

Titolo: Dopo 30 anni di studio, la risposta SOS batterica ci sorprende ancora - After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us

Codice: MUT002

Autore: Michel B.

Data: 2005

Rivista: PlosBiology 3(7):1174-1176

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030255>

URL: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030255>

Parole chiave: sistema SOS, danno DNA, LexA, RecA, ricombinazione omologa, mutazioni, polimerasi, modulazione del DNA

Tumore: n/a

Traduzione: L'articolo è stato tradotto tutto con alcune semplificazioni e tagli di minime parti.

**Punti di interesse:** Per sopravvivere in diverse condizioni ambientali, le cellule hanno un repertorio di geni che possono scegliere di esprimere o silenziare a seconda delle loro esigenze. Tra questa vasta collezione di reti geneticamente controllate, la risposta SOS dei batteri è un sistema di riparazione del DNA che consente loro di sopravvivere a improvvisi aumenti di danni al loro materiale genetico.

Il primo supporto sperimentale per l'esistenza di una rete di riparazione del DNA inducibile in *Escherichia coli* è stata fornita 30 anni fa da Miroslav Radman, che ha introdotto il termine "risposta SOS". Due proteine svolgono un ruolo chiave nella regolazione della risposta SOS: un repressore chiamato LexA e un induttore, il filamento RecA. Durante la normale crescita, il repressore LexA si lega a una sequenza specifica all'inizio dei geni SOS, chiamata promotore e ne impedisce l'espressione. Quando la cellula rileva la presenza di un maggiore livello di danno al DNA, il repressore LexA viene scisso, i geni SOS vengono de-repressi e le proteine da essi codificate vengono espresse. La proteina RecA è una proteina ubiquitaria presente in quasi tutti i batteri e conservata in tutti gli organismi, compreso l'uomo. Si lega specificamente al DNA a singolo filamento, formando un filamento nucleoproteico (formato cioè da proteine e nucleotidi che compongono il frammento di DNA). Questo complesso è indicato con il termine il filamento RecA ed ha due funzioni: il filamento RecA può invadere una sequenza omologa di DNA a doppio filamento e catalizzare lo scambio del filamento (la reazione chiave della ricombinazione omologa), oppure b) promuove la scissione di LexA (inducendo così la risposta SOS).

Il sistema è molto complesso e deve essere finemente regolato, per cui sono in realtà coinvolte molte altre proteine, che intervengono anche a seconda del tipo di danno del DNA (danno ad un filamento o danno al doppio filamento).

La risposta SOS è diventata un paradigma per lo studio della riparazione del DNA. Negli ultimi 30 anni, diversi laboratori hanno affrontato questioni relative alla funzione dei geni SOS e ai meccanismi che li regolano. Con tecniche di analisi più recenti è stato dimostrato che circa 40 geni

sono sotto controllo della risposta SOS. La maggior parte sono geni di riparazione del DNA, ma ci sono diversi geni che non hanno ancora una funzione nota.

I geni SOS, tuttavia, non sono tutti indotti allo stesso tempo e allo stesso livello. Dopo l'irradiazione UV, la quantità di repressore LexA diminuisce di quasi 10 volte in pochi minuti. I primi geni ad essere indotti sono enzimi che catalizzano la riparazione per escissione dei nucleotidi danneggiati dal DNA a doppia elica. In una fase successiva a difesa contro le lesioni del DNA, viene indotta l'espressione di recA e funzioni di ricombinazione omologhe che aumentano più lentamente. Infine se il danno non è stato completamente riparato dalle precedenti azioni, viene indotta la polimerasi POL V per riparare il DNA, una polimerasi però prona agli errori. Introducendo errori nella replicazione del DNA vengono generate mutazioni. Questa risposta consente ai batteri di riparare le lesioni del DNA ma a spese dell'introduzione di errori nel genoma.

Dopo che una cellula viene trattata con agenti che danneggiano il suo DNA, i geni promotori SOS sono indotti a un certo livello sufficiente per sopravvivere a una certa dose di agente dannoso per il DNA, indipendentemente dalla quantità iniziale di danno al DNA. Se il livello di danno al DNA è troppo alto perché le cellule possano farcela in un ciclo di induzione, seguirà un secondo ciclo di induzione o addirittura un terzo ciclo. È interessante notare che questi cicli di induzione sono stati trovati anche nella riparazione del DNA umano governata dalla proteina p53, creando un parallelo tra la complessa regolazione delle cellule eucariotiche e la risposta SOS ben caratterizzata e facilmente modificabile delle cellule batteriche.

Oltre ad essere un modello di rete regolatoria per la riparazione del DNA, la risposta SOS ha svolto un ruolo importante nel plasmare il mondo batterico. Questo principalmente perché aumenta gli scambi genetici e può indurre mutazioni. Pol II, Pol IV (dinB) e Pol V (umuCD) sono DNA polimerasi indotte nel sistema SOS di E. coli in grado di replicarsi attraverso le lesioni di DNA stesso. In topi con infezioni da E. coli, il trattamento con ciprofloxacina porta alla rapida comparsa di cellule di E. coli resistenti all'antibiotico. È interessante notare che quando viene utilizzato un ceppo patogeno di E. coli che codifica per un repressore LexA non scindibile dal filamento RecA, non appare alcun mutante resistente alla ciprofloxacina. Ciò indica che la formazione di cellule resistenti richiede l'induzione di SOS. L'inibizione delle topoisomerasi causata dall'antibiotico provoca la formazione di rotture nel DNA, che a loro volta inducono la risposta SOS.

## Glossario

### Promotore

In biologia un promotore è una regione di DNA costituita da specifiche sequenze dette consenso, alla quale si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene, o di più geni. I promotori, costituiti da DNA a doppia elica, si trovano generalmente a monte del gene di cui iniziano la trascrizione; l'RNA polimerasi riconosce il DNA a doppia elica e si lega ad esso, anche se soltanto un'elica verrà utilizzata come stampo per la trascrizione.

### Ricombinazione omologa

La ricombinazione omologa consiste nello scambio di filamenti di DNA tra una coppia di sequenze della doppia elica del DNA, cioè segmenti della doppia elica che hanno una sequenza molto simile o identica. Questo scambio permette ad un tratto di doppia elica di DNA di agire come stampo per ripristinare l'informazione persa o danneggiata in un altro tratto di doppia elica di DNA. È quindi la via principale per riparare le rotture a doppio filamento causate da radiazioni e da composti chimici reattivi, ma la maggior parte delle volte hanno origine da forcelle di replicazione che si bloccano o si rompono indipendentemente da cause esterne. La ricombinazione omologa corregge tutti questi incidenti, molto frequenti nei cicli di replicazione del DNA, e pertanto consiste in un sistema di riparazione essenziale per ogni cellula che prolifera.

### Polimerasi

Una polimerasi è un enzima il cui ruolo è associato alla polimerizzazione (sintesi) degli acidi nucleici, come DNA e RNA. La più importante funzione di una polimerasi è la catalisi della

produzione di nuove molecole di DNA e RNA a partire da una molecola stampo di DNA e RNA, durante i processi biologici noti come replicazione e trascrizione. In associazione con numerose altre molecole, le polimerasi utilizzano come substrato nucleotidi presenti in soluzione per assemblarli nel filamento in costruzione. I nucleotidi sono le unità ripetitive costitutive degli acidi nucleici (DNA e RNA). Sono costituiti da tre gruppi: una base azotata, purinica o pirimidinica; uno zucchero a cinque atomi di carbonio (zucchero pentoso), che insieme alla base azotata costituisce un nucleoside; un gruppo fosfato (residuo fosforico) che, insieme al nucleoside, completa il nucleotide. Le basi puriniche sono adenina e guanina, nel DNA come nell'RNA; le basi pirimidiniche sono citosina e timina nel DNA, citosina e uracile nell'RNA. Lo zucchero pentoso è il ribosio nell'RNA ed il desossiribosio nel DNA.

### Polimerasi V

La DNA polimerasi V (Pol V) è un enzima polimerasi coinvolto nei meccanismi di riparazione del DNA nei batteri, come l'*Escherichia coli*. È composto da due parti codificate da due geni, UmuD e da UmuC, che formano il complesso proteico. Fa parte della famiglia di polimerasi che sono in grado di eseguire la sintesi bypassando lesioni. Se una lesione non viene riparata o aggirata, la forcella di replicazione può bloccarsi e portare alla morte cellulare. Tuttavia, queste polimerasi hanno una bassa fedeltà di sequenza durante la replicazione e sono inclini ad aggiungere nucleotidi errati.

### Topoisomerasi

Le topoisomerasi sono una categoria di enzimi appartenenti alla classe delle isomerasi che regolano il metabolismo del DNA. In particolare, le topoisomerasi determinano un aumento o una diminuzione del grado di superavvolgimento del DNA. Tali enzimi svolgono un ruolo fondamentale nell'impacchettamento e nella replicazione del DNA. Più in dettaglio, essi sono in grado di introdurre una rottura del singolo o del doppio filamento di DNA in modo temporaneo. Le topoisomerasi I rompono transitoriamente una sola delle catene del DNA, la ruotano attorno a quella integra e infine riuniscono le estremità interrotte. Le topoisomerasi II invece, rompono entrambe le catene di DNA.

### Inibitori delle topoisomerasi

Gli inibitori della topoisomerasi sono composti chimici che bloccano l'azione della topoisomerasi (topoisomerasi II e I), che sono enzimi che controllano i cambiamenti nella struttura del DNA catalizzando la rottura e ricongiunzione di filamenti di DNA durante il normale ciclo cellulare. Negli ultimi anni, le topoisomerasi sono sempre più utilizzate per i trattamenti di chemioterapia dei tumori. Si ritiene che gli inibitori della topoisomerasi blocchino i passaggi del ciclo cellulare, generando interruzioni singole e doppie che danneggiano l'integrità del genoma. L'introduzione di queste interruzioni porta ad apoptosi e alla morte cellulare. Gli inibitori della topoisomerasi sono anche agenti antibatterici. I chinoloni (tra cui l'acido nalidixico e la ciprofloxacina) hanno questa funzione.

### Riassunto

**La risposta SOS batterica si attiva quando i batteri subiscono danni al DNA e aiuta gli organismi a correggere e sopravvivere agli eventi di danno al DNA. Questo primer fornisce una base per comprendere questi eventi.**

Per sopravvivere in diverse condizioni ambientali, le cellule hanno un repertorio di geni che possono scegliere di esprimere o silenziare a seconda delle loro esigenze. Tra questa vasta collezione di reti geneticamente controllate, la risposta SOS è un sistema inducibile di riparazione del DNA che consente ai batteri di sopravvivere a improvvisi aumenti del danno al DNA. L'importanza della risposta SOS è sottolineata dal fatto che questa rete di regolazione è ampiamente presente nei batteri, riflettendo la necessità per tutte le cellule viventi di mantenere l'integrità del

loro genoma.

### Riparazione rapida del DNA

Il primo supporto sperimentale per l'esistenza di una rete di riparazione del DNA inducibile in *Escherichia coli* è stata trovata 30 anni fa da Miroslav Radman, che ha introdotto il termine "risposta SOS" per descrivere questa rete [1]. Due proteine svolgono un ruolo chiave nella regolazione della risposta SOS: un repressore chiamato LexA e un induttore, il filamento RecA. Durante la normale crescita, il repressore LexA si lega a una sequenza specifica, la scatola SOS, presente nella regione del promotore dei geni SOS, e ne impedisce l'espressione. I geni SOS sono repressi a gradi diversi in condizioni di crescita normali. Ciò dipende dall'esatta sequenza della loro casella SOS (la regione di un promotore riconosciuta da LexA), dalla sua posizione nella regione del promotore e dalla forza del promotore.

Quando la cellula rileva la presenza di un maggiore livello di danno al DNA, il repressore LexA subisce una reazione di auto-scissione e i geni SOS vengono de-repressi (Figura 1). Un complesso nucleoproteico, il filamento RecA, induce la reazione di scissione LexA. RecA è una proteina ubiquitaria, presente in quasi tutti i batteri e conservata in tutti gli organismi, compreso l'uomo. Si lega specificamente al DNA a singolo filamento (single strand DNA - ssDNA), formando un filamento nucleoproteico che ha due funzioni [2]: a) il filamento RecA può invadere una sequenza omologa di DNA a doppio filamento e catalizzare lo scambio del filamento (la reazione chiave della ricombinazione omologa), oppure b) può promuovere la scissione di LexA (inducendo così la risposta SOS). Tuttavia, anche il legame di RecA con ssDNA è regolamentato. È prevenuto in vivo dalla presenza ubiquitaria della proteina legante ssDNA. Due sistemi consentono a RecA di superare la barriera proteica legante ssDNA: le proteine RecFOR aiutano il legame di RecA alle lacune a singolo filamento e le proteine RecBC caricano direttamente RecA sulle estremità recise del doppio filamento. Di conseguenza, gli agenti dannosi per il DNA che inducono la formazione di gap a singolo filamento di DNA (formano un buco nella doppia elica del DNA), come la luce UV, indurranno la risposta SOS solo se sono presenti le proteine RecFOR, mentre quelli che creano estremità a doppio filamento di DNA, come gli inibitori della topoisomerasi, richiederanno le proteine RecBC per l'induzione di SOS [3].

La risposta SOS è diventata un paradigma per il campo della riparazione del DNA. Negli ultimi 30 anni, diversi laboratori hanno affrontato questioni relative alla funzione dei geni SOS e ai meccanismi che li regolano. Con tecniche di analisi più recenti è stato dimostrato che circa 40 geni sono sotto controllo SOS. La maggior parte sono geni di riparazione del DNA, ma ci sono diversi geni che non hanno ancora una funzione nota [4,5].

### Geni SOS e loro ordine di induzione

Dopo l'irradiazione UV, la quantità di repressore LexA diminuisce di quasi 10 volte in pochi minuti [6]. I geni SOS, tuttavia, non sono tutti indotti allo stesso tempo e allo stesso livello. I primi geni ad essere indotti sono *uvrA*, *uvrB* e *uvrD*. Queste proteine, insieme all'endonucleasi *UvrC*, catalizzano la riparazione per escissione dei nucleotidi (NER), ovvero una reazione che asporta i nucleotidi danneggiati dal DNA a doppia elica. Come seconda difesa contro le lesioni del DNA, l'espressione di *recA* e altre funzioni di ricombinazione omologhe aumentano più lentamente, circa 10 volte. La ricombinazione omologa consente la riparazione delle lesioni che si verificano sulle regioni a singolo filamento alle forcelle di replicazione rendendole a doppio filamento. L'inibitore di divisione *SfiA* è anche indotto per dare al batterio il tempo di completare le riparazioni. Infine, circa 40 minuti dopo il danno al DNA (e se il danno non è stato completamente riparato dal NER e dalla ricombinazione omologa), viene indotta la polimerasi mutagena di riparazione del DNA Pol V (codificata dai geni *umuC* e *umuD*) [7]. Questa risposta disperata consente anche ai batteri di rendere le lesioni del DNA a doppio filamento, quindi riparabili, ma a spese dell'introduzione di errori nel genoma.

Chiaramente, è importante che i batteri tengano sotto stretto controllo tutti i livelli della risposta SOS; non vi è alcuna utilità per l'organismo di utilizzare polimerasi inclini all'errore più a lungo di

quanto sia assolutamente necessario. La produzione costante di LexA durante il processo SOS assicura che non appena si verifica la riparazione del DNA, la scomparsa del segnale inducente consentirà a LexA di riaccumulare e reprimere i geni SOS. Inoltre, due proteine indotte da SOS, DinI e RecX, influenzano la stabilità del filamento RecA e quindi possono partecipare al controllo della risposta SOS [8].

### Misurare la risposta SOS

L'induzione di SOS è stata misurata in colture di massa fino a quando non sono diventate disponibili tecniche di microscopia a fluorescenza che hanno consentito la misurazione diretta dell'espressione genica nelle singole cellule. Le cellule indotte cronicamente sono state utilizzate per la prima volta per misurare l'induzione di SOS in singoli batteri [10], dove è stato osservato che l'apparente omogeneità dell'espressione di SOS a livello di una popolazione mascherava il verificarsi di eventi stocastici negli individui. Infatti, il livello di espressione di SOS in cellule geneticamente identiche cresciute nelle stesse condizioni era variabile da cellula a cellula, con cellule altamente indotte esistenti accanto a quelli non indotti. Più recentemente, in questo numero di PLoS Biology, Friedman e collaboratori hanno misurato in singole cellule il livello e la cinetica di attivazione dei promotori SOS dopo il trattamento con luce UV [11]. Per segnalare l'attività del promotore, il gene della proteina fluorescente verde (GFP) è stato posto sotto il controllo dei promotori di tre diversi geni SOS: *recA*, *lexA* e *umuCD*. Come previsto, quando è stato analizzato il segnale in una popolazione cellulare, la quantità di GFP è aumentata come un picco ampio seguito da una diminuzione quando ha avuto luogo la riparazione e la risposta SOS è stata interrotta. Sorprendentemente, nelle singole cellule sono stati osservati uno, due o tre picchi successivi di espressione di GFP, a seconda della dose UV. A dosi UV inferiori a 10 joule, è stato osservato un picco di GFP. Questo è stato centrato da 20 a 25 minuti dopo l'irradiazione per il promotore *recA* e *lexA*. Dieci minuti dopo, come previsto, è stato indotto il promotore *umuCD*. A dosi UV di 20 joule o superiori, sono stati osservati da due a tre picchi di espressione di GFP, con la tempistica della comparsa del primo picco e la sua ampiezza che rimanevano costanti. Questa scoperta cambia la nostra visione del controllo della risposta SOS. Suggestisce che in ogni cellula, la risposta SOS non viene semplicemente attivata in una misura che dipende dal livello di danno al DNA e quindi disattivata. Piuttosto, suggerisce che i promotori SOS sono indotti a un certo livello sufficiente per sopravvivere a una certa dose di agente dannoso per il DNA, indipendentemente dalla quantità iniziale di danno al DNA. Se il livello di danno al DNA è troppo alto perché le cellule possano farcela in un ciclo di induzione, seguirà un secondo ciclo di induzione o addirittura un terzo ciclo. È interessante notare che oscillazioni digitali sono state trovate anche nella riparazione del DNA umano governata da p53 [13], creando un parallelo tra la complessa regolazione delle cellule eucariotiche e la risposta SOS ben caratterizzata e facilmente modificabile delle cellule batteriche.

### SOS e resistenza batterica agli antibiotici

Oltre ad essere un modello di rete regolatoria per la riparazione del DNA, la risposta SOS ha svolto un ruolo importante nel plasmare il mondo batterico. Questo principalmente perché aumenta le mutazioni e gli scambi genetici [14]. Pol II, Pol IV (*dinB*) e Pol V (*umuCD*) sono DNA polimerasi indotte da *E. coli* SOS in grado di replicarsi attraverso le lesioni (bypass polimerasi). Tra queste, solo Pol II è indotta precocemente e ha un'alta fedeltà sul DNA intatto. Nelle cellule trattate con UV, queste DNA polimerasi possono indurre mutazioni; la loro azione può essere accoppiata alla riparazione delle rotture del doppio filamento del DNA mediante ricombinazione omologa. La riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento comporta necessariamente una fase di re-inizio della replicazione, che può essere mutageno (Figura 2).

Nel numero di giugno di PLoS Biology, il laboratorio di Romesberg descrive un ruolo dell'induzione di SOS nella comparsa di mutanti di *E. coli* resistenti agli antibiotici [18]. Il principale antibiotico utilizzato è la ciprofloxacina, un inibitore della topoisomerasi che provoca rotture del doppio filamento del DNA. Il trattamento delle infezioni dei topi da parte della ciprofloxacina porta alla rapida comparsa di cellule di *E. coli* resistenti all'antibiotico. È interessante

notare che quando viene utilizzato un ceppo patogeno di *E. coli* che codifica per un repressore LexA non scindibile, non appare alcun mutante resistente alla ciprofloxacina. Ciò indica che la formazione di cellule resistenti richiede l'induzione di SOS. L'inibizione delle topoisomerasi provoca la formazione di rotture del doppio filamento del DNA, che a loro volta inducono la risposta SOS e vengono riparate dalla ricombinazione omologa. Tuttavia, quando la risposta SOS è innescata da un danno al DNA indotto da antibiotici, le DNA polimerasi indotte da SOS che agiscono sulle forcelle di replicazione formate dalla ricombinazione generano mutanti, alcuni dei quali sono resistenti alla ciprofloxacina. Questi risultati suggeriscono che il blocco dell'induzione di SOS potrebbe essere un mezzo generale per prevenire la rapida evoluzione dei batteri verso la resistenza agli antibiotici.

### Conclusioni

Il lavoro sulla risposta SOS illustra bene il duplice scopo degli studi sui batteri, poiché SOS è sia un modulatore della propagazione batterica durante la patogenicità, sia una fonte insostituibile di concetti per la comprensione delle reti di regolazione della riparazione del DNA. Restano da affrontare diverse questioni importanti. Ad esempio, più di una dozzina di geni indotti da SOS codificano per proteine di funzione sconosciuta [4]. L'identificazione del loro ruolo fisiologico può rivelare nuovi livelli o nuovi mezzi di regolazione della risposta SOS, collegamenti con altre reti cellulari di regolazione globale e conseguenze insospettite dell'induzione di SOS.