

### GENES QUE PARTICIPAN EN LA RECOMBINACIÓN NO HOMÓLOGA SON IMPORTANTES PARA REPARAR DAÑOS EN EL ADN CAUSADOS POR CROMO EN *Saccharomyces cerevisiae*

Gustavo Santoyo<sup>1</sup> y Jeffrey N. Strathern<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas-UMSNH, Edif. A1 en CU, Morelia, Michoacán, México. C.P.58030. Tel/Fax: 443-3265788. <sup>2</sup>National Cancer Institute-NIH, Frederick, Maryland 21702, USA, email: gustavo\_santoyo@yahoo.com

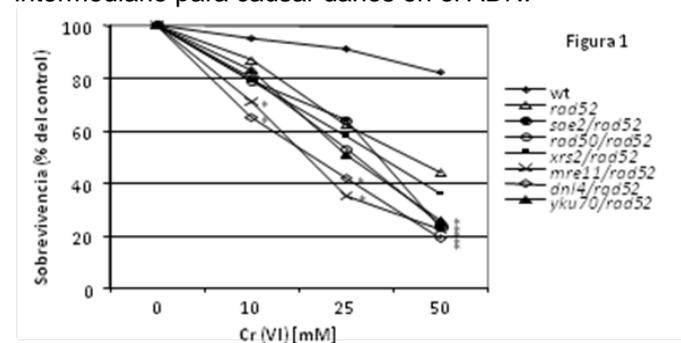
Palabras clave: *Levadura, recombinación, cromo.*

**Introducción.** La exposición a metales como el cromo ha sido asociada con el desarrollo de enfermedades como el cáncer (1). En la naturaleza el cromo principalmente existe en estados trivalente (III) y hexavalente (VI). Este último, se considera el estado más tóxico, ya que puede penetrar las membranas celulares vía transportadores no específicos. Dentro de la célula, el cromo VI es reducido a cromo III, produciendo radicales libres y especies reactivas de oxígeno (2). Estas a su vez generan diversos daños en el ADN, tales como: pérdida de bases, cortes en doble cadena, entre otros. Los cortes doble cadena pueden ser reparados por mecanismos de recombinación homóloga (RH) y no homóloga (RNH) (1). Dada la importancia de identificar elementos genéticos importantes en la reparación de daños causados por cromo VI, en este trabajo generamos mutantes deficientes en RH y RNH de *S. cerevisiae* y analizamos su sensibilidad en condiciones aerobias y anaerobias a la presencia del cromo VI.

**Metodología.** Se generaron mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 en genes que participan en RH (*rad52Δ*) y RNH (*yku70Δ*, *sae2Δ*, *rad50Δ*, *dnl4Δ*, *mre11Δ*, *xrs2Δ*), así como dobles mutantes (*yku70Δ/rad52Δ*, *sae2Δ/rad52Δ*, *rad50Δ/rad52Δ*, *dnl4Δ/rad52Δ*, *mre11Δ/rad52Δ*, *xrs2Δ/rad52Δ*). La delección de cada ORF se realizó por PCR y transformación utilizando el marcador *KanMX*. Dobles mutantes fueron generadas por transformación del plásmido pSM20 digerido con BamHI (3), obteniendo *Leu<sup>+</sup>* transformantes. Cada delección fue confirmada por PCR y restricción. La complementación de mutantes se realizó amplificando cada gen y se clonaron en el pYES2.1 TOPO, los cuales fueron transformados en sus respectivas mutantes. Los análisis de sobrevivencia en condiciones aerobias fueron realizados como se ha descrito anteriormente (1). Para el crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno se utilizó el sistema GasPak en una atmosfera de hidrogeno+CO<sub>2</sub>.

**Resultados y discusión.** En este trabajo generamos mutantes en procesos de reparación por RH y RNH, las cuales mostraron mayor sensibilidad a la exposición por cromo VI. Todas las mutantes sencillas mostraron ser más sensibles con respecto a la cepa silvestre a

concentraciones de 25 y 50mM ( $P < 0.05$ ). El caso de las dobles mutantes *dnl4Δ/rad52Δ* y *mre11Δ/rad52Δ* los porcentajes de sobrevivencia se vieron disminuidos desde concentraciones de 10mM ( $P < 0.05$ ), siendo el efecto más marcado con el resto a concentraciones mayores del metal (Fig. 1). Al complementar las mutantes con la función de sus respectivos genes, se observaron niveles de sobrevivencia similares a la cepa silvestre. Lo anterior sugiere que procesos como RH y RNH son importantes para resistir y reparar daños causados por cromo, además de ambos procesos actúan de manera sinérgica. Durante los experimentos de exposición anaerobia, se observó que la toxicidad del cromo se perdió casi por completo. Esto indica que probablemente la generación de especies reactivas de oxígeno son el intermediario para causar daños en el ADN.



**Conclusiones.** Los mecanismos de reparación de RH y RNH son importantes para reparar daños causados por cromo en el ADN.

Las especies reactivas de oxígeno podrían estar jugando un papel importante en los efectos tóxicos del cromo VI.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue apoyado por: The CCR of the National Cancer Institute at Frederick, DHHS.

#### Bibliografía.

- O'Brien TJ, et al. (2003). Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae*. *DNA Repair*. 1:617-627.
- Cervantes C, et al. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335-347.
- Bartsch S, et al. (2000). RAD51 is required for the repair of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates. *Mol. Cell Biol.* 20:1194-1205.