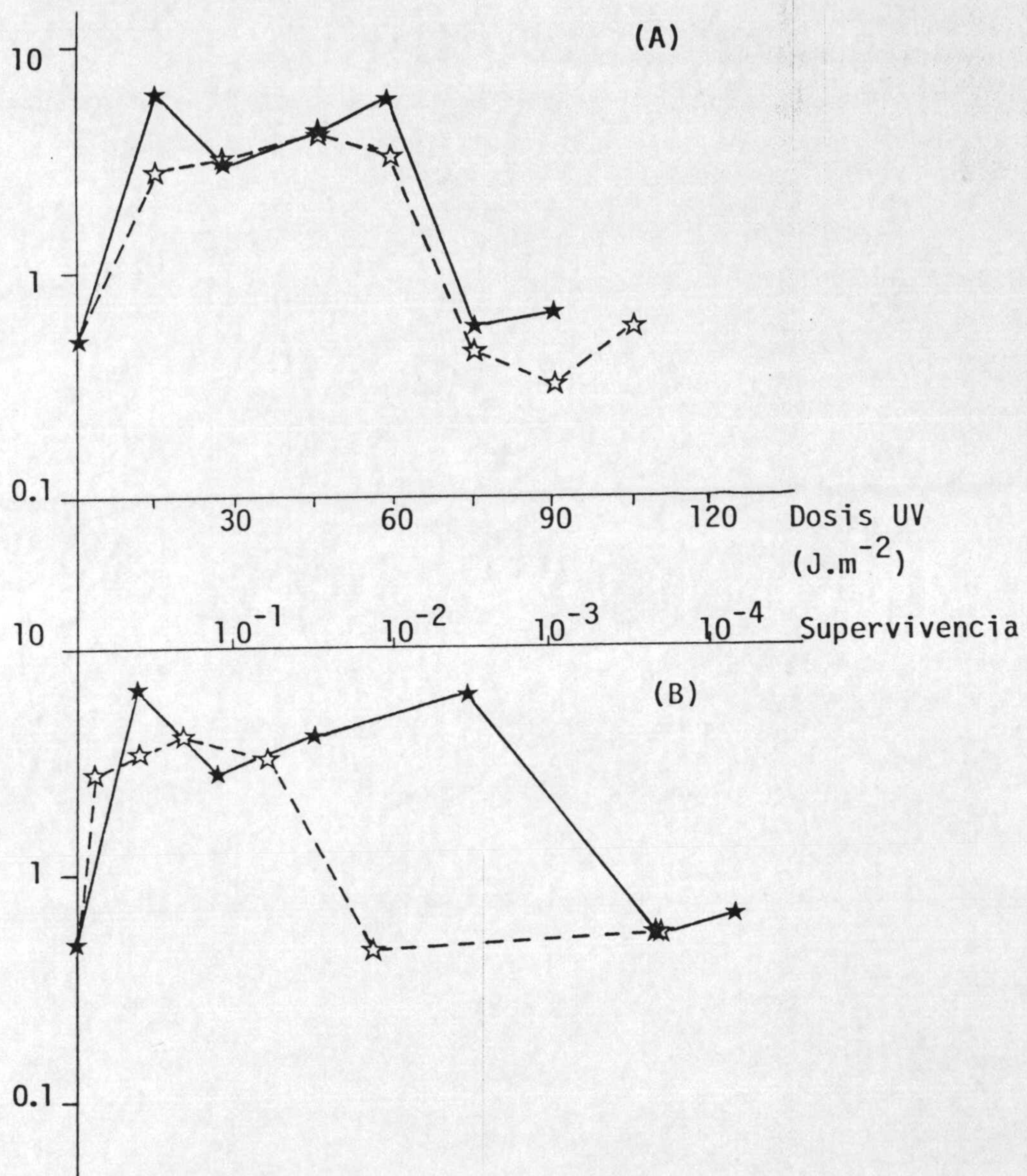


Figura 26.- Mutagénesis producida por la radiación UV en cultivos en fase logarítmica (\star) y en fase estacionaria (\star) de la estirpe GR4B. A) en función de la dosis de luz UV aplicada. B) en función del nivel de supervivencia alcanzado.

$Rf^r / 10^7$ supervivientes

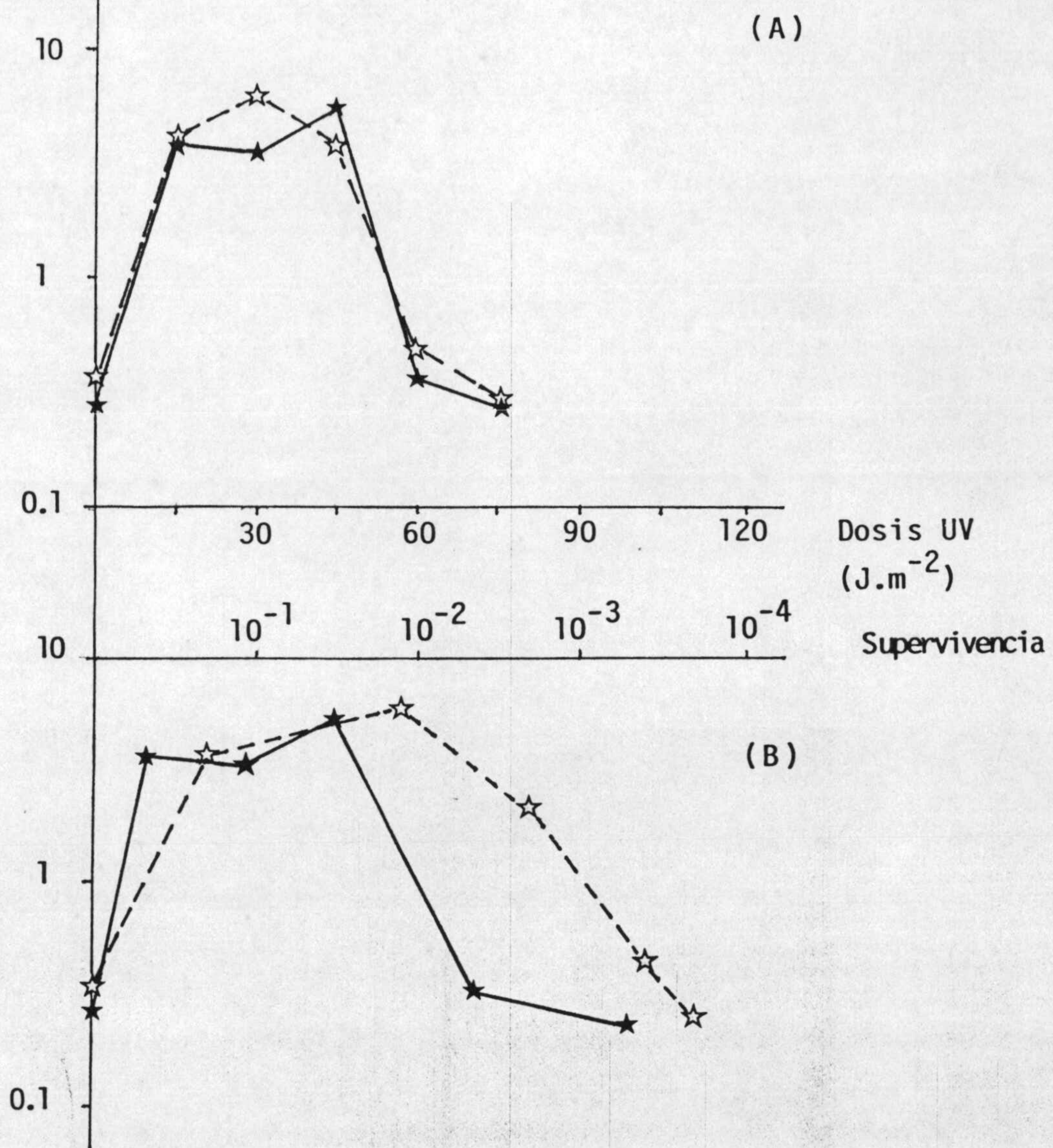


Figura 27.- Mutagénesis producida por la radiación UV en cultivos en fase logarítmica de la estirpe GR4B crecidos a 28°C (★) y a 37°C (☆) A) en función de la dosis de UV aplicada. B) en función del nivel de supervivencia alcanzado.

siones, con que el procesamiento SOS puede ocurrir, o ambas (Rev. Walker 1984, 1985; Miller 1985).

Para completar este estudio de mutagénesis, se realizaron distintos ensayos con mitomicina C. En la figura 28 se muestran las curvas de inactivación con este mutágeno y la ausencia de mutagénesis para el marcador Sm^r . Estos resultados tampoco son de extrañar, ya que algunas funciones SOS pueden inducirse por algunos tratamientos, pero no por otros (Guerrero y Barbé 1982; Barbé et al 1983b), y cada mutágeno tiene su propio espectro de mutaciones característico (Walker 1984, 1985).

En relación a los estudios de mutagénesis inducida en otras especies de *Rhizobium*, Watson y Moseley (1981a) observaron en *R. trifolii* irradiado con luz UV, un aumento máximo de mutantes Rf^r de 40 veces, cuando la supervivencia alcanzada era de alrededor de 5×10^{-2} . Esta tasa de mutación también disminuía al seguir irradiando los cultivos. Por su parte, estos autores no pudieron obtener un aumento significativo en la frecuencia de mutaciones con tratamientos con mitomicina C. Los datos obtenidos aquí con la estirpe GR4B son, por tanto, muy similares a los obtenidos por dichos autores.

Por el contrario, los resultados obtenidos por Olasz et al (1983) con *R. meliloti* 41 (AK631), indican un aumento continuo de mutantes Rf^r en función de la dosis de radiación UV aplicada, alcanzando un máximo de 77 veces sobre el nivel de mutación espontánea, cuando el nivel de supervivencia es de 10^{-3} . Así, hay una ligera divergencia en cuanto a la evolución y a la efectividad de la mutagénesis con tratamientos con radiación UV. Estos autores no indican nada sobre la mutagénesis con mitomicina C.

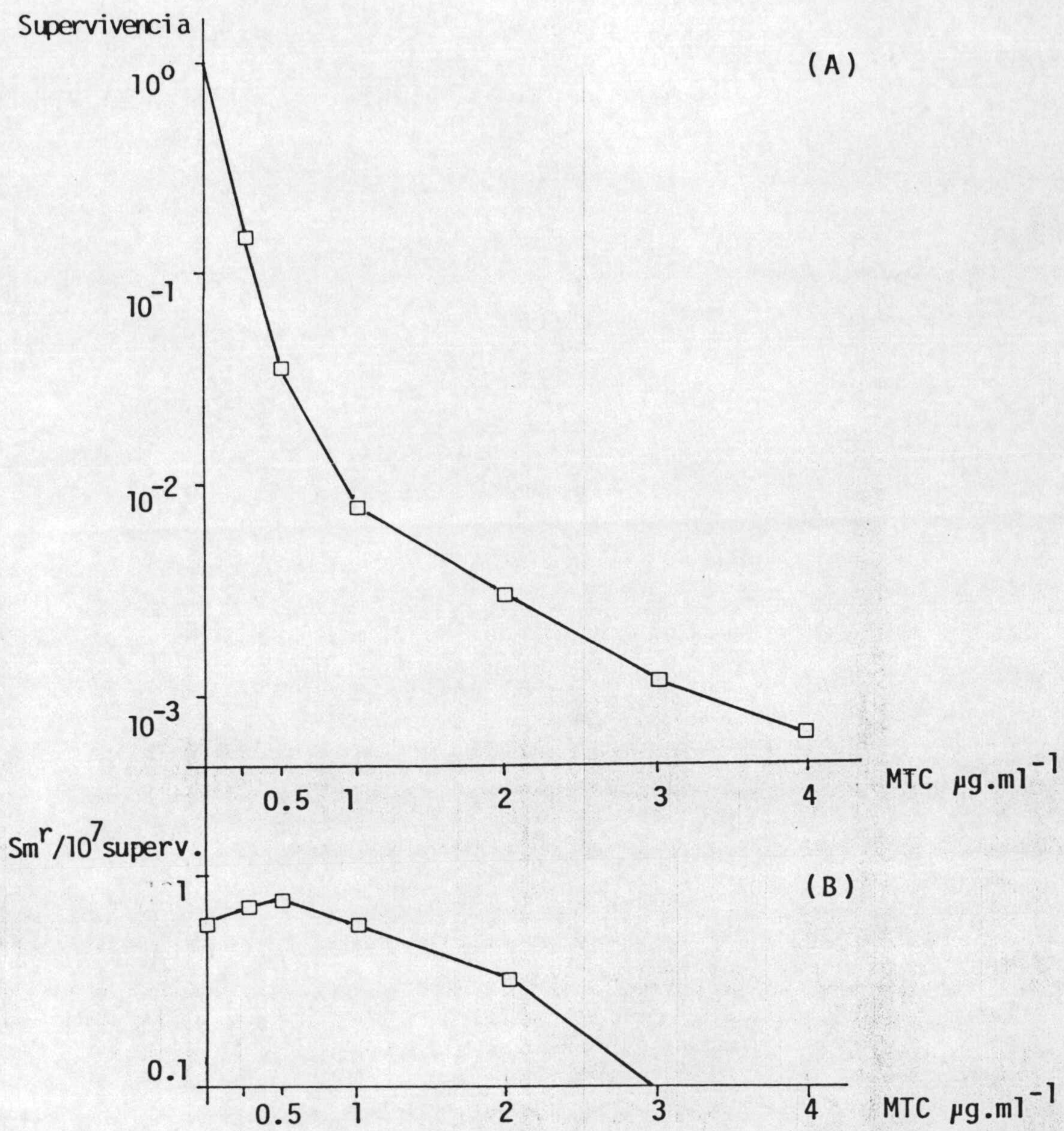


Figura 28.- Curva de supervivencia (A) y evolución de la tasa de mutación (B) en cultivos en fase logarítmica de la estirpe GR4B tratados con mitomicina C.

c.- EFECTO WEIGLE O REACTIVACION POR UV

Este fenómeno fue originalmente descrito por Weigle en 1953. Consiste en un aumento de la supervivencia de fagos irradiados con UV cuando infectan células a su vez expuestas a una baja dosis de UV antes de la infección. Este fenómeno se acompaña de una alta tasa de mutación (mutagénesis por UV o mutagénesis Weigle) del fago reactivado. Esta reactivación por UV depende sólo de procesos de la célula hospedadora (Devoret *et al* 1975).

Los estudios del efecto Weigle llevados a cabo con el fago DF2 sobre las estirpes Rm2 y GR4B arrojan datos que no son del todo concluyentes. Como se indica en la figura 29, se observa un ligero aumento en la supervivencia del fago cuando infecta a células previamente irradiadas. El factor de reactivación Weigle (FRW), determinado por la relación de fagos irradiados supervivientes cuando infectan células irradiadas respecto a los supervivientes infectando células no irradiadas, alcanza un máximo de 1.93 ± 0.3 . Devoret *et al* (1975) indican en *E.coli* valores positivos de FRW de 3 a 10. Love y Yasbin (1984) con *B. subtilis* indican como positivo un FRW de 2.5 ± 1.0 , y como negativo 1.7 ± 0.2 . Por el contrario, Yamamoto y Shinagawa (1985) en *E.coli* dan como FRW negativo un aumento de 2.

Estos resultados obtenidos y los datos disponibles de otras bacterias llevaron a estudiar la cinética de la reactivación Weigle, ya que el máximo de este fenómeno puede alcanzarse inmediatamente después de la irradiación, declinando con la incubación de las células irradiadas antes de la infección (Silva y Leitao 1984) o bien darse después de la incubación de las células irradiadas durante un tiempo antes de la infección por los fagos (Defais *et al* 1976). Los resultados obtenidos (figura 29) indican que el aumento detectado del FRW es sólo observable cuando los fagos irradiados infectan a las células inmedia-

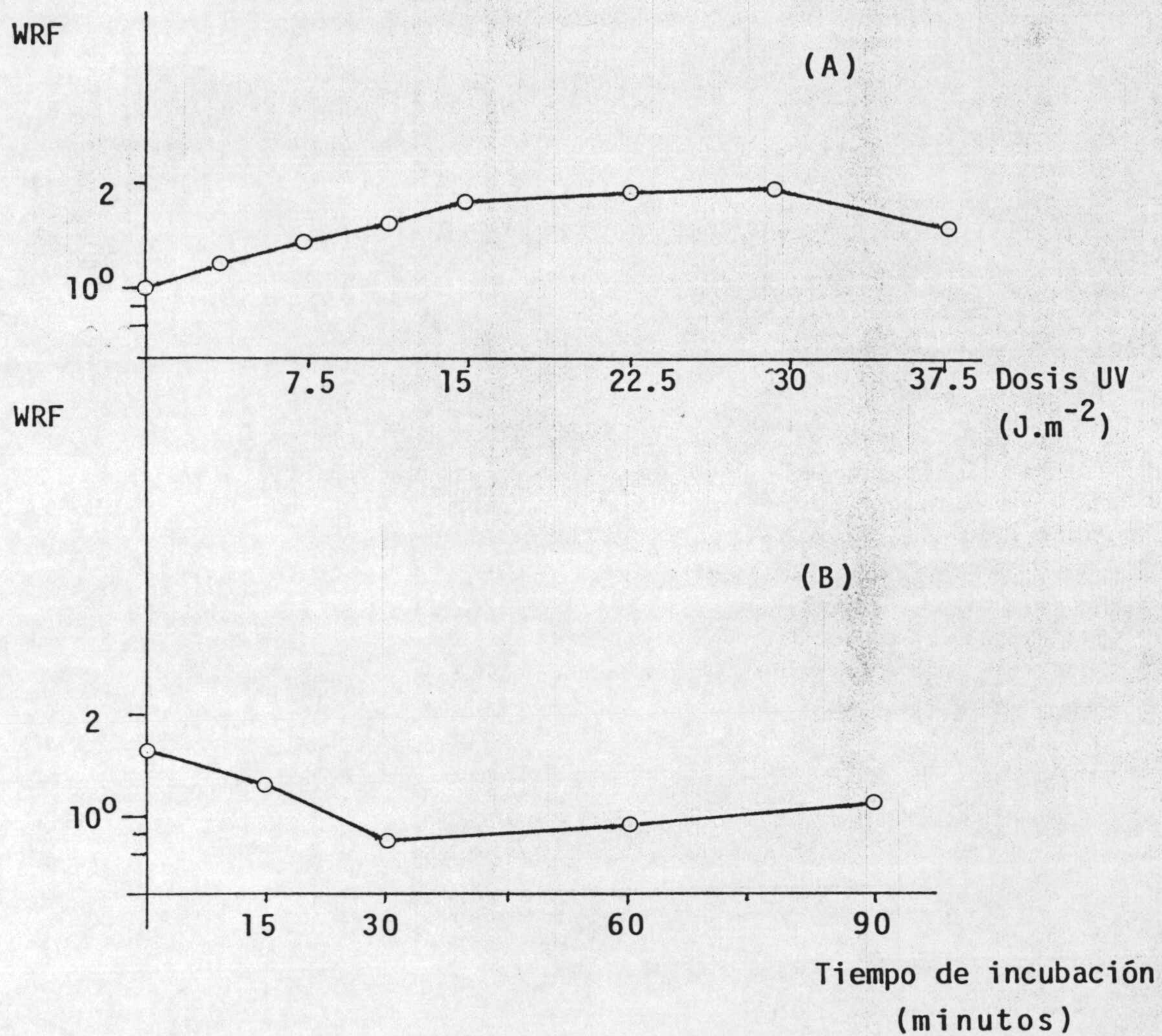


Figura 29.- A) Evolución del FRW en función de la dosis de UV aplicada a las células. B) Evolución del FRW en función del tiempo de incubación posterior al tratamiento de las células con UV y anterior a la infección de éstas por los fagos irradiados.

tamente después de que éstas sean irradiadas, desapareciendo por completo al cabo de los 15-20 minutos.

d.- INDUCCION LISOGENICA

Uno de los fenómenos desencadenados por el daño al ADN o por la inhibición de la replicación del mismo, dentro de la respuesta SOS, es la inducción lisogénica de profagos lambdoides. Este fenómeno no es debido a la inducción de genes SOS propiamente dichos, sino que se origina cuando la proteína RecA, activada como proteasa, rompe catalíticamente no sólo a la proteína represora del sistema SOS, la LexA, sino también al represor cI del profago λ , en un enlace alanina-glicina común a ambas proteínas, y de este modo, el profago inicia su ciclo lítico.

Esta inducción lisogénica, concomitante a las restantes funciones SOS ha sido descrita para los fagos λ , p22 y 434 (Phizicky y Roberts 1980).

En el estudio de la inducción lisogénica en *R. meliloti* se han empleado como agentes que dañan al ADN, la radiación UV y mitomicina C, y la estirpe Rm2 lisogenizada con el fago moderado AL1 [Rm2(AL1)]. La estirpe GR4B no pudo ser utilizada en estos estudios, ya que se comprobó en los diferentes intentos de obtención de una raza lisogénica que:

- 1.- en medio líquido, y tras 12 horas de incubación, aparecía un ligero aclaramiento del cultivo, -indicador de la presencia del fago-, en los tubos a los que se había inoculado una suspensión de AL1, sólo cuando la multiplicidad del fago en el momento de la inoculación era ≥ 2 . Si la multiplicidad era menor, no se observaba tal aclaramiento.

Esto no ocurría con la estirpe Rm2, en la cual incluso aparecía aclaramiento con multiplicidades de 10^{-2} , tras este tiempo de incubación de 12 horas.

2.- en medio sólido, por las técnicas de la doble capa y de la gota, no pudo observarse nunca la presencia de halos de lisis originados por el fago AL1, cuando se utilizaba como estirpe contraste la GR4B. Todos los estudios ulteriores de adsorción, multiplicación, posible presencia de otro fago lisogénico que confiera inmunidad a la GR4B frente al AL1, etc. se llevaron a cabo usando la estirpe Rm2 como contraste.

3.- las pruebas de adsorción de AL1 frente a GR4B indicaron que ésta oscilaba entre el 90-99%, por lo que se descartó la influencia de la adsorción en la ausencia de aclaramiento, que más bien debía ser consecuencia de problemas de restricción o modificación.

4.- no pudo detectarse ningún otro fago lisogénico en la estirpe GR4B que se indujera espontáneamente o tras tratamiento con distintas dosis de radiación UV. En estos estudios, se utilizó igualmente la Rm2 como contraste.

En lo que respecta a la inducción lisogénica de los profagos por agentes que dañan al ADN, los experimentos iniciales con la estirpe Rm2(AL1) y radiación UV parecieron indicar un aumento inmediato (en los primeros 30 minutos de incubación post-tratamiento) en el número de fagos libres, cuando los cultivos eran irradiados con dosis bajas de UV (por encima del 95% de supervivencia) y un aumento más tardío (detectable después de más de dos horas de incubación) en cultivos más fuertemente irradiados (20% de supervivencia). Por este motivo se siguió la cinética de inducción lisogénica con cultivos irradiados 0,15, 90 y 120 $J.m^{-2}$, durante 6 horas de incubación posterior al tratamiento.

Como puede observarse en las figuras 30 y 31, no se observó ningún aumento notable en el número de fagos libres durante este tiempo de incubación. En cuanto a la fracción de células inducidas (proporción entre el número de ufp.ml⁻¹ en el cultivo tratado y el número de ufc.ml⁻¹ antes de la irradiación), tampoco se observa aumento alguno con el tratamiento de radiación UV. Más bien se observa una ligera disminución (70.1% respecto a la inducción espontánea) para los cultivos irradiados con 120 J.m⁻². Por su parte, la inducción espontánea presentó cierta variabilidad de unos experimento a otros, siendo la media de $8.0 \times 10^{-2} \pm 5.3$.

En lo que respecta al número de células viables, se observa un aminoramiento en el ritmo de crecimiento en los períodos de incubación, períodos que se hacen más largos a medida que el tratamiento con UV es mayor (figura 31 B). Sin embargo, pasadas las cuatro horas de incubación, la velocidad de crecimiento de los cultivos tratados es similar a la de los cultivos no tratados. La disminución inicial en dicho ritmo de crecimiento no se refleja en el número de fagos libres por lo que no es debida a la lisis por fagos inducidos.

En cuanto a la mitomicina C, tampoco el tratamiento con este antibiótico dió lugar a la inducción lisogénica del fago AL1. Como se muestra en la figura 32, el número de fagos libres aumenta de igual forma en los distintos cultivos, independientemente de la dosis de MTC administrada. La fracción de células inducidas tampoco sufre variación de unos cultivos a otros. En esta figura se muestran hasta 5½ horas de incubación, pero ensayos preliminares con concentraciones de hasta 3 µg.ml⁻¹ de mitomicina C y 24 horas de incubación arrojaron datos igualmente negativos.

Los resultados aquí obtenidos no concuerdan con los de Olasz *et al* (1983). Estos autores desarrollan un método para obtener mutantes *rec⁻* de *R.meliloti* 41 (AK631) cuyo primer paso consiste en la induc-

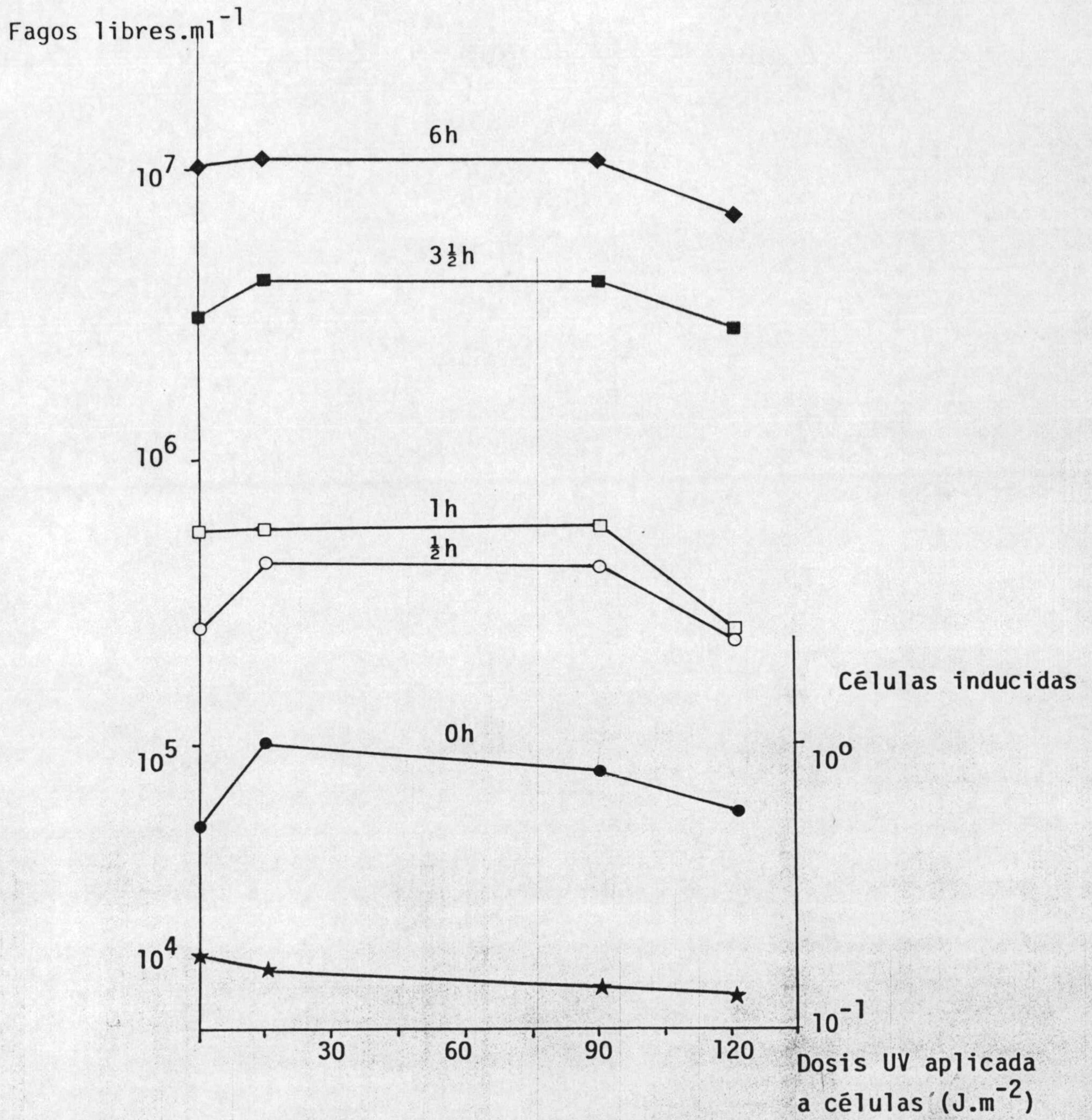


Figura 30.- Evolución del número de fagos libres (●○□■◆) y de células inducidas (★) en el período posterior al tratamiento con UV de las células lisogénicas de la estirpe Rm2 (AL1).



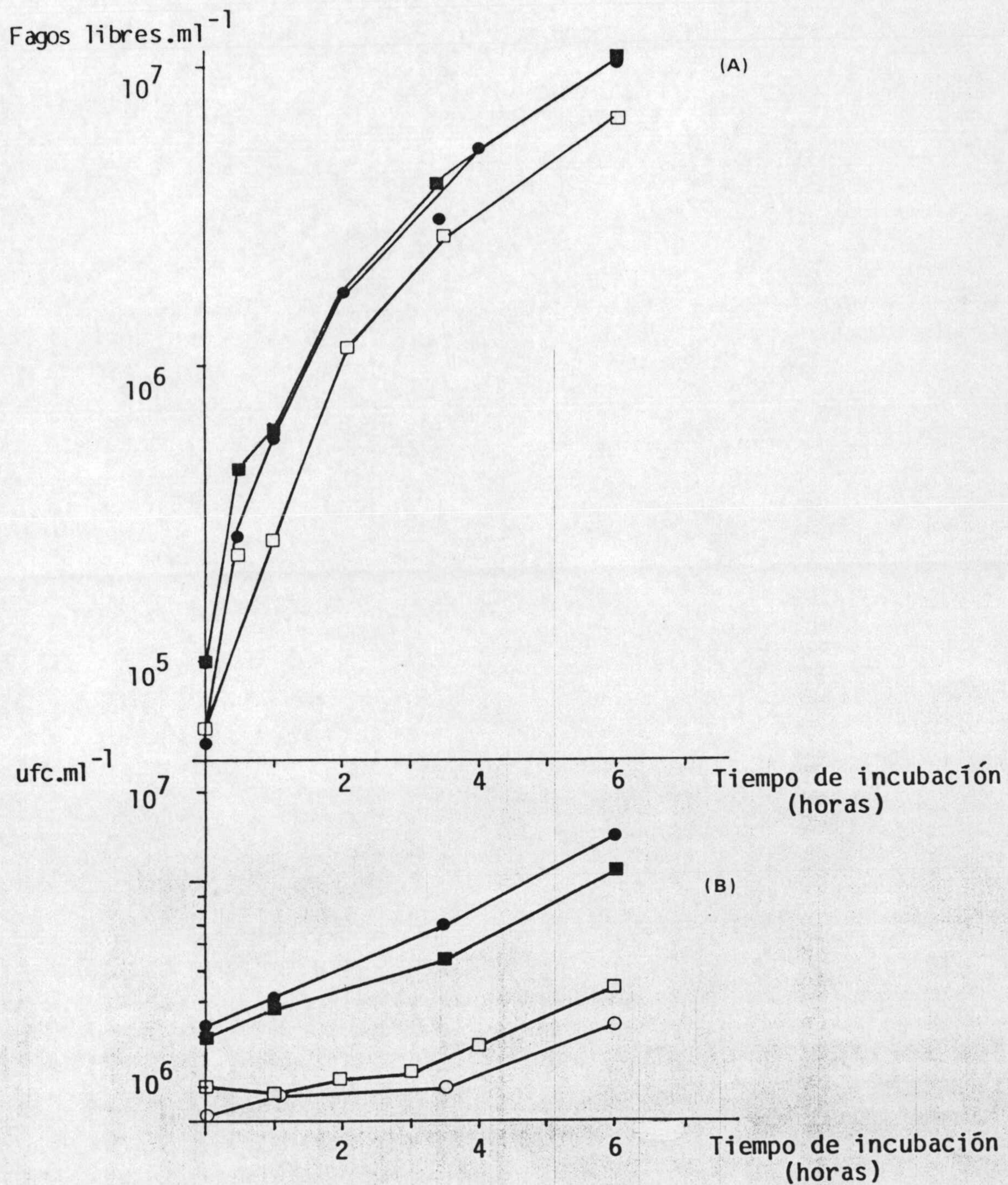


Figura 31.- A) Evolución del número de fagos libres después de irradiar con UV cultivos de Rm2 (AL1). B) Evolución del número de células en los cultivos lisogénicos irradiados con UV. Cultivos irradiados con 0 J.m⁻² (●), 15 J.m⁻² (■), 90 J.m⁻² (□) y 120 J.m⁻² (○).

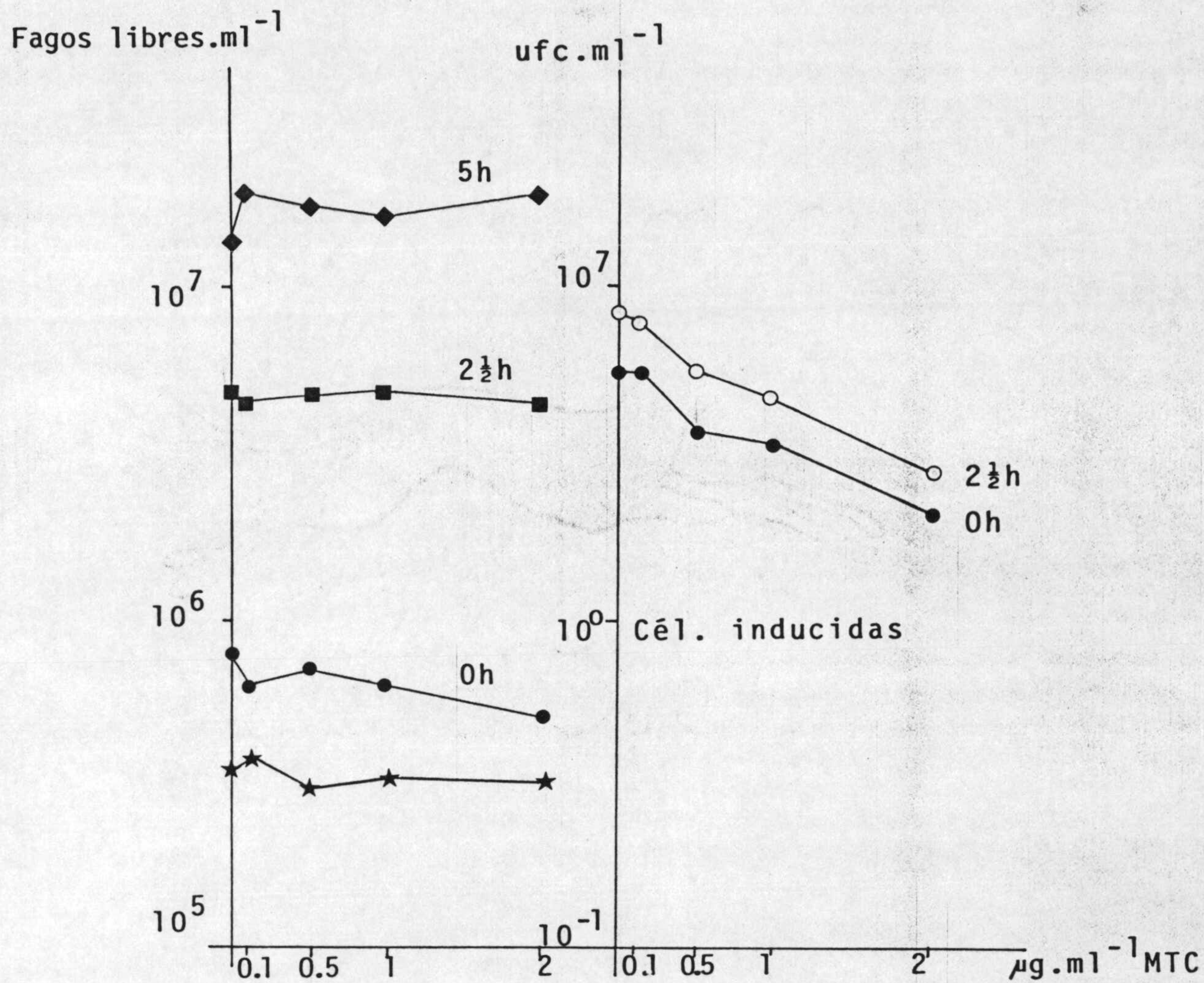


Figura 32.- A) Evolución del número de fagos libres (\bullet \blacksquare \blacklozenge) y de células inducidas (\star) en el período de incubación posterior al tratamiento con mitomicina C. B) Evolución del número de células tras el tratamiento con mitomicina C.

ción lisogénica del fago moderado 16-3 (*ti3*) al someter a la estirpe lisogénica Rm41(16-3*ti3*) a la acción de $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de mitomicina C, concentración con la que según estos autores se da la inducción en las lisogénicas, pero no la muerte celular en células no lisogénicas. Sin embargo, estudios de inactivación con MTC en medio YGT y la estirpe GR4B dan un porcentaje de supervivencia de 5×10^{-2} con dicha concentración. El máximo de inducción obtenido con este tratamiento se alcanza a las 5 horas de incubación, con un incremento de fagos libres entre 15 y 200 veces. Esta inducción se da también al irradiar cultivos de Rm41 con $166 \text{ J}.\text{m}^{-2}$ en medio completo YTB. Los mutantes *rec1* (*rec-26*) y *rec2* (*rec-212*) no son inducibles con ninguno de los tratamientos empleados.

La ausencia de inducción lisogénica en los estudios con la Rm2 (AL1) podría deberse a:

1.- que la proteína represora del profago AL1 sea resistente a la rotura proteolítica por una proteína semejante a la RecA de *E. coli*, con lo que no se daría una inducción lisogénica paralela a la de otras funciones SOS por agentes que dañan al ADN.

2.- que la estirpe Rm2(AL1) con la que se llevaron a cabo estos experimentos, fuera del tipo *rec*⁻, y hubiera sido aislada en el proceso de obtención de raza lisogénica, cosa poco probable. Sería entonces semejante a los mutantes *rec1* y *rec2* de la Rm41 (AK631), y por tanto, no se daría inducción alguna de fagos tras el tratamiento con agentes que dañan el ADN. Dichas cepas *rec1* y *rec2* son más sensibles al UV que la cepa silvestre, aunque no en tan alto grado como los mutantes *recA*⁻ de *E. coli*. Sin embargo, las curvas de inactivación de la raza Rm2(AL1) no sólo no muestran una mayor sensibilidad al UV que la Rm2, de la que procede, sino que incluso presentan mayor resistencia a la radiación (figura 33). Este aumento en la supervivencia podría explicarse asumiendo que el fago AL1 portaría algún gen que contribuyera a una repa-

Supervivencia

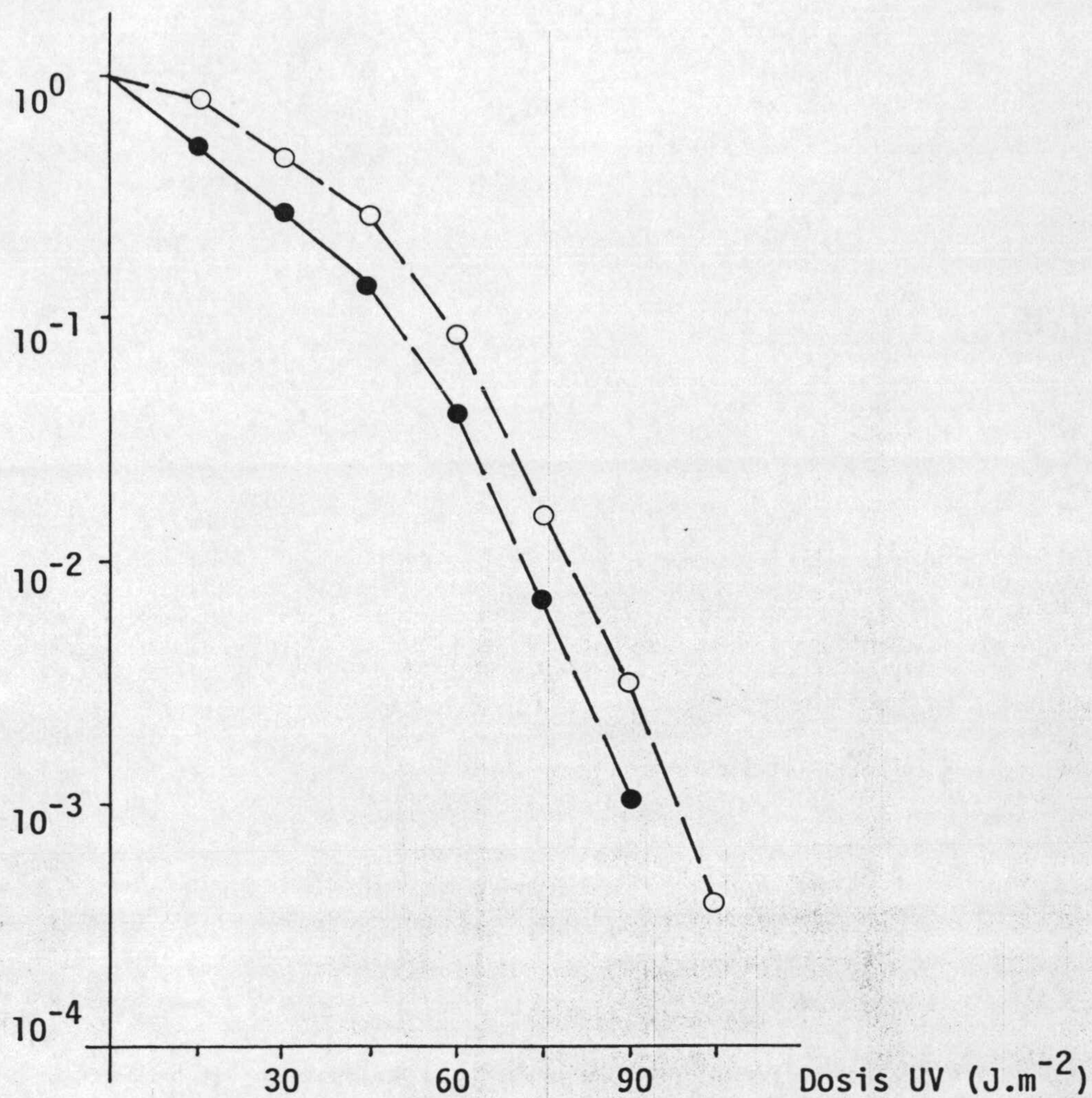


Figura 33.- Curvas de supervivencia de cultivos en fase logarítmica de las estirpes Rm2 (●) y Rm2 (AL1) (○) irradiados con distintas dosis de luz UV.

ración más eficaz, tal como lo hacen algunos plásmidos, por ejemplo los genes *mucA* y *mucB* en el pKM101 (Walker 1977; Perry y Walker 1982). De hecho, las curvas de inactivación del fago AL1 muestran mucha menos pendiente (por tanto, mayor supervivencia) que las del fago DF2, infectando ambos fagos a cultivos de Rm2, con una multiplicidad de 10^{-2} (figura 34) Este aumento en la capacidad de reparación se daría prioritariamente sobre su propio cromosoma y el celular, ya que la reparación del fago DF2 es ligeramente mayor cuando infecta a células de la estirpe Rm2 que cuando lo hacen sobre la Rm2(AL1), con un incremento que oscila entre 1.12 y 3.7, siendo la media de 1.86 (figura 35).

Para la determinación de la contribución real a la reparación que supone este aumento de la dotación genética en la raza Rm2(AL1), sería necesario un conocimiento genético tanto del fago AL1 como de la estirpe Rm2, conocimiento del que se carece en el momento actual.

3.- que el mecanismo de inducción lisogénica como función SOS fuera distinto al descrito para *E. coli*. Sin embargo, esto no está de acuerdo con los trabajos de Olsz *et al* (1983).

4.- Love y Yasbin (1984) proponen un modelo de sistema semejante al SOS de *E. coli* para *B. subtilis*, de control genético más complejo que el de la enterobacteria. En tal modelo se dan varias vías, dependientes de diversos genes, una de las cuales conduce a la filamentación, otra a la inducción lisogénica y reactivación Weigle, y otra a la mutagénesis, transformación de células competentes y otras funciones SOS. A este modelo lo denominan SOB. Si en *R. meliloti* se diera un sistema semejante al postulado por estos autores, podrían explicarse los diferentes datos obtenidos en este apartado de estudios de los fenómenos SOS. Así, los resultados negativos del efecto Weigle y la inducción lisogénica serían debidos a la ausencia o al defecto de alguno de los genes responsables de esta vía (que sería funcional en la Rm41). La filamentación y la mutagénesis, debida a otros genes, no se afecta-

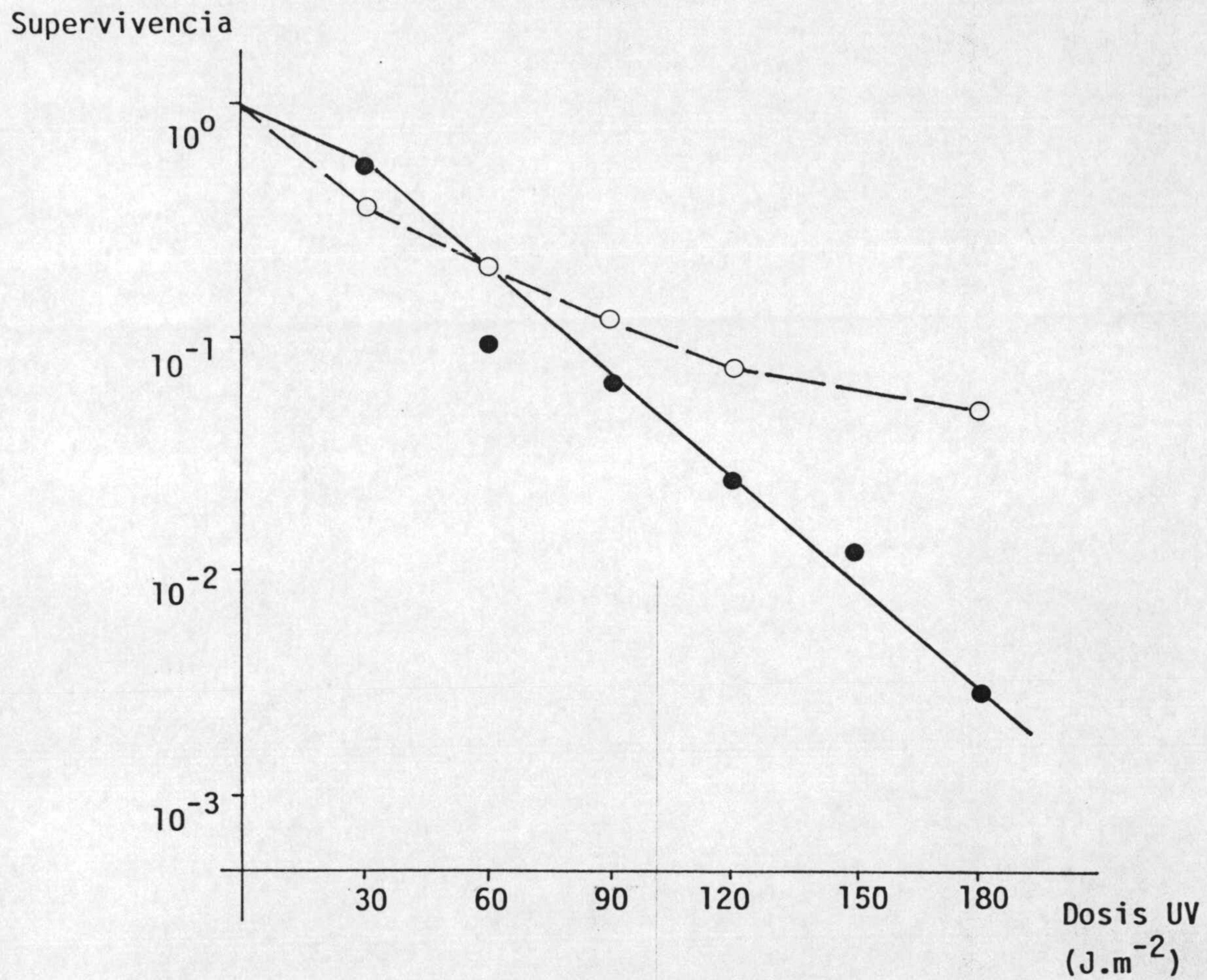


Figura 34.- Curvas de inactivación de los fagos DF2 (●) y AL1 (○) infectando células de la estirpe Rm2.

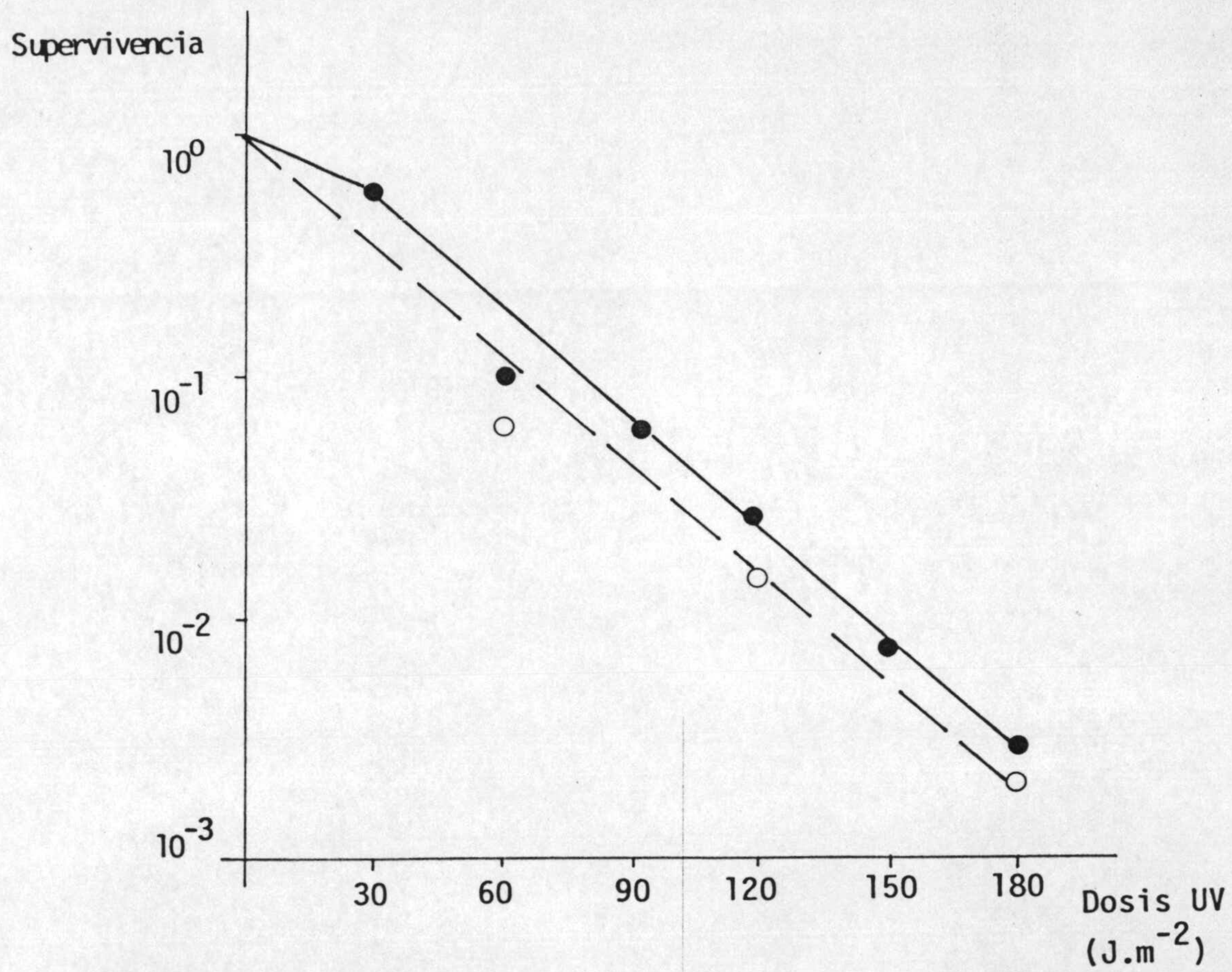


Figura 35.- Curvas de inactivación del fago DF2 infectando células de la estirpe Rm2 (●) y Rm2 (AL1) (○).

ría por la deficiencia de aquella, por lo que ambos fenómenos pueden ser observados.

Por otra parte y en relación con este modelo SOB, la existencia en *R. meliloti* de un sistema similar podría aglutinar las distintas hipótesis formuladas en relación con el sistema SOS. En *B. subtilis* se ha asociado la inducción lisogénica del sistema SOS con el estado de competencia de esta especie (Yasbin *et al* 1975; Love y Yasbin 1984). Por su parte, Heumann *et al* (1984) han propuesto que el sistema SOS en *Rhizobiaceae* se acompaña, además de la reparación del ADN dañado, de un reordenamiento genético que conduce a otra especie distinta, este último cuando las condiciones de recuperación, posteriores al tratamiento que daña al ADN, son muy severas. Por otro lado, como ya se ha visto, podría existir una posible relación entre las vías del sistema SOS y las que conducen a modificación a bacteroides de estas células. Sería por tanto posible que en *Rhizobium* se presentase también un modelo complejo del sistema SOS, con respuestas inducidas muy diferentes entre sí, que se diesen en diferente grado según la alteración producida y el entorno que rodea a las células (ésto es, las condiciones de post-irradiación), conduciendo a fenómenos diferentes: Transformación a bacteroides con actividad funcional para fijar nitrógeno en simbiosis después de tratamientos suaves y condiciones de post-tratamiento particulares; recuperación de las células a su estado normal después de la expresión transitoria de los fenómenos SOS con algunas alteraciones fijadas (mutagénesis); o evolución a otro tipo de especie con tratamientos fuertes y condiciones de recuperación extremas (reordenamiento genético). Es obvio que el esclarecimiento de esta hipótesis requiere una mayor profundización en los estudios genéticos de esta bacteria.



ESTUDIOS CON LA ESTIRPE GRP4

Debido por un lado a la gran dotación genética que presentan las especies de *Rhizobium* en forma de plásmidos de muy diverso tamaño, portadores de genes involucrados en la simbiosis con las leguminosas y en la fijación de nitrógeno (Rev. Toro y Olivares 1985), y por otro lado, debido a la presencia en algunos plásmidos de genes relacionados con los mecanismos de reparación (Walker 1977; Perry y Walker 1982), se pensó en la posibilidad de que en *R. meliloti* alguno (s) de los genes cuyo producto interviene en la reparación del ADN, estuviera localizado en la dotación genética plasmídica.

Así, se llevó a cabo la curva de supervivencia de la estirpe GRP4 un derivado de *R. meliloti* (Palomares 1975) curado con naranja de acridina de los plásmidos pRmeGR4a y PRmeGR4b. En efecto, tal como se indica en la figura 36, la sensibilidad al UV de esta raza es mucho mayor que la GR4B, en la que todos los plásmidos pRme están presentes, pareciendo indicar que la suposición de que alguno (s) de los genes involucrados en la reparación está localizado en uno de ellos, es acertada. Intentando profundizar más en este aspecto, se llevaron a cabo nuevas curvas de supervivencia, utilizando medio de post-irradiación con y sin cafeína. El inhibidor afecta también a la supervivencia de los cultivos de GRP4 si bien en menor cuantía a como lo hace sobre la GR4B (figuras 37 y 38). Esto indica que todavía hay un mecanismo de escisión-resíntesis funcional, que se ve inhibido por la cafeína, pero cuya extensión no es tan grande como en la estirpe silvestre. Una posible explicación a esto, sería que en *R. meliloti* hubiera dos contribuciones distintas, una cromosómica y otra plasmídica, al funcionamiento de este mecanismo. La ausencia de la dotación plasmídica determinaría una mayor sensibilidad de la célula a la radiación UV, tal como si se tratara de un mutante *uvr*⁻. No obstante, no sería tan sensible como los aislados de *E. coli* debido precisamente a la contribución

Supervivencia

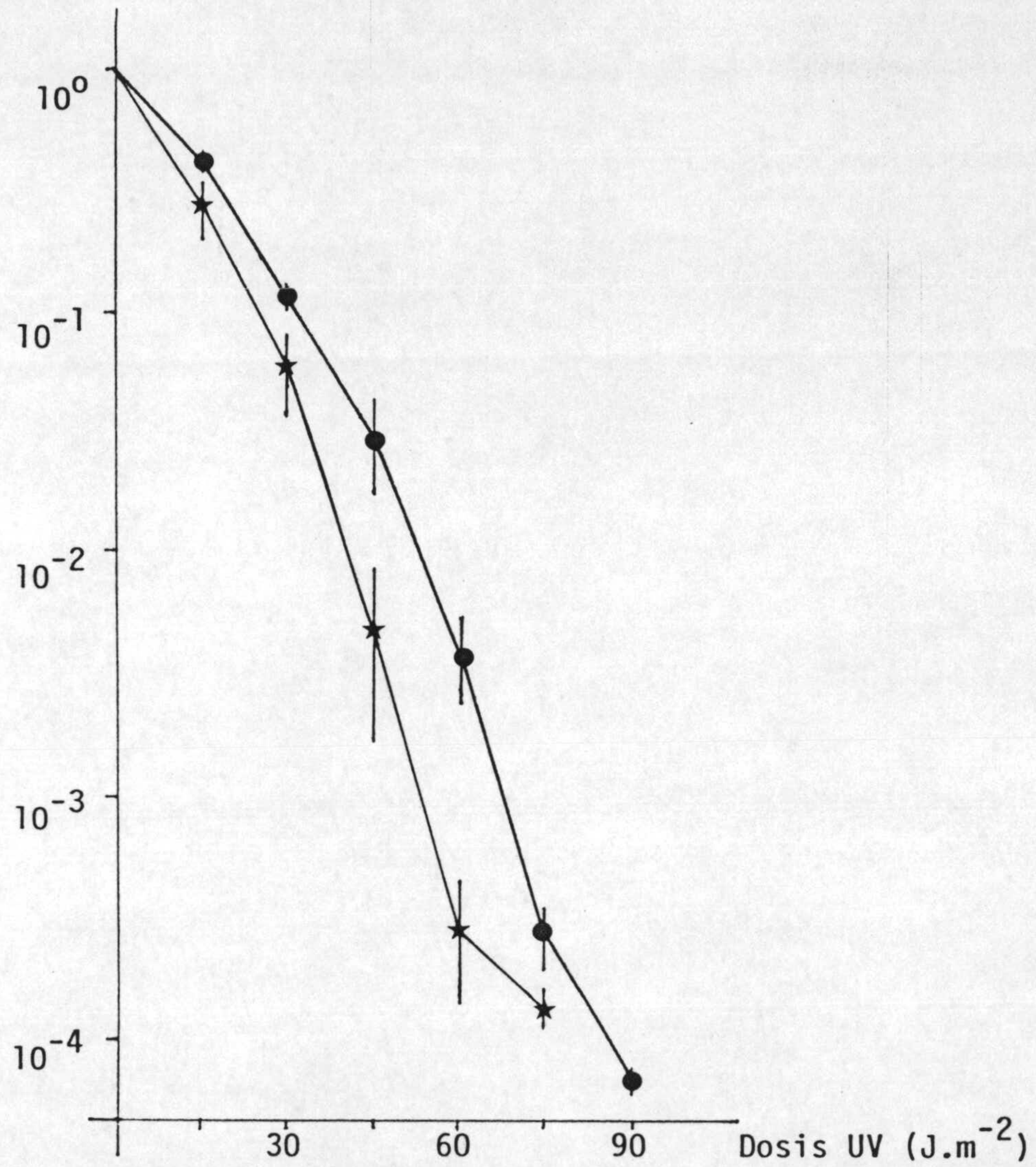


Figura 36.- Curvas de supervivencia de las estirpes GR4B (●) y GRP4 (★) en fase logarítmica tratadas con radiación UV.

Supervivencia

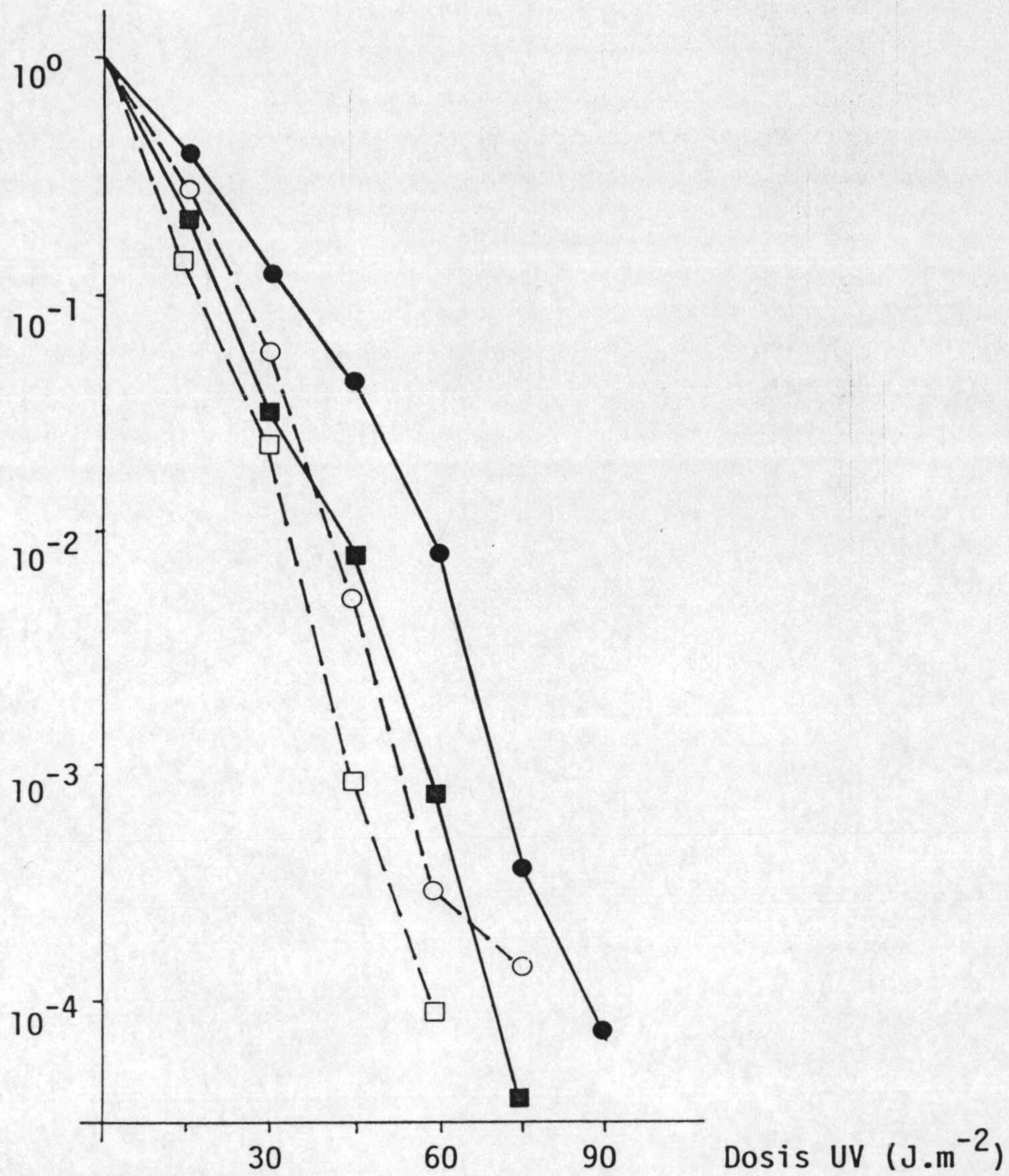


Figura 37.- Efecto de la cafeína en la supervivencia de cultivos en fase logarítmica de las estirpes GR4B (● ○) y GRP4 (■ □). Símbolos cerrados: células irradiadas sembradas en YGT. Símbolos abiertos: células irradiadas sembradas en YGT adicionado con $1mg.ml^{-1}$ de cafeína.

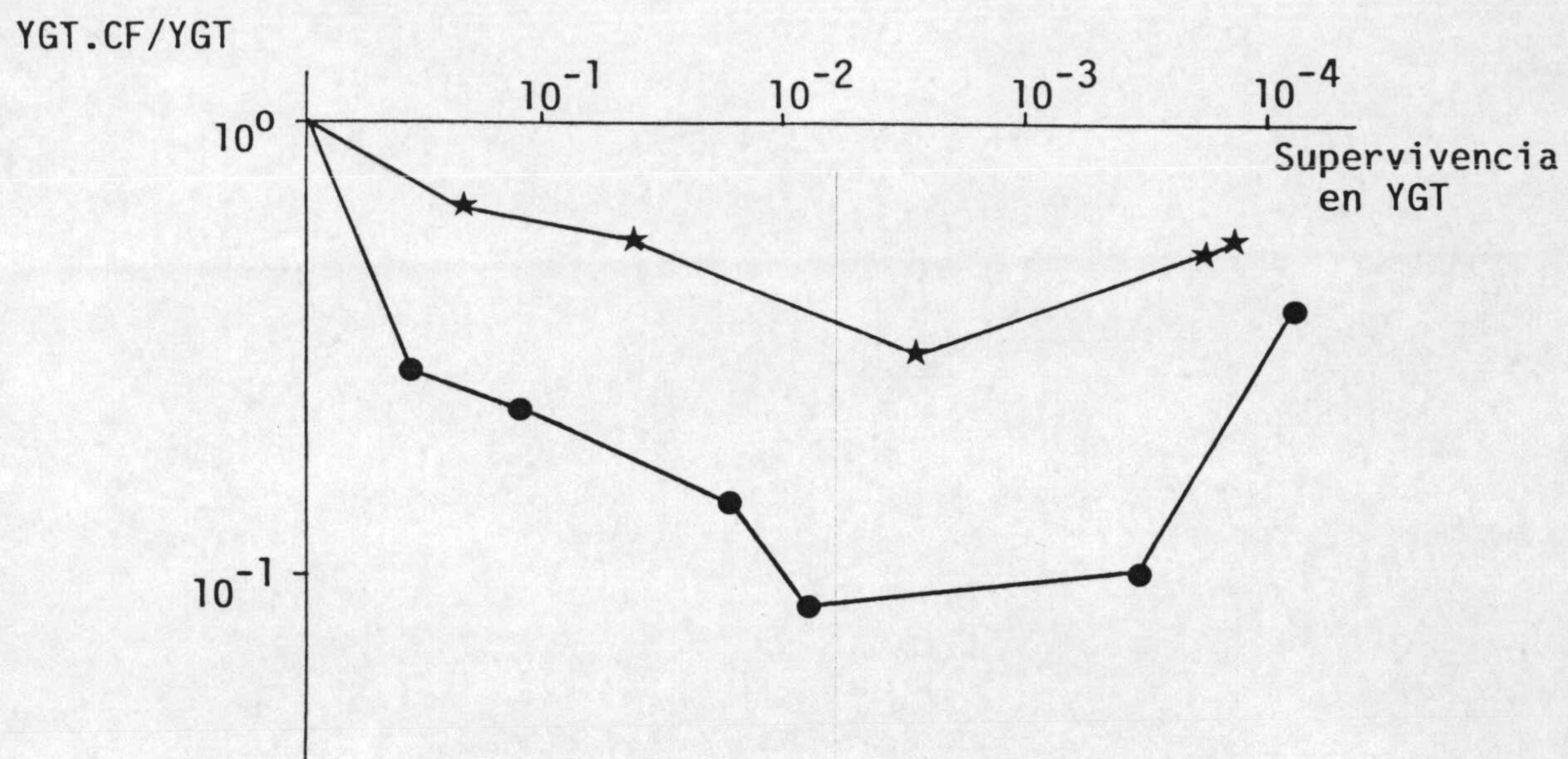


Figura 38.- Nivel de inhibición ejercido por la cafeína sobre la reparación de cultivos en fase logarítmica de las estirpes GR4B (●) y GRP4 (★) irradiados con luz UV.

cromosómica, que por su parte sería la causa de que se observe el efecto de la cafeína en la GRP4. Esta hipótesis explicaría asimismo la dificultad encontrada hasta ahora para obtener mutantes *uvr*⁻ semejantes a los de *E. coli*, ya que para ello sería necesario suprimir o mutar ambas dotaciones. Ballesteros (1980) consiguió obtener dos mutantes *uvr*⁻ de *R. meliloti* GR4, uno de ellos mucho más sensible al UV que el otro, y con la capacidad HCR también menor. Podría ser que el mutante *uvr*⁻ más resistente al UV fuera similar a la GRP4 en el sentido de que hubiera mutado en una de las contribuciones, aquella de la que carece esta última. Si esto es así, es posible que sea más fácil obtener mutantes *uvr*⁻ a partir de la estirpe GRP4. Por otro lado, sería interesante y necesario determinar cuál de los plásmidos de los que ha sido curado es el responsable de esta mayor sensibilidad al UV.

CONCLUSIONES

- 1.- Las estirpes GR4, GR4B, Rm2, UR-1 y AK631 de *R. meliloti* carecen del sistema de fotorreparación enzimática.
- 2.- *R. meliloti* presenta un sistema de reparación por escisión-resíntesis inhibible por la cafeína y la acriflavina. Es posible, sin embargo, la existencia conjunta de una vía alternativa de este mecanismo de reparación que se inicie por enzimas no inhibibles por estas drogas, del tipo UV-glicosilasa-AP-endonucleasas.
- 3.- *R. meliloti* presenta igualmente un mecanismo de reparación por recombinación que supone una contribución considerable a la reparación del ADN dañado.
- 4.- En las estirpes GR4B y Rm2 de *R. meliloti* parece existir un sistema inducible en respuesta al daño al ADN semejante al procesamiento SOS descrito para *E. coli*, si bien presenta algunas diferencias con respecto a las respuestas desencadenadas y a los agentes inductores de las mismas.
- 5.- Los plásmidos de *R. meliloti* pKmeGR4a y/o pKmeGR4b parecen desempeñar un papel importante en la reparación del ADN dañado con radiación UV.

BIBLIOGRAFIA

- AL-BAKRI G., M.W. MACKAY, P.A. WHITTAKER y B.E.B. MOSELEY, 1985. "Cloning of the DNA repair genes *mtcA*, *mtcB*, *uvrD*, *uvrE* and the *leuB* gene from *Deinococcus radiodurans*". *Gene*. 33, 305-311.
- ALLEN O.N., 1951. "Experiments in soil bacteriology". Burgess Publish. Minneapolis.
- ARIAS A., C. CERVENANSKY, A. GARDIOL y G. MARTINEZ-DRETS, 1979. "Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* 137, 409-414.
- AUSUBEL F.M., 1982. "Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation" *Cell* 29, 1-2.
- BACHMANN B.J., 1983. "Linkage map of *Escherichia coli* K12, edition 7". *Microbiol. Rev.* 47, 180-230.
- BAGG A., C.J. KENYON y G.C. WALKER, 1981. "Inducibility of a gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5749-5753.
- BALLESTEROS F., 1980. "Aislamiento de mutantes de *Rhizobium meliloti* deficientes en la reparación del ADN". Memoria de licenciatura. Facultad de Farmacia. Univ. Granada.
- BANFALVI Z., V.SAKANYAN, C. KANCZ, A. KISS, I. DUSHA y A. KONDOROSI, 1981. "Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R. meliloti*". *Mol. Gen. Genet.* 184, 318-325.
- BARBE J., A. VILLAVERDE y R. GUERRERO, 1983a. "Indirect induction of SOS functions in *Salmonella typhimurium*". *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 471-484.
- BARBE J., J.A. VERICAT y R. GUERRERO, 1983b. "Discriminated induction of SOS functions in *Escherichia coli* by alkylating agents". *J. Gen. Microbiol.* 129, 2079-2089.
- BEN-ISHAH R. y R. SHARON, 1978. "Patch size and base composition of ultraviolet light-induced repair-synthesis in toluenized *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 120, 423-432.
- BERINGER J.E., J.L. BENYON, A.V. BUCHANAN-WOLLASTON y A.W.B. JOHNSTON, 1978a. "Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*". *Nature* 276, 633-634.
- BERINGER J.E., S.A. HOGGAN y A.W.B. JOHNSTON, 1978b. "Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R-plasmid-mediated recombination". *J. Gen. Microbiol.* 104, 201-207.

BERINGER J.E., N. BREWIN, A.W.B. JOHNSTON, H.M. SCHULMAN y D.A. HOPWOOD, 1979. "The *Rhizobium*-legume symbiosis". Proc. Roy. Soc. London B. 204, 219-233.

BERINGER J.E., N.J. BREWIN y A.W.B. JOHNSTON, 1980. "Genetics of *Rhizobium*". Heredity 45, 187-200.

BERINGER J.E., J.E. RUIZ SAINZ y A.W.B. JOHNSTON, 1984. "Methods for genetics manipulation of *Rhizobium*". En Grainger J.M. y J.M. Linch eds. Microbiological Methods for Environmental Biotechnology, 79-94.

BERNSTEIN C., 1981. "Deoxyribonucleic acid repair in bacteriophage". Microbiol. Rev. 45, 72-98.

BETTER M. y D.R. HELINSKI, 1983. "Isolation and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium meliloti*". J. Bacteriol. 155, 311-316.

BLANAR M.A., S.J. SANDLER, M.E. ARMENGOD, L.W. REAM y A.J. CLARK, 1984. "Molecular analysis of the *recF* gene of *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4622-4626.

BLANCO M., G. HERRERA, P. COLLADO, J.E. REBOLLO y L.M. BOTELLA, 1982. "Influence of RecA protein on induced mutagenesis". Biochimie. 64, 633-636.

BOYCE R.B. y P. HOWARD-FLANDERS, 1964. "Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K12". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 293-300.

BRANDSMA J.A., D. BOSCH, C. BACKENDORF y P. VAN DE PUTTE, 1983. "A common regulatory region shared by divergently transcribed genes of the *Escherichia coli* SOS system". Nature 305, 243-245.

BRASH D.E. y W.A. HASELTINE, 1982. "UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots" Nature 298, 189-192.

BRENT R., 1982. "Regulation and autoregulation by *lexA* protein". Biochimie 64, 565-569.

BREWIN N.J., T.M. DEJONG, D.A. PHILLIPS y A.W.B. JOHNSTON, 1980. "Co-transfer of determinants for hydrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum*". Nature 288, 77-79.

BRIDGES B.A. y R.P. MOTTERSHEAD, 1978. "Mutagenic DNA repair in *Escherichia coli* VII: Involvement of DNA polimerase III in constitutive and inducible mutagenic repair after ultraviolet and gamma irradiation". Mol. Gen. Genet. 162, 35-41.

BRIDGES B.A. y R. WOODGATE, 1985. "Mutagenic repair in *Escherichia coli*: Products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at

different steps in UV-induced mutagenesis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4193-4197.

BRIDGES B.A., M.W. SOUTHWORTH y E. ORR, 1983. "Mutagenic repair in *Escherichia coli*. VIII: Effect of *gyrB* mutations on ultraviolet mutagenesis". Mutat. Res. 112, 3-16.

BUCHANAN-WOLLASTON V., 1979. "Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*". J. Gen. Microbiol. 112, 135-142.

BUCHANAN-WOLLASTON A.V., J.E. BERINGER, N.J. BREWIN, P.R. HIRSCH y A.W.B. JOHNSTON, 1980. "Isolation of symbiotically defective mutants in *Rhizobium leguminosarum* by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible". Mol. Gen. Genet. 178, 185-190.

CAILLET-FAUQUET P., G. MAENHAUT-MICHEL y M. RADMAN, 1984. "SOS mutator effect in *E. coli* mutants deficient in mismatch correction". EMBO J. 3, 707-712.

CAMPBELL L.A. y R.E. YASBIN, 1979. "Deoxyribonucleic acid repair capacities of *Neisseria gonorrhoeae*; absence of photoreactivation" J. Bacteriol. 140, 1109-1111.

CAMPBELL L.A. y R.E. YASBIN, 1984. "A ADN excision repair for *Neisseria gonorrhoeae*". Mol. Gen. Genet. 139, 561-563.

CARON R.P., S.R. KUSHNER y L. GROSSMAN, 1985. "Involvement of helicase II (*uvrD* gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the *uvrABC* protein complex". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4925-4929.

CASADABAN M.J. y S.N. COHEN, 1980. "Lactose genes fixed to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4530-4533.

CASADESUS J. y J. OLIVARES, 1979a. "Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome". Mol. Gen. Genet. 174, 203-209.

CASADESUS J. y J. OLIVARES, 1979b. "General transduction in *R. meliloti* by a thermosensitive mutant of bacteriophage DF2". J. Bacteriol. 139, 316-317.

CASADESUS J., E. IÑEZ y J. OLIVARES, 1980. "Transposition of Tn1 to the *Rhizobium meliloti* genome". Mol. Gen. Genet. 180, 405-410.

CASSE F., M. DAVID, P. BOISTARD J.S. JULLIOT, C. BOUCHER, L. JOUANIN, T. HUGUET y J. DENARIE, 1979a. "Presence of large plasmids and use of IncP-1 factors in *Rhizobium*". En Timmis K.N. y A. Pühler eds. Plasmid of Medical Environmental and Commercial Importance. Elsevier North Holland. Amsterdam. 329-338.



- CASSE F., C. BOUCHER, J.S. JULLIOT, M. MICHEL y J. DENARIE, 1979b. "Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electroforesis". J. Gen. Microbiol. 113, 229-242.
- CASSUTO E., J. MURSALIM y P. HOWARD-FLANDERS, 1978. "Homology dependent cutting in trans in extracts of *Escherichia coli*: an approach to the enzymology of genetic recombination". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 620-624.
- CERUTTI P.A., 1975. "Repairable damage in DNA: Overview". In Hanawalt P.C. y R.B. Setlow ed. Molecular Mechanism for Repair of DNA Part A, Plenum Press. New York. 3-12.
- CLARK N.B. y A.D. MARGULIES, 1965. "Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *E. coli* K-12". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 451-459.
- COLE R.S. y R.R. SINDEN, 1975. "Repair of cross-linked DNA in *Escherichia coli*" in Hanawalt P. y R.B. Setlow ed. Molecular Mechanisms for repair of DNA. Plenum Publishing Corp. New York
- COOPER P.K., 1982. "Characterization of long patch excision repair of DNA in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*: An inducible function under Rec-Lex Control". Mol. Gen. Genetic. 185, 189-197.
- COOPER P.K. y P.C. HANAWALT, 1972a. "Heterogeneity of patch size in repair replicated DNA in *Escherichia coli*". J. Mol. Biol. 67, 1-10.
- COOPER P.K. y P.C. HANAWALT, 1972b. "Role of DNA polymerase I and the *rec* system in excision repair in *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 1156-1160.
- CORRAL E., E. MONTOYA y J. OLIVARES, 1978. "Sensitivity to phages in *R. meliloti* is a plasmid consequence. Microbios Lett. 5, 77.
- D'ARI R., 1985. "The SOS system". Biochimie. 67, 343-347.
- DEFAIS M., 1985. "The adaptative response in *E. coli*". Biochimie 67, 357-360.
- DEFAIS M., P. FAUQUET, M. RADMAN y M. ERRERA, 1971. "Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetics systems". Virology 43, 495-503.
- DEFAIS M., P. CAILLET-FAUQUET, M.S. FOX y M. RADMAN, 1976. "Induction kinetics of mutagenic DNA repair in *E. coli* following ultraviolet irradiation". Mol. Gen. Genet. 148, 125-130.

- DEMPLE B. y S. LINN, 1980. "DNA-N-glycosylase and UV-repair". *Nature* 287, 203-208.
- DENARIE J., P. BOISTARD, F. CASSE-DELBART, A.G. ATHERLY, J.O. BERRY y P. RUSSEL, 1981. "Indigenous plasmid of *Rhizobium*". *Internatl. Rev. Cytol. Supplement* 13, 225-240.
- DEVORET R., M. BLANCO, J. GEORGE y M. RADMAN, 1975. "Recovery of phage λ from ultraviolet damage". In Hanawalt P.C. y R.B. Setlow ed. *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*. Plenum Press. New York, 155-171.
- DRAKE J.W. y R.H. BALTZ, 1976. "The biochemistry of mutagenesis". *Ann. Rev. Biochem.* 45, 11-37.
- DULBECCO R., 1949. "Reactivation of ultraviolet inactivated bacteriophage by visible light". *Nature* 163, 949-950.
- ELDER R.L. y R.F. Jr. BEERS, 1965. "Nonphotoreactivating repair of ultraviolet light-damaged transforming deoxyribonucleic acid by *Micrococcus lysodeikticus* extracts". *J. Bacteriol.* 90, 681-686.
- ELLEDGE S.J. y G.C. WALKER, 1983a. "The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage". *J. Bacteriol.* 155, 1306-1315.
- ELLEDGE S.J. y G.C. WALKER, 1983b. "Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis: identification of the products of the *umuC* locus of *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 164, 175-192.
- ENNIS D.G., B. FISHER, S. EDMISTON y D.W. MOUNT, 1985. "Dual role for *Escherichia coli* RecA protein in SOS mutagenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3325-3329.
- EVANS D.M. y B.E.B. MOSELEY, 1985. "Identification and initial characterisation of a pyrimidine dimer UV endonuclease (UV-endonuclease β) from *Deinococcus radiodurans*; a DNA-repair enzyme that requires manganese ions". *Mutat. Res.* 145, 119-128.
- FACON J.P., M. BECHET y J.B. GUILLAUME, 1984. "A cloning vector derived from an indigenous small plasmid of *R. meliloti*". En Veeper C. y W.J. Newton eds. *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Nijhoff/Junk Publisher. The Hague. 680.
- FINAN T.M., E. HARTWIEG, K. LE MIEUX, K. BERGMAN, G.C. WALKER y E.R. SIGNER, 1984. "General transduction in *Rhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* 159, 120-124.
- FORRAI T., E. VINCZE, Z. BANFALVI, G.B. KISS, G.S. RANDHAWA y A. KONDOROSI, 1983. "Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* 153, 635-643.

FOSTER P.L., E. EISENSTADT y J. CAIRNS, 1982. "Random components in mutagenesis". *Nature* 299, 365-367.

FRANKLIN W.A. y W.A. HASELTINE, 1984. "Removal of light-induced pyrimidine-pyrimidone (6-4) products from *Escherichia coli* DNA require the *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* gene products". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3821-3824.

FRANKLIN W.A., K.M. LO y W.A. HASELTINE, 1982. "Alkaline lability of fluorescent photoproducts produced in ultraviolet light-irradiated DNA". *J. Biol. Chem.* 257, 13535-13543.

FUKUY A., K. HIEDA y Y. MATSUDAIRA, 1982. "Light-flash analysis of the photoenzymatic repair process in yeast cells. III.-The photoenzymic repair of respiratory-sufficient and respiratory-deficient cells cultured aerobically and anaerobically". *Mutat. Res.* 93, 389-399.

GANESAN A.K., 1974. "Persistence of pyrimidine dimers during postreplication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 87, 103-119.

GANESAN A.K. y K.C. SMITH, 1968. "Dark recovery processes in *Escherichia coli* irradiated with ultraviolet light. I.- Effect of *rec⁻* mutation on liquid-holding recovery". *J. Bacteriol.* 96, 365-373.

GANESAN A.K. y P.C. SEAWELL, 1975. "The effect of *lexA* and *recF* mutations on post-replication repair and DNA synthesis in *Escherichia coli* K-12". *Mol. Gen. Genet.* 141, 189-205.

GAREN A. y N.D. ZINDER, 1955. "Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host-bacteria". *Virology* 1, 347- 576.

GOICOECHEA M.A., 1981. "Mutagénesis por nitrosoguanidina en *Rhizobium meliloti*". Memoria de licenciatura. Facultad de Ciencias. Univ. Granada.

GOODGAL S.H., C.S. RUPERT y R.M. HERRIOT, 1957. In McElroy W.C. y B. Glass ed. *The Chemical Basis of Heredity*. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore. 341-343

GORDON L.K. y W.A. HASELTINE, 1980. "Comparision of the cleavage of pyrimidine dimers by the bacteriophage T4 and *Micrococcus luteus* UV-specific endonucleases". *J. Biol. Chem.* 255, 12047-12050.

GORDON L.K. y W.A. HASELTINE, 1981. "Early steps of excision repair of cyclobutane pyrimidine dimers by the *Micrococcus luteus* UV-specific endonucleases". *J. Biol. Chem.* 255, 12047-12050.

- GRAFSTROM R.H., L. PARK y L. GROSSMAN, 1982. "Enzymatic repair of pyrimidine dimer-containing DNA: A 5'-dimer-DNA-glycosylase: 3'-apyrimidinic-endonuclease mechanisms from *Micrococcus luteus*". J. Biol. Chem. 257, 13465-13474.
- GROSSMAN L., A. BRAUN, R. FELDBERG e I. MAHLER, 1975. "Enzymatic repair of DNA". Ann. Rev. Biochem. 44, 19-43.
- GUERRERO R. y J. BARBE, 1982. "Expression of *recA*-gene dependent SOS functions in *Salmonella typhimurium*". Antonie van Leeuwenhoek 48, 159-167.
- HAAS D. y B.W. HOLLOWAY, 1976. "R.factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*". Mol. Gen. Genet. 144, 234-251.
- HANAWALT P.C., P.K. COOPER, A.K. GANESAN y C.A. SMITH, 1979. "DNA repair in bacteria and mammalian cells". Ann. Rev. Biochem 48, 783-836.
- HARM W., 1968. "Dark repair of photorepairable UV lesions in *Escherichia coli*". Mutat. Res 6, 25-35.
- HARM W., 1970. "Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes. V.- Determination of the reaction rate constants in *E.coli* cells". Mutat. Res. 10, 227-290.
- HARM W., 1980. "Biological effects of ultraviolet radiation". IUPAB Biophysics Series. Cambridge University Press.
- HARM W., M. HARM y C.S. RUPERT, 1968. "Analysis of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by single light flashes. II.- In vitro studies with *Escherichia coli* cells and bacteriophage". Mutat. Res. 6, 372-385.
- HASELTINE W.A., 1983. "Ultraviolet light repair and mutagenesis revisited". Cell. 33, 13-17.
- HASELTINE W.A., L.K. GORDON, C.P. LINDAN, R.H. GRAFSTROM, N.L. SHAPER y L. GROSSMAN, 1980. "Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA-glycosylase of *M.luteus*". Nature 285, 240-244.
- HAYS J.B., S.T. MARTIN y K. BHATIA, 1985. "Repair of non replicating UV-irradiated DNA: cooperative dark repair by *Escherichia coli* *uvr* and *phr* functions". J. Bacteriol. 161, 602-608.
- HEUMANN W., A. RÖSCH, R. SPRINGER, E. WAGNER y K-P. WINKLER, 1984. "In Rhizobiaceae five different species are produced by rearrangements of one genome induced by DNA-damaging agents". Mol. Gen. Genet. 197, 425-436.

HIGASHI S.H., 1967. "Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor". J. Gen. Appl. Microbiol. 13, 391-403.

HOLLOWAY B.W., 1978. "Isolation and characterization of an R' plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*". J. Bacteriol. 133, 1078-1082.

HORII T., T. OGAWA, T. NAKATANI, T. HASE, H. MATSUBARA y H. OGAWA, 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. y L. THERIOT, 1962. "A method for selecting radiation-sensitive mutants of *Escherichia coli*". Genetics 47, 1219-1224.

HOWARD-FLANDERS P., R.B. BOYCE y L. THERIOT, 1966. "Three loci in *Escherichia coli* K12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA". Genetics 53, 1119-1136.

HOYKAAS P.J.J., A.A. VAN BRUSSEL, H. DEN DULK-RAS, G.M.S. VAN SLOGTEREN y R.A. SCHILPEROORT, 1981. "Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*". Nature 291, 351-353.

HUISMAN O., R. D'ARI y S. GOTTESMAN, 1984. "Cell division control in *E. coli*: Specific induction of the SOS function of SfiA protein is sufficient to block septation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4490-4494.

HUSKEY R.J., 1969. "Multiplicity reactivation as a test for recombination function". Science 164, 319-320.

JAGGER J., 1967. "Introduction to research in ultraviolet photobiology". Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.

JIMENEZ SANCHEZ A., 1974. "Mutagénesis y replicación en células de *Escherichia coli* tratadas con bajas concentraciones de nitrosoguanidina" Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

JULLIOT J.S. y P. BOISTARD, 1979. "Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in *Escherichia coli* and *Rhizobium meliloti*". Mol. Gen. Genet. 173, 289-298.

KATO T. y Y. SHINOURA, 1977. "Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light". Mol. Gen. Genet. 156, 121-131.

KELNER A., 1949. "Photoreactivation of UV-irradiated *Escherichia coli* with special reference to the dose-reduction principle and to UV-induced mutation". J. Bacteriol. 58, 511-522.

- KELNER A., 1964. "Correlation between genetic transformability and nonphotoreactivability in *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol. 58, 511-522.
- KENYON C.J., 1983. "The bacterial response to DNA damage". Trends Biochem. Sci 8, 84-87.
- KENYON C.J. y G.C. WALKER, 1980. "DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2891-2823.
- KHIDHIR M.A., S. CASAREGOLA e I.B. HOLLAND, 1985. "Mechanism of transient inhibition of DNA synthesis in ultraviolet irradiated *E.coli*: Inhibition is independent of *recA* whilst recovery requires RecA protein itself and additional inducible SOS function". Mol. Gen. Genet. 199, 133-140.
- KISS G.B., K. DOBO, J. DUSHA, A. BREZNOVITS, L. OROSZ, E. VINCZE y A. KONDOROSI, 1980. "Isolation and characterization of an R-prime plasmid from *Rhizobium meliloti*". J. Bacteriol. 141, 121-128.
- KLECZKOWSKI J. y A. KLECZKOWSKI, 1953. "The behaviour of *Rhizobium* bacteriophages during and after exposure to ultraviolet Radiation". J. Gen. Microbiol. 8, 135-144.
- KONDOROSI A. y A.W.B. JOHNSTON, 1981. "The genetics of *Rhizobium*". International Rev. Cytol. Supplement 13, 191-224.
- KONDOROSI A., G.B. KISS, T. FORRAI, C. E. VINCZE y Z. BANFALVI, 1977. "Circular linkage map of the *Rhizobium meliloti* chromosome". Nature 268, 525-527.
- KRASILNIKOV N.A., 1941. "Variability of nodule bacteria". Doklady Acad. Nauk SSSR 31, 90-92.
- KRUEGER J.H. y G.C. WALKER, 1983. "Isolation and characterization of Tn5 insertion mutations in the *lexA* gene of *Escherichia coli*". J. Bacteriol 153, 1368-1378.
- KUEMMERLE N.B. y W.E. MASKER, 1980. "Effect of the *uvrD* mutation on excision repair". J. Bacteriol. 142, 535-546.
- KUEMMERLE N.B. y W.E. MASKER, 1983. "An *in vitro* complementation assay for the *Escherichia coli uvrD* gene product". Nucleic. Acid. Res. 11, 2193-2204.
- KUEMMERLE N.B., R.D. LEY y W.E. MASKER, 1982. "The effect of mutations in the *uvrD* cistron of *Escherichia coli* of repair resynthesis". Mutat. Res. 94, 285-297.

KUMURA K. y M. SEKIGUCHI, 1984. "Identification of the *uvrD* gene product as DNA helicase II and its induction by DNA-damaging agents". J. Biol. Chem. 259, 1560-1565.

LA BELLE M. y S. LINN, 1982. "In vivo excision of pyrimidine dimers is mediated by a DNA N-glycosilase in *Micrococcus luteus* but not in human fibroblasts". Photochem. Biophys. Acta. 698, 287-294.

LACKEY D., S.W. KRAUS y S. LINN, 1982. "Isolation of an altered form of DNA polymerase I from *Escherichia coli* cells induced for *recA-lexA* functions". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 330-334.

LACKEY D., S.W. KRAUS y S. LINN, 1985. "Characterization of DNA polymerase I*, a form of DNA polimerase found in *Escherichia coli* expressing SOS functions*". J. Biol. Chem. 260, 3178-3184.

LEY R.D. y R.B. SETLOW, 1972. "Repair replication in *Escherichia coli* as measured by the photolysis of bromodeoxyuridine". Biophys. J. 12, 420-431.

LINDAHL T., 1979. "DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites and base excision-repair". Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 22, 135-192.

LINDAHL T., 1982. "DNA repair enzymes" Ann. Rev. Biochem. 51, 61-87.

LIPPKE J.A., L.K. GORDON, D.E. BRASH y W.A. HASELTINE, 1981. "Distribution of UV-light-induced damage in a defined sequence of human DNA: Detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3388-3392.

LITTLE J.W., 1983. "The SOS regulatory system: control of its state by the level of *recA* protease". J. Mol. Biol. 167, 791-808.

LITTLE J.W., 1984. "Autodigestion of *lexA* and phage λ repressors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1375-1379.

LITTLE J.W. y D.W. MOUNT, 1982. "The SOS regulatory system of *E. coli*". Cell. 29, 11-22.

LITTLE J.W., S.H. EDMISTON, L.Z. PACELLI y D.W. MOUNT, 1980. "Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3225-3229.

LITTLE J.W., D.W. MOUNT y C.R. YANISCH-PERRON, 1981. "Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4199-4203.

- LIVNEH Z. e I.R. LEHMAN, 1982. "Recombinational bypass of pyrimidine dimers promoted by the recA-protein of *Escherichia coli*". Proc. Natl. Acad. Sci USA 79, 3171-3175.
- LOEB L.A. y T.A. KUNKEL, 1982. "Fidelity of DNA synthesis". Ann. Rev. Biochem. 52, 429-457.
- LORENSEN E., W.E. MASKER y J.W. CHASE, 1984. "Isolation of a *uvrA* mutation on a multicopy plasmid: preliminary characterization of the mutant protein". J. Bacteriol. 157, 857-862.
- LOVE P.E. y R.E. YASBIN, 1984. "Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol. 160, 910-920.
- LU A.L., S. CLARK y P. MODRICH, 1983. "Methyl-directed repair of DNA base-repair mismatches in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4639-4643.
- LLOYD R.G., F.E. BENSON y C.E. SHURVINTON, 1984. "Effect of *ruv* mutations on recombination and DNA repair in *Escherichia coli* K-12". Mol. Gen Genet. 194, 308-309.
- Mc MILLAN S., H.G. EDENBERG, E.H. RADANY, R.C. FRIEDBERG y E.C. FRIEDBERG, 1981. "*denV* gene of bacteriophage T4 codes for both pyrimidine dimer-DNA glycosylase and apyrimidinic endonuclease activities". J. Virol. 40, 211-223.
- MARKHAM B.E., J.E. HARPER y D.W. MOUNT, 1985. "Physiology of the SOS response: Kinetics of *lexA* and *recA* transcribed activity following induction". Mol. Gen. Genet. 198, 207-212.
- MARTIN M.O. y S.R. LONG, 1984. "Generalized transduction in *Rhizobium meliloti*". J. Bacteriol. 159, 125-129.
- MASKER W.E., 1977. "Deoxyribonucleic acid repair "in vitro" by extracts of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 129, 1415-1423.
- MATSON S.W. y R.A. BAMBARA, 1981. "Short deoxyribonucleic acid repair patch length in *Escherichia coli* is determined by the processive mechanism of deoxyribonucleic acid polymerase I". J. Bacteriol. 146, 275-284.
- MEADE M.M. y E.R. SIGNER, 1977. "Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2076-2078.
- MEGIAS M., M.A. CAVIEDES, J.A. PALOMARES y J. PEREZ-SILVA, 1982. "Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the *Rhizobium trifolii* chromosome". J. Bacteriol. 149, 59-64.

- MILLER J.H., 1982. "Carcinogens induce targeted mutations in *Escherichia coli*". *Cell* 31, 5-7.
- MILLER J.H., 1983. "Mutational specificity in bacteria". *Ann. Rev. Genet.* 12, 215-238.
- MILLER J.H., 1985. "Mutagenic specificity of ultraviolet light". *J. Mol. Biol.* 182, 45-68.
- MOUNT D.W, C. KOSEL y A. WALKER, 1976. "Inducible error-free repair in *tslrecA* mutants of *Escherichia coli*". *Mol. Gen. Genet.* 146, 37-42.
- MOREAU P.L., 1985. "Role of *Escherichia coli* RecA protein in SOS induction and post-replication repair". *Biochimie* 67, 353-356.
- MOREAU P.L. y J.W. ROBERTS, 1984. "RecA protein-promoted λ repressor cleavage: complementation between RecA441 and RecA430 proteins in vitro". *Mol. Gen. Genet.* 198, 25-34.
- MOSEVITSKY M.I., 1976. "Visualization of sister strand exchanges induced by ultraviolet irradiation". *J. Mol. Biol.* 100, 219-225.
- MOSS S.H. y D.J.G. DAVIES, 1974. "Interrelationships of repair mechanisms in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 120, 15-23.
- NAKABEPPU Y. y M. SEKIGUCHI, 1981. "Physical association of pyrimidine dimer DNA glycosylase and apurinic-apyrimidinic DNA endonuclease essential for repair of ultraviolet-damaged DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2742-2746.
- NEWCOMB W., 1976. "A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules". *Can. J. Bot.* 54, 2163-2186.
- OEDA K., T. HORIUCHI y M. SEKIGUCHI, 1982. "The *uvrD* gene of *Escherichia coli* encodes a DNA-dependent ATPase". *Nature* 298, 98-100.
- OLASZ F., L. DORGAI, A. PAY y L. OROSZ, 1983. "Recombination deficient mutants of *Rhizobium meliloti* 41". *Mol. Gen. Genet.* 191, 393-396.
- OSSANA N., K.C. PETERSON y D.W. MOUNT, 1986. "Genetics of DNA repair in bacteria". *Trends in Genetics* 2, 55-58.
- OTSUJI N., H. IYEHARA y Y. HIDESHIMA, 1974. "Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *ruv* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation". *J. Bacteriol.* 117, 337-344.

- PALOMARES A.J., 1975. " Estudio sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación *Rhizobium-leguminosa*". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- PERRY K.L. y G.C. WALKER, 1982. "Identification of plasmid (pKM101) coded proteins involved in mutagenesis and UV resistance". *Nature* 300, 278-281.
- PERRY K.L., S.J. ELLEDGE, B.B. MITCHELL, L. MARSH y G.C. WALKER, 1985. "*umuDC* and *mucAB* operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA proteins share homology". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4331-4335.
- PETITJOHN D.E. y P.C. HANAWALT, 1964. "Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria". *J. Mol. Biol.* 9, 395-410.
- PHIZICKY E.M. y J.W. ROBERTS, 1980. "Kinetics of *recA* protein-directed inactivation of repressors of phage λ and phage P22". *J. Mol. Biol.* 139, 319-328.
- PHIZICKY E.M. y J.W. ROBERTS, 1981. "Induction of SOS functions: Regulation of proteolytic activity of *Escherichia coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside triphosphate". *Cell* 25, 259-267.
- PICKSLEY S.M., P.V. ATTFIELD y R.G. LLOYD, 1984. "Repair of DNA double strands breaks in *Escherichia coli* K-12 requires a functional *recN* products". *Mol. Gen. Genet.* 195, 267-274.
- POSTGATE J.R., 1978. "Nitrogen Fixation" The Camelot Press Ltd. Southampton.
- POSTGATE J.R. y S. HILL, 1979. "Nitrogen fixation in microbial ecology: A conceptual approach" Linch J.M. y N.J. Poole ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- QUILLARDET P., P.L. MOREAU, H. GINSBURG, D.W. MOUNT y R. DEVORET, 1982. "Cell survival, UV-reactivation and induction of prophage lambda in *Escherichia coli* K-12 overproducing RecA protein". *Mol. Gen. Genet.* 188, 37-43.
- RADANY E.H. y E.C. FRIEDBERG, 1980. "A pyrimidine dimer-DNA glycosylase activity associated with the V gene product of bacteriophage T4". *J. Bacteriol.* 144, 97-104.
- RADDING C.M., 1982. "Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination". *Ann. Rev. Genet.* 16, 405-437.
- RADMAN M., 1975. "SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair wich is accompanied by mutagenesis". In Hanawalt P. y R.B.

Setlow ed. Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Part A. Plenum Publishing Corp. New York. 355-367.

RAHN R., 1979. "Non dimer damage in deoxyribonucleic acid caused by ultraviolet radiation". Photobiochem. Photobiol. Rev 4, 267-330.

ROBERTS R.B. y E. ALDOUS, 1949. "Recovery from ultraviolet irradiation in *E. coli*". J. Bacteriol. 57, 363-375.

ROBERTS J.W. y R. DEVORET, 1983. "Lysogenic induction". In Hendrix R. W., J.W. Roberts, F.W. Stahl y R.A. Weisberg eds. Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor New York. p. 123-144.

ROBERTS J.W., E.M. PHIZICKY, D.G. BURBEE, C.W. ROBERTS y P.L. MOREAU, 1982. "A brief consideration of the SOS inducing signal". Biochimie 64, 805-807.

ROSENBERG C.H., P. BOISTARD, J. DENARIE y F. CASSE-DELBART, 1981. "Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*". Mol. Gen. Genet. 184, 326-333.

ROSS P. y P. HOWARD-FLANDERS, 1977. "Initiation of *recA*⁺-dependent recombination in *Escherichia coli* (λ)". J. Mol. Biol. 117, 137-158.

ROTHMAN R.H. y A.J. CLARK, 1977. "The dependence of postreplication repair on *uvrB* in a *recF* mutant of *Escherichia coli* K-12". Mol. Gen. Genet. 155, 279-286.

ROTHMAN R.H., T. KATO y A.J. CLARK, 1975. "The beginning of an investigation of the role of *recF* in the pathways of metabolism of ultraviolet-irradiated DNA in *Escherichia coli*". In Hanawalt P.C. y R.B. Setlow ed. Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Plenum Publishing Corp. New York. pp. 283-291.

ROTHMAN R.H., L.J. MARGOSSIAN y A.J. CLARK, 1979. "UV-reactivation of phage lambda in *recF*, *recL*, *uvrA* and *uvrB* mutants of *Escherichia coli* K-12". Mol. Gen. Genet. 169, 279-289.

RUPERT C.S., 1960. "Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from Bakers' Yeast" J. Gen. Physiol. 43, 573-595.

RUPERT C.S., 1962a. "Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I.- Kinetics of reaction". J. Gen. Physiol. 45, 703-724.

RUPERT C.S., 1962b. "Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II.- Formation of an enzyme-substrate complex". J. Gen. Physiol. 45, 725-741.

- RUPERT C.S., 1979. "Enzymatic photoreactivation: Overview" in Hanawalt P.C. y R.B. Setlow ed. *Molecular Mechanism for Repair of DNA*. Plenum Press. New York.
- RUPP W.D. y P. HOWARD-FLANDERS, 1968. "Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation". *J. Mol. Biol.* 31, 291-304.
- RUPP W.D., C.E. WILDE, D.L. RENO y P. HOWARD-FLANDERS, 1971. "Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 61, 25-44.
- RUVKUN G.B. y F.M. AUSUBEL, 1981. "A general method for site directed mutagenesis in prokariotes: construction of mutations in symbiotic nitrogen fixation genes of *Rhizobium meliloti*". *Nature* 289, 85-88.
- SANCAR A. y W.D. RUPP, 1983. "A novel repair enzyme UvrABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region". *Cell.* 33, 249-260.
- SANCAR A. y G.B. SANCAR, 1984. "*Escherichia coli* DNA photolyase is a flavoprotein". *J. Mol. Biol.* 172, 223-227.
- SANCAR A., B.M. KACINSKY, D.L. MOTT y W.D. RUPP, 1981a. "Identification of the *uvrC* gene product". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5450-5454.
- SANCAR A., R.W. WHARTON, S. SELTZER, B.M. KACINSKY, N.D. CLARKE, y W.D. RUPP, 1981b. "Identification of the *uvrA* gene product". *J. Mol. Biol.* 148, 45-62.
- SANCAR G.B., A. SANCAR, J.W. LITTLE y W.D. RUPP, 1982. "The *uvrB* gene of *Escherichia coli* has both LexA-repressed and LexA-independent promoters". *Cell.* 28, 523-530.
- SANCAR G.B., F.W. SMITH y A. SANCAR, 1983. "Identification and amplification of the *E.coli phr* gene product". *Nucl. Acid. Res.* 11, 6667-6678.
- SANCAR A., K.A. FRANKLIN y G.B. SANCAR, 1984a. "*Escherichia coli* DNA photolyase stimulates UvrABC excision «in vitro»". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 7397-7401.
- SANCAR G.B., F.W. SMITH, M.C. LORENCE, C.S. RUPERT y A. SANCAR, 1984b. "Sequences of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein". *J. Biol. Chem.* 259, 6033-6038.
- SANCAR A., F.W. SMITH y G.B. SANCAR, 1984c. "Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase" *J. Biol. Chem.* 259, 6028-6032.

SAUER R.T., R.R. YOCUM, R.F. DOOLITTLE, M. LEWIS y C.O. PABO, 1982. "Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure". *Nature* 298, 447-451.

SCHAAPER R.M. y L.A. LOEB, 1981. "Depurination causes mutation in SOS-induced cels". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1773-1777.

SCHAAPER R.M., B.W. GLICKMAN y L.A. LOEB, 1982. "Mutagenesis resulting from depurination is an SOS process". *Mutat. Res.* 106, 1-9.

SCHOEMAKER J.M., R.C. GAYDA y A. MARKOVITZ, 1984. "Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to *lon*-associated filamentation and death". *J. Bacteriol.* 158, 551-561.

SEAWELL P.C., C.A. SMITH y A.K. GANESAN, 1980. "*den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylase specific for pyrimidine dimers in DNA". *J. Virol.* 35, 790-797.

SEEBERG E., 1978. "Reconstitution of an *Escherichia coli* repair endonuclease activity from the separated *uvrA*⁺ and *uvrB*⁺/*uvrC*⁺ gene products". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2569-2573.

SEEBERG E. y W.D. RUPP, 1975. "Effects of mutations in *lig* and *pol A* on UV induced strand cutting in a *uvrC* mutant of *E. coli*". In Hanawalt P.C. and R.B. Setlow ed. *Molecular Mechanism for Repair of DNA*. Plenum Publishing Corp. New York. 439-444.

SEEBERG E. y A.L. STEINUM, 1982. "Purification of the UvrA protein of *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 988-992.

SEEBERG E., W.D. RUPP y P. STRIKE, 1980 " Impaired incision of ultra-violet-irradiated deoxyribonucleic acid in *uvrC* mutants of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 144, 97-104.

SETLOW R.B. y W.L. CARRIER, 1964. "The disappearance of thymine dimers from DNA: an error correcting mechanism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 226-231.

SHARMA S. y R. MOSES, 1979. "*uvrC* gene function in excision repair in toluene-treated *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 137, 397-408.

SHARMA R.C., T.R. BARFKNECHT y SMITH K.C., 1982. "Post-replication repair in *uvrA* and *uvrB* strains of *Escherichia coli* K-12 is inhibited by rich growth medium". *Photochem. Photobiol.* 36, 307-311.

SHINAGAWA H., T. KATO, T. ISE, K. MAKINO y A. NAKATA, 1983. "Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*". *Gene.* 23, 167-174.



- SIK T., J. HORVATH y S. CHATERJEE, 1980. "Generalized transduction in *Rhizobium meliloti*". Mol. Gen. Genet. 178, 511-516.
- SILVA B.S. y A.C. LEITAO, 1984. "UV-induction of SOS responses in *Staphylococcus epidermidis*: characteristics of the process". Photochem. Photobiol. 39, 781-785.
- SNAPKA R.M. y B.M. SUTHERLAND, 1980. "*Escherichia coli* photoreactivating enzyme; purification and properties". Biochemistry 19, 4201-4208.
- STEINBORN G., 1978. "*uvr* mutants of *Escherichia coli* K-12 deficient in UV mutagenesis. I. Isolation of *uvr* mutants and their phenotypical characterization in DNA repair and mutagenesis". Mol. Gen. Genet. 165, 87-93.
- SUTHERLAND B.M., 1981. "Photoreactivating enzymes". In Boyer P.D. ed. The Enzymes. Academic. Press. New York. XIV. 481-515
- SUTHERLAND B.M., M.J. CHAMBERLIN y SUTHERLAND J.C., 1973. "Deoxyribonucleic acid photoreactivating enzyme from *Escherichia coli*". J. Biol. Chem. 248, 4200-4205.
- SVAB Z., A. KONDOROSI y L. OROSZ, 1978. "Specialized transduction of a cysteine marker by *Rhizobium meliloti* phage 16-3" J. Gen. Microbiol. 106, 321-327.
- TANG M.S. y L. ROSS, 1985. "Single-strand breakage of DNA in UV-irradiated *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* mutants of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 161, 933-938.
- THOMPSON J.K. y M.G.R. HART, 1981. "Novel patterns of ultraviolet mutagenesis and Weigle reactivation in *Staphylococcus aureus* and phage Ø11". J. Gen. Microbiol. 124, 147-157.
- TICHY M.V. y W. LOTZ, 1981. "Identification and characterization of large plasmids in newly isolated strain of *Rhizobium leguminosarum*". FEMS Microbiol. Lett. 10, 203-207.
- TORO N., 1985. "Estudio genético de las características simbióticas de *Rhizobium meliloti*". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Univ. Granada
- TORO N. y J. OLIVARES, 1985. "Plásmidos de *Rhizobium* y características simbióticas". Anales de Edaf. y Agrobiol. 3-4, 549-562.
- TORO N. y J. OLIVARES, 1986. "Analysis of *R. meliloti* *Sym* mutants obtained by heat-treatment". Appl. Environ. Microbiol. 51, 1148-1150.

- TYRREL R.M., S.H. MOSS y D.J.G. DAVIES, 1972. "The radiation in photo-reactivating enzyme activity as a function of the stage of growth of three K-12 strains of *Escherichia coli*". *Mutat. Res.* **16**, 345-352.
- UHLIN B.E. y A.J. CLARK, 1981. "Overproduction of the *Escherichia coli* RecA protein without stimulation of its proteolytic activity". *J. Bacteriol.* **148**, 386-390.
- VINCZE E., L.S. KONCZ y A. KONDOROSI, 1981. "Construction in vitro of R-prime plasmids and their use for transfer of chromosomal genes and plasmids of *Rhizobium meliloti*". *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **32**, 195-204.
- VOLKERT M.R. y M.A. HARTKE, 1984. "Suppression of *Escherichia coli* *recF* mutations by *recA*-linked *srfA* mutations". *J. Bacteriol.* **157**, 498-506.
- VOLKERT M.R., L.J. MARGOSSIAN y A.J. CLARK, 1984. "Two-component suppression of *recF143* by *recA441* in *Escherichia coli* K-12". *J. Bacteriol.* **160**, 702-705.
- VON WRIGHT A. y B.A. BRIDGES, 1981. "Effect of *gyrB*-mediated changes in chromosome structure on killing of *Escherichia coli* by ultraviolet light: experiments with strains differing in deoxyribonucleic acid repair capacity". *J. Bacteriol.* **146**, 18-23.
- WALKER G.C., 1977. "Plasmid (pKM101)-mediated enhancement of repair and mutagenesis: dependence on chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12" *Mol. Gen. Genet.* **152**, 93-103.
- WALKER G.C., 1984. "Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*". *Microbiol. Rev.* **48**, 60-93.
- WALKER G.C., 1985. "Inducible DNA repair systems" *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 425-457.
- WALTON D.A. y B.E.B. MOSELEY, 1981a. "Induced mutagenesis in *Rhizobium trifolii*". *J. Gen. Microbiol.* **124**, 191-195.
- WALTON D.A. y B.E.B. MOSELEY, 1981b. "Isolation and properties of an ultraviolet-sensitive mutant of *Rhizobium trifolii*". *J. Gen. Microbiol.* **124**, 197-201.
- WANG T.V. y K.C. SMITH, 1981. "Effect of *recB21*, *uvrD3*, *lexA101* and *recF143* mutations on ultraviolet radiation sensitivity and genetic recombination in *uvrB* strains of *Escherichia coli*". *Mol. Gen. Genet.* **183**, 37-44.

- WANG T.V. y K.C. SMITH, 1983. "Mechanisms for *recF*-dependent and *recB*-dependent pathways of postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli uvrB*" J. Bacteriol. 156, 1093-1098.
- WANG T.V. y K.C. SMITH, 1984a. " *recF*-Dependent and *recF-recB* independent DNA gap-filling repair processes transfer dimer-containing parental strands to daughter strands in *Escherichia coli* K-12 *uvrB*" J. Bacteriol. 158, 727-729.
- WANG T.V. y K.C. SMITH, 1984b. "Rich growth medium enhances ultraviolet radiation sensitivity and inhibits cell division in *ssb* mutants of *E. coli* K-12". Photochem. Photobiol. 39, 793-797.
- WANG T.V. y K.C. SMITH, 1985. "Role of the *umuC* gene in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* K-12 *uvrB*". Mutat. Res. 145, 107-112.
- WARNER H.R., L.N. CHRISTENSEN y M.L. PERSSON, 1981. "Evidence that the UV endonuclease activity induced by bacteriophage T4 contains both pyrimidine dimer-DNA glycosylase and apyrimidinic/apurinic endonuclease activities in the enzyme molecule". J. Virol. 40, 204-210.
- WEIGLE J.J., 1953. "Induction of mutation in a bacterial virus". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39, 628-636.
- WEST S.C., E. CASSUTO y P. HOWARD-FLANDERS, 1981a. "Mechanism of *E. coli* RecA protein directed strand exchanges in post-replication repair of DNA". Nature. 294, 659-662.
- WEST S.C., E. CASSUTO y P. HOWARD-FLANDERS, 1981b. "RecA protein promotes homologous pairing and strand exchange reactions between duplex DNA molecules". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 2100-2104.
- WEST S.C., E. CASSUTO y P. HOWARD-FLANDERS, 1982. "Postreplication repair in *E. coli*: Strand exchange reactions of gapped DNA by RecA protein". Mol. Gen. Genet. 187, 209-217.
- WITKIN E.M., 1966. "Radiation-induced mutation and their repair". Science 152, 1345-1353.
- WITKIN E.M., 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*". Bacteriol Rev. 40, 869-907.
- YAMAMOTO K. y H. SHINAGAWA, 1985. "Weigle reactivation of phage lambda in a *recA* mutant of *Escherichia coli*: Dependence on the excess amounts of photoreactivating enzyme in the dark". Mutat. Res. 145, 137-144.
- YAMAMOTO K., Y. FUJIWARA y H. SHINAGAWA, 1983a. "Evidence that the *phr*⁺ gene enhances the ultraviolet resistance of *Escherichia coli recA* strains in the dark". Mol. Gen. Genet. 192, 282-284.

YAMAMOTO K., M. SATAKE, H. SHINAGAWA e Y. FUJIWARA, 1983b. "Amelioration of the ultraviolet sensitivity of an *Escherichia coli* *recA* mutant in the dark by photoreactivating enzyme". *Mol. Gen. Genet.* **190**, 511-515.

YAMAMOTO K., M. SATAKE y H. SHINAGAWA, 1984. "A multicopy *phr* plasmid increases the ultraviolet resistance of a *recA*-strain of *Escherichia coli*". *Mutat. Res.* **131**, 11-18.

YASBIN R.E., G.A. WILSON y F.E. YOUNG, 1975. "Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells". *J. Bacteriol.* **121**, 196-304.

YEUNG A.T., W.D. MATTES, E.Y. OH y L. GROSSMAN, 1983. "Enzymatic properties of purified *Escherichia coli* UvrABC proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6157-6161.

YOAKUM G.H. y L. GROSSMAN, 1981. "Identification of *E. coli* UvrC protein". *Nature* **292**, 171-173.

ZURKOWSKI W., 1982. "Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*". *J. Bacteriol.* **150**, 999-1007.