



MX0700144

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
NUCLEARES**

**ALGUNOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A
RADIACION ULTRAVIOLETA**

Alcántara Díaz David

INFORME TECNICO CIENTIFICO CB040/02

Proyecto CB-107

Responsable: M. en C. Matilde Breña Valle

Departamento de Biología

Gerencia de Ciencias Básicas



ININ

DICIEMBRE DE 2002

Resumen

La exposición cíclica de células bacterianas a la luz ultravioleta (UV) tiene como consecuencia un incremento en la resistencia a los efectos letales de este tipo de radiación, incremento que ocurre como resultado de un proceso de selección de mutaciones genéticas favorables inducidas por la misma luz UV. Con objeto de estudiar la reproducibilidad de los cambios genéticos y los mecanismos asociados a la resistencia a UV en la bacteria *Escherichia coli*, se irradiaron cíclicamente con luz UV cinco cultivos distintos derivados de un solo clon, obteniéndose cinco cepas con diferentes grados de resistencia. El mapeo genético Hfr reveló que tanto los eventos de mutación como de selección que tuvieron lugar durante la adaptación a la irradiación UV, ocurrieron de manera aleatoria, es decir, cada una de las cepas resistentes es el resultado de la selección inespecífica de mutaciones surgidas al azar en diferentes genes relacionados con la reparación y duplicación del ADN.

INTRODUCCION

La exposición de los organismos a condiciones ambientales adversas durante generaciones sucesivas, ocasiona la selección de individuos con genotipos y fenotipos que les confieren ventajas adaptativas en esas condiciones particulares. Este proceso, conocido como evolución adaptativa, es el resultado de la selección de individuos con mutaciones genéticas favorables que surgen espontáneamente dentro de dichas poblaciones.

Puesto que esas mutaciones se producen al azar, lo más probable es que la evolución adaptativa de poblaciones de un mismo organismo separadas por causas naturales, de lugar a la selección de diversos genotipos que confieren a esas poblaciones ventajas adaptativas más o menos equivalentes. Sin embargo, cuando la presión selectiva es demasiado intensa, el proceso de adaptación de dichas poblaciones puede ser convergente, es decir, por la selección del mismo genotipo en las distintas poblaciones.

Con objeto de obtener evidencias experimentales acerca de cuál de estas dos formas puede tener lugar en la naturaleza, los procesos de mutación y selección pueden ser acelerados experimentalmente mediante la exposición cíclica de organismos de crecimiento rápido, como la bacteria *Escherichia coli*, a un agente como la radiación UV que induce una gran cantidad de daños en el ADN bacteriano, los cuales pueden dar lugar a mutaciones o causar la muerte de las células. La exposición cíclica de células bacterianas a la luz ultravioleta, da por resultado un incremento en la resistencia a los efectos letales de dicho agente a través de un proceso de selección de mutaciones genéticas favorables inducidas por la misma radiación UV (Wright y Hill, 1968; Mouton y col., 1970; Rames, y col., 1997; Ewing, 1995; Ewing, 1997).

La evolución adaptativa en estas condiciones, es decir, el incremento en la resistencia de poblaciones isógenas aisladas de *E. coli*, originada por cambios en los procesos de reparación, duplicación o protección del ADN, puede seguir también cualquiera de los dos caminos mencionados. Por un lado, puede ocurrir una divergencia genética al seleccionarse distintos mecanismos de resistencia; y por otro, el proceso de adaptación puede dar lugar a convergencia genética al seleccionarse mutaciones dentro de un solo mecanismo y aún dentro de un solo gen (fig. 1). Esto último ocurriría si: **a)** una vía enzimática específica fuera indispensable para procesar el tipo de lesión más letal o más abundante en el ADN, o **b)** si los mutantes con menor viabilidad fueran eliminados no obstante su alta eficiencia en la conservación del ADN.

En este trabajo se presentan resultados que demuestran que la adaptación a la exposición cíclica a radiación ultravioleta da lugar a divergencia genética. Tras irradiar cíclicamente con luz UV 5 poblaciones de *E. coli* artificialmente separadas, se obtuvieron 5 cepas con distintos grados de resistencia a UV que poseen mutaciones en diferentes genes que intervienen en procesos de reparación y duplicación del ADN.

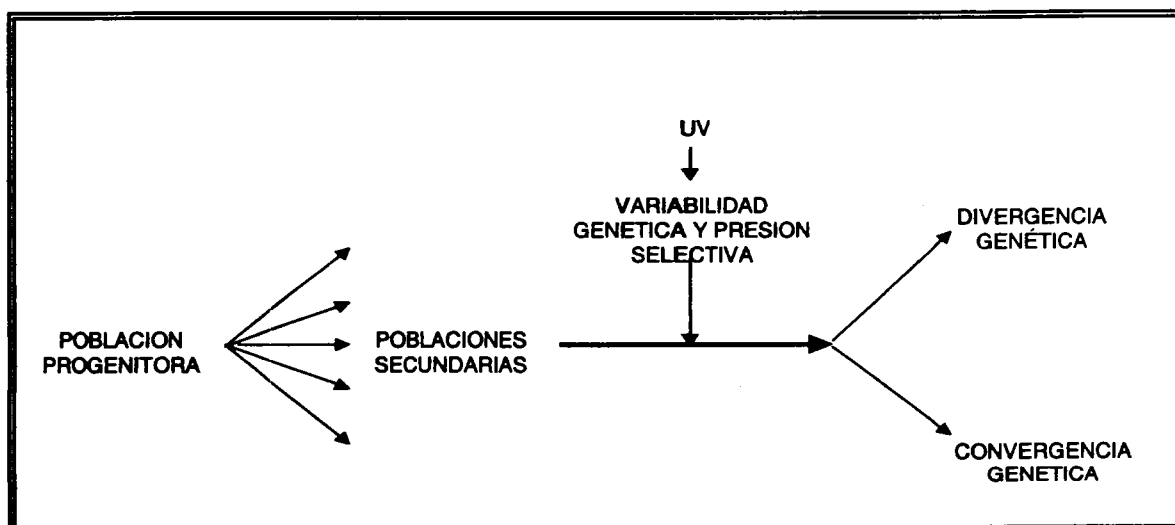


Figura 1.- Evolución adaptativa hipotética de poblaciones aisladas de una especie biológica.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Ciclos de irradiación. 5 poblaciones isógenas de *Escherichia coli* PQ30 fueron expuestas a 80 ciclos de irradiación-crecimiento con dosis crecientes de luz ultravioleta (UV). La dosis de luz UV fue duplicada cada 10 ciclos de irradiación empezando con 10 J/m^2 , que producen una letalidad de aproximadamente 20 % en la cepa progenitora, y finalizando con la dosis de 640 J/m^2 en la que prácticamente no hay sobrevivientes (Fig. 2).

Inducción del Sistema SOS. La respuesta SOS de la cepa progenitora PQ30 y de las 5 cepas derivadas tras 80 ciclos de irradiación, se determinó mediante el Cromoensayo SOS. *E. coli* PQ30 es normal en su capacidad de reparación del ADN y posee una fusión cromosómica *sulA::Mud* (ap *lac*) utilizada para determinar genotoxicidad mediante el cromosoma SOS (Quillardet y Hofnung, 1985). En este trabajo se utilizó dicha cepa con objeto de medir la respuesta SOS en las cepas resistentes a radiación UV derivadas de ella misma.

Mapeo genético. La localización de las mutaciones en las cepas resistentes a luz UV se realizó mediante mapeo genético por conjugación con cepas Hfr (Miller, 1992) y determinación de la frecuencia de transmisión de marcadores genéticos conocidos y del gen o genes que revierten el fenotipo resistente a UV al nivel tipo silvestre.

Frecuencia de mutación. La frecuencia de mutación espontánea e inducida en la cepa progenitora y las 5 cepas resistentes a UV, se determinó por reversión de *leu⁻* a *leu⁺* en células no irradiadas e irradiadas con 25 J/m² de UV.

Transducción. La introducción de la mutación *lexA3* en la cepa IN802 se hizo mediante las técnicas usuales de transducción con el fago P1 descritas por Miller (1992).

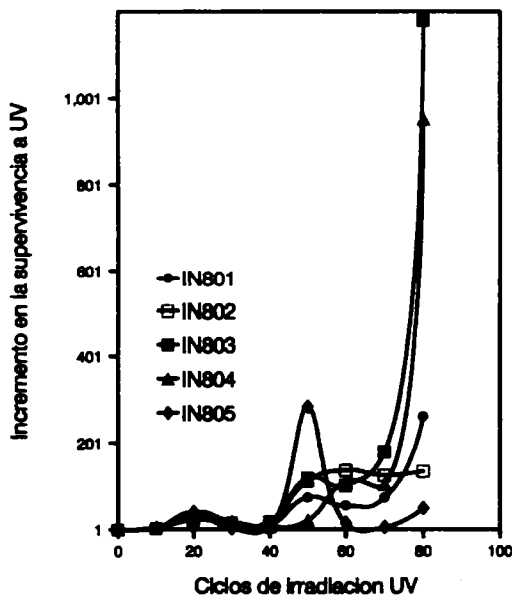


Figura 2. Incremento en la supervivencia a luz UV (100 Joules/m²) en 5 poblaciones de *E. coli* PQ30 después de acumular los ciclos de irradiación indicados.

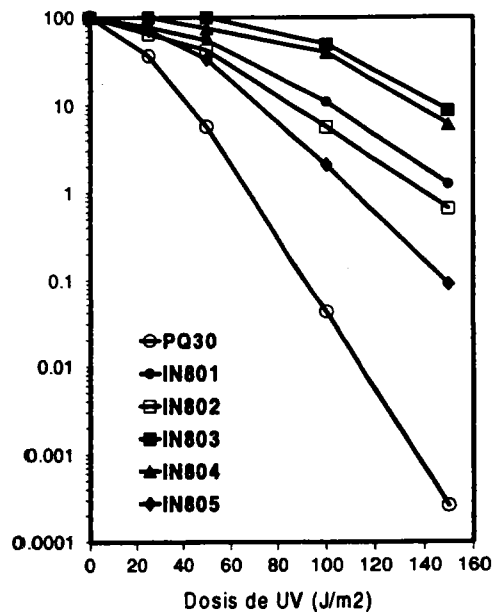


Figura 3. Supervivencia a luz UV de *E. coli* PQ30 y 5 cepas resistentes después de acumular 80 ciclos de irradiación con luz UV.

RESULTADOS

Se obtuvieron 5 cepas resistentes a luz UV denominadas IN801a IN805. En el curso de los ciclos de irradiación-crecimiento la resistencia de esas 5 cepas aumentó de una manera gradual pero discontinua y al final el nivel alcanzado por cada una de ellas fue diferente (figs. 2 y 3).

La Respuesta SOS de las 5 cepas se determinó mediante el cromosensayo SOS (Quillardet and Hofnung, 1985). La figura 3 muestra el factor de inducción SOS en la cepa progenitora PQ30 y las 5 cepas resistentes irradiadas con UV. Como se puede ver, no sólo ninguna de ellas presenta un sistema SOS constitutivo, como podría esperarse, sino que en todas ellas la respuesta SOS es menor. La cepa IN803, que es la más resistente, presenta la menor respuesta SOS (fig. 4).

Las mutaciones causantes de los fenotipos de resistencia a UV fueron localizadas mediante el mapeo Hfr por gradiente de transmisión, y los genes afectados se identificaron ubicando dichas mutaciones en el mapa genético completo de *E. coli* (Bachman, 1990). A partir de las frecuencias de transmisión de Tn10, *metB*, *cisG* y el fenotipo tipo silvestre (UV^{WT}) de distintas cepas Hfr a cada una de las cepas resistentes, se estableció la ubicación aproximada de las mutaciones que les confieren la resistencia a UV. En la Tabla I aparecen las posiciones de esas mutaciones así como los genes probablemente afectados. Es notorio que todas ellas se encuentran en una pequeña región de 18 minutos del cromosoma bacteriano, entre los minutos 87 y 5 pasando por el minuto cero. Esas 5 mutaciones afectan diferentes genes relacionados con reparación y duplicación del ADN.

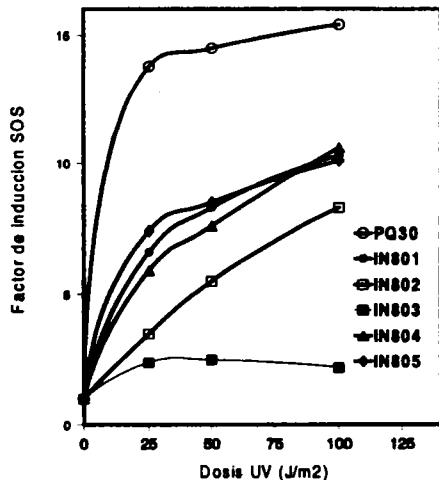


Figura 4. Cromosensayo SOS en *E. coli* PQ30 y cepas resistentes a luz UV obtenidas después de 80 ciclos de irradiación.

Tabla 1. Posición en el cromosoma bacteriano de las mutaciones que causan la resistencia a UV de las 5 cepas derivadas de *E. coli* PQ30.

CEPA	POSICION EN EL CROMOSOMA (MIN)	GEN
IN801	98.5	radA
IN802	93.5	uvrA ?
IN803	5	dnaQ
IN804	91	uvrA ?
IN805	87	polA

La frecuencia de reversión de *leu⁻* a *leu⁺* inducida por UV varió de una cepa a otra; sin embargo, la frecuencia más alta se encontró en la cepa IN803 que también es la más resistente a UV, debido a una mutación en el gen *dnaQ* (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de reversión de *leu⁻* a *leu⁺* in *E. coli* PQ30 y las 5 cepas resistentes a UV derivadas de ella mediante irradiación cíclica. La cepa IN803 *lexA3* se obtuvo por transducción con el fago P1.

CEPA	DOSIS DE UV J/m ²		FACTOR DE INDUCCION
	0	30	
PQ30	7X10 ⁻¹⁰	2.3X10 ⁻⁸	32.2
IN801	3X10 ⁻¹⁰	1.9X10 ⁻⁸	6.25
IN802	5.3X10 ⁻¹⁰	4.3X10 ⁻¹⁰	0.81
IN803	2.8X10 ⁻⁹	2.4X10 ⁻⁶	850
IN803 <i>lexA3</i>	9.5x10 ⁻¹⁰	1.33x10 ⁻⁷	159
IN804	1.2X10 ⁻⁹	5.9X10 ⁻⁸	49
IN805	8.4X10 ⁻¹⁰	1.7X10 ⁻⁸	20.4

Discusión

El incremento en la resistencia de *E. coli* a luz UV u otros tipos de radiación, que ocurre tras la exposición cíclica a ella, es una adaptación de las células provocada por la presencia de una gran cantidad de daños en el ADN bacteriano, los cuales deben ser procesados a fin de evitar la muerte de las células. De acuerdo con los resultados presentados aquí, dicha adaptación es divergente ya que ocurre a través de diversos mecanismos en distintas poblaciones de un organismo. La resistencia a UV aumenta de manera gradual pero discontinua, es decir, a través de períodos en los que alcanza un máximo, seguidos por períodos en los que el incremento se detiene y la resistencia alcanzada se mantiene estable o tiende a disminuir. Los datos obtenidos no permiten saber si las mutaciones que causan esos incrementos moderados en la resistencia, son las mismas que se seleccionaron al final de los ciclos de irradiación.

Como se puede ver en la Tabla I, las mutaciones seleccionadas en cada una de las cepas al final de los ciclos de irradiación, afectan genes que participan en distintos mecanismos genéticos reparación y duplicación del ADN; sin embargo, todas esas mutaciones se hallan dentro de una pequeña región de 18 minutos del cromosoma bacteriano. Se desconoce si la acumulación en esa región de las mutaciones seleccionadas es sólo consecuencia de que en ella se encuentran varios genes relacionados con la preservación y/o duplicación del ADN, o si el mecanismo por el cual se inducen las mutaciones es más efectivo en esa región.

Algunas de esas mutaciones afectan mecanismos de reparación bien conocidos, como la reparación por excisión dependiente de los genes *uvrA* y *polA* (cepas IN802, IN804 e IN805), y en otros casos afectan genes cuya función es menos conocida, por ejemplo *radA* en la cepa IN801, cuya deficiencia provoca sensibilidad a luz UV y radiación ionizante (Diver y col. 1982) y que recientemente ha sido relacionado con la recombinación y reparación por recombinación del ADN (Beam y col., 2002). Posiblemente la cepa IN801 debe su resistencia a UV a una reparación por recombinación más eficiente.

La cepa más resistente a UV (IN803) presenta una mutación en el gen *dnaQ* que codifica la subunidad ϵ de la polimerasa III del ADN en la que reside la actividad exonucleolítica 3'-5' de esta enzima. Esta actividad es indispensable para la corrección de errores en la incorporación de nucleótidos durante la duplicación normal del ADN efectuada por dicha enzima (Scheuermann y col., 1983) y a consecuencia de esa mutación la cepa IN803 presenta una alta frecuencia de mutaciones inducidas por radiación UV, probablemente debido a que tales errores no son corregidos durante la duplicación de ADN dañado. De manera que la alta resistencia a luz UV de esta cepa parece ser debida a una eficiente síntesis de ADN aún en presencia de lesiones. Sin embargo, a diferencia de una cepa normal, esta síntesis trans-lesión no depende totalmente de la inducción del sistema SOS ya que la tasa de inducción de mutaciones es bastante alta aún en presencia de la mutación *lexA3* (Tabla II).

En ninguna de las 5 cepas se seleccionaron mutaciones que dieran lugar a un sistema SOS constitutivo o con una mayor inducibilidad por daño en el ADN. Por el contrario, las 5 cepas mostraron una menor respuesta SOS que la cepa progenitora, probablemente debido a una mayor eficiencia en la reparación y/o tolerancia de los daños en el ADN a través de otros mecanismos, lo cual disminuye la producción de señales inductoras del sistema. Es notable que en sólo unas generaciones de bacterias sometidas a un proceso de selección de células más resistentes a radiación UV, este sistema tan importante para la supervivencia de la célula y que ha sido conservado durante mucho tiempo, sea substituido por otros mecanismos de reparación. Sería interesante constatar si lo mismo ocurre con la exposición cíclica a otros agentes que dañan al ADN, como radiación gamma y agentes químicos.

Por otro lado, el hecho de que dentro del mismo mecanismo de reparación por excisión de nucleótidos, se seleccionen mutaciones que en un caso afectan la excisión de la lesión propiamente dicha, como *uvrA* en la cepa IN804, y en otro la repolimerización del hueco resultante, como *polA* en IN805, indica que aunque ambos pasos enzimáticos son susceptibles de ser mejorados, la excisión de la lesión efectuada por los productos de los genes *uvrABC* parece tener mayor importancia que la repolimerización del hueco resultante en el ADN, ya que el efecto de una mutación en el gen *uvrA* sobre la resistencia a UV es mucho mayor que el de una mutación en el gen *polA*.

La comparación de las diferentes cepas resistentes a UV lleva a otras preguntas interesantes. Por ejemplo, es notorio que las cepas IN803 e IN804 poseen una resistencia a radiación UV muy semejante; sin embargo la frecuencia de mutación inducida por UV es 20 veces más alta en la primera que en la segunda. Esta diferencia en la capacidad de variabilidad genética de ambas cepas, ¿confiere una mayor ventaja adaptativa a IN803 bajo otras condiciones selectivas?

El estudio de la respuesta de *E. coli* al incremento en la incidencia de radiación ultravioleta es de gran interés desde varios puntos de vista. Además de permitir conocer las posibilidades que tienen los organismos para adaptarse a un alto índice de luz ultravioleta, causado ya sea por la reducción de la capa de ozono de la alta atmósfera como resultado del uso de clorofluorocarburos (Noakes, 1995; Madronic y col., 1998), o por la colonización artificial de ambientes con altos índices de radiación ultravioleta como la superficie de Marte; permite hacer inferencias no sólo de cuáles son las reacciones enzimáticas que limitan la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN sino que, en caso de convergencia genética, del tipo de lesiones genéticas que se producen con mayor abundancia o que causan más letalidad a dosis extremas de radiación UV.

En conclusión, la irradiación cíclica con luz UV incrementa la resistencia de *E. coli* a sus efectos letales. Este tipo de adaptación de *E. coli* a una alta exposición de luz UV ocurre aleatoriamente dando lugar a divergencia genética, ya que las mutaciones que originan los fenotipos de resistencia a luz UV en distintas poblaciones de *E. coli* afectan diferentes genes relacionados con reparación y duplicación del ADN. De esas mutaciones la que produce la mayor resistencia a UV afectó la actividad correctora de errores de la duplicación de ADN dañado y la que menos efecto tuvo sobre dicha resistencia fue la mutación en el gen *polA*, que participa en la repolimerización del hueco resultante de la excisión de los daños en el ADN.

REFERENCIAS

- Bachman BJ. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K12. Microbiol. Rev, 54:130-197.
- Diver WR, Sargentini NJ y Smith KC (1982). A mutation (*radA100*) in *Escherichia coli* that selectively sensitizes cells grown in rich medium to X or U.V.-radiation, or methyl methanesulphonate. Int. J. Radiat. Biol. 42:339-346.
- Ewing D (1995). The directed evolution of radiation resistance in *E. coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 216:549-553.
- Ewing D (1997). Production of radiation-resistant *E. coli* strains by daily X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol., 71, 253-258.

- Beam CE, Saveson CJ y Lovett ST (2002). Role for radA/sms in recombination intermediate processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **184**:6836-6844.
- Madronich S, McKenzie RL, Bjorn LO, Caldwell MM (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B.*, **46**:5-19.
- Miller JH (1992). A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook *Escherichia coli* for and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mouton RF, Tremeau O y Duty P (1970). Evolution microbiologique sous rayonnement: phenotype d'un mutant radiorésistant d'*Escherichia coli* K12 induit et sélectionné par expositions successives au rayonnement gamma du ⁶⁰Co. *Int. J. Radiat. Biol.*, **17**:237-243.
- Noakes TJ (1995). CFCs, their replacements, and the ozone layer. *J Aerosol Med Spring* **8** Suppl 1:S3-7.
- Quillardet P y Hofnung M (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures. *Mutat. Head.*, **147**:65-78.
- Rames J, Chaloupecky V, Sojkova N y Bencko V (1997). An attempt to demonstrate the increased resistance of selected bacterial strains during repeated exposure to UV radiation at 254 nm. *Cent. Eur. J. Public. Health*, **5**:30-31.
- Scheuermann R, Tam S, Burgers PM, Lu C y Echols H (1983). Identification of the epsilon-subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**:7085-9.
- Wright SJ y Hill EC (1968). The development of radiation-resistant cultures of *Escherichia coli* I by a process of 'growth-irradiation cycles'. *J. Gen. Microbiol.*, **51**:97-106.