



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El Superenrollamiento del DNA en la
Fase Estacionaria de *Escherichia coli* K 12

T E S I S
Que para obtener el título de
B I O L O G A
p r e s e n t a
REYES DOMINGUEZ YAZMID



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Directora de Tesis: Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann
Codirector: Dr. Jesús Ramírez Santos



278740



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHIÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

El superenrollamiento del DNA en la fase estacionaria de *Escherichia coli* K 12.

Reyes Domínguez Yazmid

realizado por

9550358-5

Biología

con número de cuenta

, pasante de la carrera de

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann

Propietario

M en IBB. Benito Estrada Mena

Propietario

M en IBB. Gustavo Jesús Ortega Lule

Suplente
y Codirector

Dr. Jesús Ramírez Santos

Suplente

Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Biología

Consejo Departamental de

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann, en el departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann y la codirección del Dr. Jesús Ramírez Santos.

Agradecimientos

A la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann por haberme aceptado en su lab, asesorado este trabajo, por sus comentarios y enseñanzas.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por asesorar el trabajo experimental, por sus críticas y enseñanzas.

Al

M en IBB. Benito Estrada Mena
M en IBB. Gustavo Ortega Lule
Biol. Alfonso Vilchis Peluyera

Por la revisión de esta tesis, sus correcciones y comentarios.

A Miguel Páez y todos mis compañeros del laboratorio.

A Tzipe por la ayuda en la densitometría.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Fundación UNAM a través del PROBETEL.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	
Superenrollamiento del DNA y tipos de superenrollamiento	3
Topoisomerasas tipo I.....	7
Topoisomerasas tipo II.....	10
El superenrollamiento del DNA y la vida celular	13
Fase estacionaria en <i>Escherichia coli</i>	15
El regulón de σ^s	18
El gene <i>rpoS</i> y la regulación de σ^s	23
Otros reguladores globales en la fase estacionaria.....	25
Señales que inducen la fase estacionaria.....	27
Inhibidores de girasa durante la fase estacionaria	27
El superenrollamiento del DNA y la fase estacionaria de crecimiento	28
OBJETIVOS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS	36
I. Cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario	36
a) Determinación del sentido del superenrollamiento plectonómico del DNA en células en fase estacionaria	41

II.	El superenrollamiento del DNA en la recuperación del crecimiento de células en fase estacionaria	43
III.	Efecto de la novobiocina en el superenrollamiento del DNA al salir de la fase estacionaria	45
IV.	Efecto de la inhibición de la transcripción y de la traducción en el superenrollamiento del DNA durante la recuperación del crecimiento	47
	a) Inhibición de la transcripción	47
	b) Inhibición de la traducción	50
V.	Síntesis de DNA y división celular en la recuperación del crecimiento	53
	DISCUSIÓN.....	55
	CONCLUSIONES.....	64
	PERSPECTIVAS.....	65
	APÉNDICE.....	66
	BIBLIOGRAFÍA.....	69

Abreviaciones

Clq	cloroquina
Cm	cloramfenicol
cpm	cuentas por minuto
FE	fase exponencial
FS	fase estacionaria
LB	medio Luria-Bertani
LB-MOPS	medio Luria-Bertani + ácido morfolino- propano sulfónico
MD	medio de dilución
R	DNA relajado
RE	Recuperación del crecimiento celular
Rif	rifampicina
S	DNA superenrollado
SE	superenrollamiento del DNA
TCA	ácido tricloroacético

Resumen

El genoma de la bacteria *Escherichia coli* se encuentra superenrollado negativamente. El nivel de superenrollamiento del DNA (SE) se modifica en respuesta a diversos estímulos del medio, como son un aumento en la temperatura, en la osmolaridad o un ayuno nutricional. Este nivel está determinado por las topoisomerasas I y II (girasa).

En este trabajo se estudiaron en *E. coli* K12, los cambios en el nivel de SE en la fase estacionaria de crecimiento (FS) y en la recuperación del crecimiento al añadir nutrientes al medio.

Durante la FS, en un medio de pH constante, la cinética de SE de un plásmido reportero disminuye hacia un estado relajado; mientras que en un medio rico de pH creciente, los plásmidos se relajan en la FS temprana y después una parte de estos adquiere SE negativo.

En el reinicio del crecimiento en las células en FS, la recuperación del nivel de SE en medio con pH constante, es casi instantánea; mientras que en pH no controlado tarda más de 80 minutos.

En las células en FS a pH constante, la recuperación del SE no depende de la transcripción ni de la traducción. Si se añade un inhibidor de girasa en el momento que se reinicia el crecimiento esta recuperación no se presenta.

Estos resultados sugieren que en esta FS la girasa está presente y recupera su actividad al añadirse nutrientes al medio.

Las células en FS que reinician el crecimiento en medio rico con pH constante o pH creciente, inician la síntesis de DNA y la división celular en tiempos similares: 30 minutos y 60 minutos, respectivamente.

Los resultados de este trabajo muestran que el pH es una variable importante que influye en la cinética de los cambios de SE y en la recuperación del mismo al salir de la FS; sin embargo, es un parámetro que no influye en la capacidad celular de reiniciar la replicación del DNA y la división celular.

Introducción

El interés del presente trabajo es profundizar en el estudio del papel de la topoisomerasa II (girasa) en los cambios en el grado de SE del DNA en la FS de crecimiento y en el reinicio del crecimiento celular al añadir nuevamente nutrientes al medio. Por ello, a continuación se presenta una revisión sobre SE de DNA y topoisomerasas del DNA, así como de las principales características de la FS y de los cambios en el nivel de SE durante esta fase.

Superenrollamiento del DNA y tipos de superenrollamiento.

El cromosoma de *Escherichia coli* está formado por 4.6×10^6 pares de bases y mide aproximadamente 1 mm. Esta molécula es mil veces más larga que la longitud total de la célula, de ahí que existan ciertas estrategias para lograr que una molécula tan grande ocupe un volumen muy pequeño y además que pueda llevar a cabo eficientemente sus funciones metabólicas.

Existen dos formas para compactar al DNA, la primera es mediante la ayuda de proteínas básicas tipo histona alrededor de las cuales la doble hélice se enrolla, lo que provoca zonas de torsión. Este tipo de superenrollamiento asistido se denomina toroidal (Gómez y Camacho, 1995 b).

En las células eucariontes, prácticamente todo el SE es toroidal. En estas células, aproximadamente 146 pares de bases (pb) se enrollan alrededor de un octámero de proteínas básicas llamadas histonas y forman lo que se conoce como nucleosoma. Los nucleosomas se conectan por medio de la histona H1 formando un cromatosoma, éstos se organizan en grupos de seis y forman estructuras espirales de 30 nm de diámetro, conocidas como solenoides en cuyo centro quedan las histonas H1. Los solenoides se compactan para formar a las fibras de cromatina y éstas, a su vez, a los cromosomas (Lodish et al. 1997)

En los procariontes no existen estructuras con una organización definida como los nucleosomas. Sin embargo, se propone que el DNA forma una estructura celular compacta que se denomina nucleoide y que contiene además proteínas y RNA .

El DNA en el nucleoide está organizado en aproximadamente 32 asas de SE negativo. El número de asas puede variar dependiendo de las condiciones del medio y en cada asa pueden haber uno o más topodominios; es decir, zonas de superenrollamiento restringido (Gómez y Camacho, 1995 a).

Las principales proteínas presentes en el nucleoide son: HU (heat unstable nucleoid protein), H-NS (histone-like nucleoid structuring protein), IHF (integration host factor), Fis (factor for invertion stimulation) y en menor cantidad: CbpA (curved DNA binding protein A), CbpB (curved DNA binding protein B) y Hfq (host factor for phage Q _{β}) (Ishihama, 1999).

HU es un heterodímero formado por una subunidad HU-1 y una HU-2, se encuentra en alto número de copias, tal que si se une cada 200 pb puede cubrir todo el genoma bacteriano. *In vitro* forma estructuras parecidas al collar de perlas de nucleosomas. Durante el inicio de la replicación facilita la unión y doblaje del DNA alrededor de un núcleo de monómeros de DnaA (Gómez y Camacho, 1995 a).

H-NS es una proteína neutra de 15.5 kDa que se une preferentemente a zonas de DNA curvo ricas en AT. Esta proteína influye en el grado de superhelicidad negativa, reprime la expresión de muchos genes de funciones no relacionadas y cuando está presente en grandes concentraciones puede compactar al DNA (Barth et al. 1995).

IHF se une a secuencias específicas durante la integración y excisión del genoma de λ al cromosoma y participa también en la regulación de la expresión de muchos genes (Lewin, 1997).

Fis es un homodímero de 98 aminoácidos e interviene en la inversión sitio-específica de DNA y en la activación de varios genes. La concentración celular de esta proteína disminuye en la FS y se incrementa al recuperarse el crecimiento para entrar a la fase exponencial (FE), por lo que se sugiere que contribuye a modular la dinámica cromosomal durante estas fases (Schneider et al. 1997).

En el nucleoide además de estas proteínas, durante la replicación y la transcripción están presentes las DNA polimerasas, RNA polimerasas y topoisomerasas.

La segunda forma de compactar al DNA es mediante la acción de un tipo de proteínas llamadas topoisomerasas del DNA, las cuales son capaces, mediante reacciones de corte, rotación y ligación de cadenas, de modificar la topología del DNA.

Imaginemos una molécula de DNA circular y cerrada que reposa sobre un plano; si esta molécula es cortada, rotada y vuelta a unir, el resultado será que ahora sale del plano ya que se introdujo cierta tensión en la hélice y la molécula lo compensó girando en el espacio.

Si ahora se corta la molécula enrollada y se vuelve a unir después de ser liberada la tensión, la molécula regresará a su conformación original. A este tipo de SE de la molécula sobre sí misma se le llama plectonómico.

La topología de una molécula circular cerrada puede describirse mediante la siguiente relación:

$$W_r = L_k - T_w$$

Donde W_r (writhe number) expresa lo que conocemos como SE y representa el número de veces que el DNA gira sobre sí mismo formando una superhélice. En una molécula completamente relajada este número es igual a cero.

T_w (twist number) es el número de vueltas de la hélice en su conformación nativa cuando ésta se restringe a ocupar un solo plano. T_w es dependiente del número de bases por vuelta de la hélice; por ejemplo, en el caso del DNA-B es igual al número de bases de la molécula entre diez.

L_k (linking number) es el número de veces que una hebra de DNA pasa sobre otra en una molécula de DNA superenrollado. Este número es igual a T_w en una molécula relajada (Reece y Maxwell, 1991).

En una molécula superenrollada el valor de L_k puede incrementarse o disminuir dependiendo si la vuelta introducida fue positiva o negativa.

Lo anterior se explica en la figura 1, tomando como ejemplo una molécula que tiene 340 pares de bases:

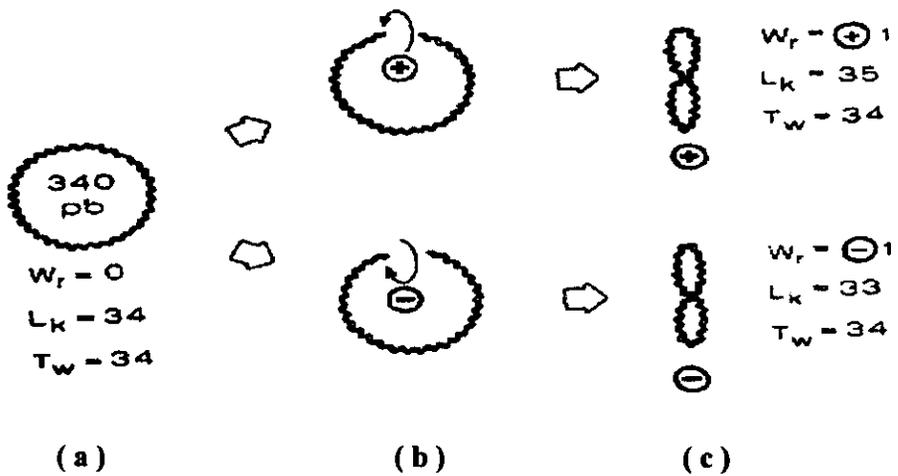


Fig 1. Cambios en la topología de una molécula de DNA circular cerrada. a) la molécula de DNA está relajada y reposa sobre un plano, b) las dos cadenas de la molécula son cortadas y un extremo se gira ya sea hacia la dirección de la hélice, enrollamiento positivo; o en la dirección contraria, enrollamiento negativo, c) las moléculas se vuelven a cerrar, saliendo del plano y adquiriendo una vuelta positiva o negativa (Gómez y Camacho, 1995 b).

El nivel de SE plectonémico del DNA depende principalmente de la actividad de enzimas llamadas topoisomerasas. *E. coli* tiene dos tipos de topoisomerasas: I y II. En las tipo I se encuentran las topoisomerasas TopI y TopIII y en las tipo II la topoisomerasa II o girasa y la TopIV.

Topoisomerasas tipo I

Las topoisomerasas tipo I son endonucleasas monoméricas que requieren iones magnesio, no requieren ATP y sólo cortan una cadena de DNA de tal forma que la otra pasa libremente a través del corte, relajando progresivamente la molécula. Estas enzimas relajan sólo DNA enrollado negativamente, e incrementan el valor de L_k en una unidad por ciclo de reacción (Gómez y Camacho, 1995 a). La topoisomerasa I ó TopI codificada por el gene *topA* y la topoisomerasa TopIII codificada por *topB* pertenecen a esta clasificación y en particular a la subfamilia IA.

Las topoisomerasas IA se caracterizan por formar un enlace covalente con una tirosina y el extremo 5' del DNA durante la catálisis. Las topoisomerasas III de eucariontes y la girasa reversa de bacterias y archeas pertenecen a esta familia.

A la subfamilia IB pertenecen la topoisomerasa I de eucariontes y la topoisomerasa IV de archeas, las cuales se unen al extremo 3' del DNA (Berger, 1998).

La TopI es una proteína de 102 kDa, su sección N-terminal (residuo 2 al 590) tiene una forma de cilindro plano de dimensiones 70x45x95 Å. La región central está cubierta por un arco y cubre una cavidad central de aproximadamente 27 Å. Esta parte está formada por 4 dominios. Los dos primeros están formados por 4 hojas β -plegadas en paralelo conectadas por varias α -hélices, los dominios III y IV están formados por α -hélices y dominios hélice-vuelta-hélice.

El sitio activo Tyr-319 reside en el dominio III casi completamente tapado por los otros dominios. El dominio III contiene muchos aminoácidos ampliamente conservados, los cuales forman una red unida por puentes de hidrógeno. El cálculo electrostático de esta estructura mostró que la cavidad central está cargada positivamente (Berger, 1998).

El fragmento C-terminal, fue resuelto por NMR, consta de un solo dominio que mide 25x30x35 Å y se pliega en dos hojas β -plegadas antiparalelas cuyas superficies interiores soportan 2 α -hélices que forman zonas hidrofóbicas.

La molécula entera tiene la forma de un plato con tenaza, donde la base del plato la forman los dominios I y IV, y la tenaza o arco móvil los dominios II y III (Fig 2, a). El arco está anclado al dominio IV y se conecta reversiblemente a través del III al I.

Cuando el arco esta abierto, es posible que una hebra sencilla de DNA entre hasta la cavidad de la molécula donde será atacada por el sitio activo, el arco se abre pero para entonces tiene unido el fragmento de DNA que acaba de cortar (Fig 2, b-d).

Una segunda hebra de DNA puede entonces entrar a la cavidad y pasar a través del corte (Fig 2, e). El arco se vuelve a cerrar uniendo el fragmento cortado (Fig 2, f). Posteriormente se disocia enzima y DNA (Fig 2, g-h). Es así como la TopI puede relajar moléculas de DNA superenrollado.

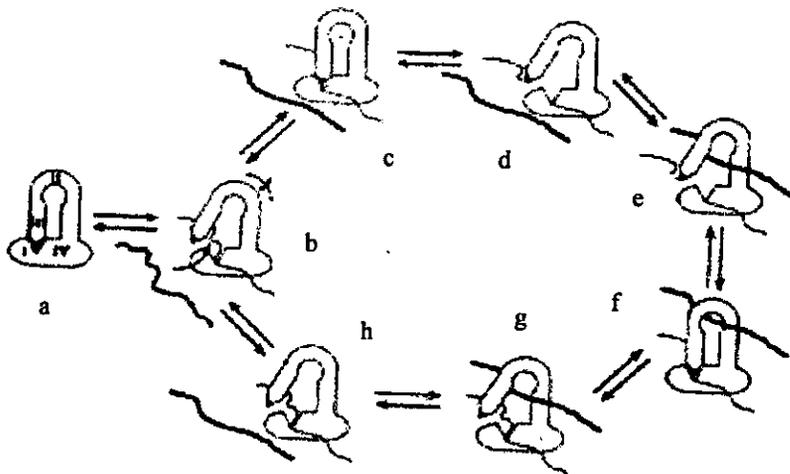


Fig 2. Mecanismo de acción de TopI, a) dominios de la TopI, b-d) la conformación de la enzima permite que una hebra de DNA pase hasta el sitio activo en donde es cortada, e) la segunda hebra pasa a través del corte, f-h) la hebra cortada se vuelve a unir y la enzima se disocia de la doble hélice. (Modificado de Berger, 1998).

La TopIII es una proteína de 75kDa de actividad parecida a TopI, se encuentra en 10 copias por célula. Además de magnesio también requiere potasio para funcionar, es más eficiente a altas temperaturas (Gómez y Camacho, 1995 b) y presenta un porcentaje de identidad de 24% con respecto al sitio activo-tirosina de la TopI.

En los organismos eucariontes existe una topoisomerasa I que tiene la particularidad de relajar tanto vueltas positivas como negativas. Tal vez la razón por la cual las topoisomerasas de bacterias sólo relajan vueltas negativas es porque las regiones de hebra sencilla, hacia las cuales la TopI tiene mayor afinidad, se generan solamente cuando el DNA se enrolla negativamente.

Las topoisomerasas I de los eucariontes se unen transitoriamente al extremo 3' del DNA y relajan DNA enrollado positiva y negativamente, de tal forma que no se encuentran mecanísticamente relacionadas con las de las bacterias. Tampoco se encuentran relacionadas filogenéticamente, tal como muestra la total ausencia de similitud de sus secuencias de aminoácidos (Forterre y Elie, 1993).

Una representante atípica de las topoisomerasas tipo I es la girasa reversa, que se encuentra presente en las archeas. Esta es una proteína de 143 kDa cuya región C-terminal es parecida a las topoisomerasas tipo I de las bacterias, mientras que la región N-terminal es diferente a cualquier otra, ya sea de bacterias o eucariontes y es más parecida a una helicasa. Esta región presenta un dominio de unión a ATP y aminoácidos muy parecidos y en los mismos sitios que los de helicasas de RNA y DNA.

La particularidad de esta enzima es la capacidad de introducir supervueltas positivas en el DNA (Confalioni et al. 1993). Se sugieren dos posibles modelos para explicar la introducción de las vueltas positivas, uno dinámico y otro estático.

En el modelo dinámico, la acción combinada de una helicasa ATP-dependiente y una topoisomerasa clásica tipo I generan las supervueltas de la siguiente forma: la helicasa genera 2 supervueltas, una positiva y otra negativa, mientras que la acción de topoisomerasa I relaja sólo la vuelta negativa, dejando de ese modo superenrollamiento positivo.

En el modelo estático, la actividad de helicasa tiene que generar primero zonas de hebra sencilla necesarias para iniciar la reacción, posteriormente el resto de la enzima enrolla al DNA sin necesidad de moverse a lo largo de la molécula.

Después de analizar la distribución de esta enzima tanto en archeas como en bacterias, se sugiere que su función puede ser el mantener al DNA en una conformación apropiada a altas temperaturas, ya que los organismos que la poseen son hipertermofílicos.

Topoisomerasas tipo II.

Las topoisomerasas tipo II son enzimas multiméricas, cortan ambas cadenas de DNA en una reacción acoplada a la unión e hidrólisis de ATP .

Todas la topoisomerasas tipo II de eucariontes y procariontes pertenecen a la misma familia. Las enzimas eucarióticas son dímeros y las procarióticas tetrámeros. Las partes amino y carboxilo terminal de las enzimas eucarióticas son homólogas a la subunidad B y A respectivamente de la top II de procarionte (Berger et al. 1996).

En los eucariontes el SE negativo se da casi completamente por el enrollamiento del DNA a los nucleosomas, no se detecta tensión libre fuera de estas estructuras.

La TopIV y la TopII o girasa son topoisomerasas tipo II de *E. coli*, ésta última es la única enzima capaz de introducir vueltas negativas en el DNA (Reece y Maxwell, 1993).

La girasa es un heterodímero A₂B₂ de 400 kDa codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*.

La región N-terminal de la subunidad GyrB esta compuesta por 4 hojas β -plegadas y 4 α -hélices, la última hélice se proyecta fuera de esta región y contiene el sitio de unión de ATP y a los compuestos cumarínicos, como la novobiocina, clorobiocina y cumermicina A1. Esta subunidad se dimeriza en respuesta a la unión con los nucleótidos.

El dímero cuyas dimensiones son 75x70x50 Å, esta formado por dos dominios que encierran una cavidad de 20Å de diámetro, la cual presenta cargas electrostáticas positivas, mientras que el resto de la molécula está cargada negativamente (Berger, 1998).

El fragmento C-terminal es la región que interacciona con el DNA y con el dímero de GyrA.

La subunidad A es la responsable del corte y reunión de las cadenas. El análisis cristalográfico de la estructura de este dímero revela la presencia de una cavidad de aproximadamente 20Å que podría estar implicada en el acomodo del duplex durante el intercambio de las cadenas.

El dímero tiene dimensiones de 100x100x40 Å, los monómeros se contactan por medio de un dominio parecido al de las proteínas CRP (cAMP receptor protein), el sitio activo Tyr-122 está cerca del dominio CRP del siguiente monómero (Berger, 1998).

El fragmento N-terminal es el que posee la actividad de nucleasa y ligasa del DNA y es el sitio de unión a las quinolonas, como el ácido nalidixico, la norfloxacin, el ácido oxolínico y la cipoflaxina.

El fragmento C-terminal confiere estabilidad al complejo y por si solo induce superenrollamiento positivo del DNA (Hsieh, 1992).

La introducción de supervueltas negativas en la molécula se da de la siguiente forma:

Durante el corte de las cadenas, un par de tirosinas de la proteína atacan lados opuestos de la hélice y se unen covalentemente al extremo 5' del DNA por medio de un enlace fosfo-tirosina.

Como se mencionó, al interactuar con el DNA, girasa puede provocar enrollamiento toroidal positivo. Cuando se une al DNA forma un complejo en el cual 120 pb se enrollan alrededor de la enzima, lo que genera la introducción de una supervuelta positiva. Posteriormente se cortan las cadenas del DNA (Reece y Maxwell, 1993).

Cada uno de los dímeros de girasa pueden ser vistos como un par de mandíbulas conectadas entre sí. Los orificios internos permiten el alojamiento momentáneo del duplex cortado, al mismo tiempo lo sujeta para pasar a través de éste al segundo duplex. Lo anterior provoca la introducción de una vuelta negativa.

Cuando la girasa se disocia del DNA, después de haber ligado el duplex cortado, el resultado final es que se introducen dos vueltas negativas, debido a que la vuelta positiva toroidal se transforma en una plectonémica negativa.

La hidrólisis de ATP se requiere para un cambio conformacional del tetrámero que le permite disociarse del complejo e iniciar un nuevo ciclo de reacción. Se requieren 2 moléculas de ATP por ciclo de reacción.

Cada ciclo de reacción de la girasa disminuye el valor de L_k en dos unidades.

En la figura 3 se muestra este mecanismo:

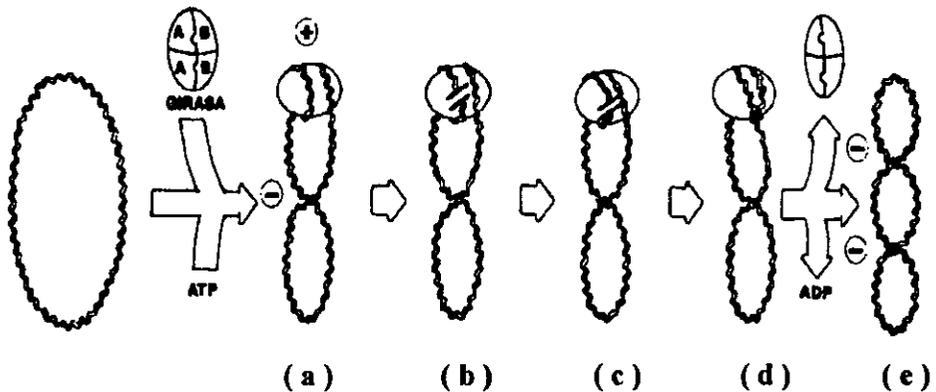


Fig 3. Mecanismo de acción de la girasa, a) introducción de una vuelta toroidal positiva, b) corte del duplex, c) otra zona del duplex pasa a través del corte, d) el corte se une y la enzima se disocia, e) introducción de dos supervueltas negativas (Gómez y Camacho, 1995 b).

La topoisomerasa IV es una enzima de 75 kDa codificada por los genes *parC* y *parE*. Las proteínas ParC y ParE muestran una identidad del 40% con respecto a las proteínas GyrA y GyrB, respectivamente.

Esta enzima también corta las dos hebras del DNA y requiere de ATP, sin embargo es incapaz de introducir supervueltas en la molécula.

Su función *in vivo* es desencadenar los cromosomas hijos, aunque también la TopII puede hacerlo. Las cepas sobreproductoras de TopIV pueden suplir la falta de TopI (Gómez y Camacho, 1995 b).

El Superenrollamiento del DNA y la vida celular.

En *E. coli* el nivel de SE esta regulado principalmente por el balance de las actividades de la TopI y la girasa. Una mutación en *topA* que inactive parcialmente a la TopI produce un nivel de SE mayor al normal, éste puede ser tan grande que provoque un arresto del crecimiento celular. El regreso a un nivel normal de SE puede darse entonces si se genera una mutación compensatoria en los genes de la girasa (Drlica, 1984).

El grado de SE del DNA es importante para llevar a cabo diversas actividades de la célula. Por ejemplo, durante la replicación la separación de las dos hebras de DNA genera supervueltas positivas y negativas hacia adelante y hacia atrás de la horquilla de replicación, la función de la girasa en este caso, es mantener una tensión helicoidal tal que elimine las barreras topológicas creadas por el movimiento de las horquillas. Si no existiera una proteína capaz de liberar la tensión, en genomas circulares, ésta se acumularía hasta el punto en que la replicación no pudiera avanzar más.

Por otro lado, la tensión helicoidal contribuye energéticamente a la separación de las hebras. Además, muchas de las proteínas que intervienen en el inicio de la replicación requieren de un substrato superenrollado (Drlica, 1984).

Se sugiere que girasa puede estar implicada en el inicio de la replicación debido a su mayor afinidad por zonas de DNA relajado, como por ejemplo cuando se abre la horquilla.

Un estudio fisiológico mostró que una mutante en girasa temperatura-sensible, incubada a la temperatura restrictiva, presenta niveles reducidos de síntesis de DNA, pero no muestra decremento en el nivel de elongación, por lo que se concluye que la iniciación es la que se ve bloqueada en estas condiciones (Drlica, 1984).

Después de completar un ciclo de replicación se generan cromosomas encadenados. Una segregación adecuada de éstos, requiere de una actividad decatenadora específica la cual es llevada a cabo por la TopIV.

Además de la replicación, la recombinación y la reparación del DNA también requieren de una topología adecuada para llevarse a cabo. Por ejemplo, en la recombinación sitio-específica, para la resolución de cointegrados, se ha identificado una actividad de topoisomerasa en la resolvasa del transposón *Tn3* (Drlica, 1984). La

recombinación de plásmidos dependiente de RecA disminuye en presencia de inhibidores de girasa. La integración de λ al cromosoma y la recombinación después de la conjugación se ven reducidas en mutantes *gyrB*. En éstas también se reduce la reparación inducida por radiación UV en unos casos y en otros baja la sensibilidad a esta radiación.

Las mutantes en *topA* incrementan su sensibilidad a los rayos UV. No se ha determinado si estos efectos son debidos a la alteración de la expresión de los genes involucrados en la reparación o si el DNA en estas condiciones no es un buen sustrato para las enzimas de reparación (Drlica, 1984).

El nivel de SE es importante además para la transcripción de algunos genes, por ejemplo, *topA*, el operón de tetraciclina, *trp* y el rRNA se transcriben más eficientemente cuando el DNA está superenrollado y *gyrA* y *gyrB* y *lacZ-UV5* cuando el DNA está relajado. Existen también genes que se expresan de igual forma en DNA enrollado o relajado como *bla*, *thrA*, el gene que codifica para la amilasa y para la homoserin-deshidrogenasa (Drlica, 1984).

En el caso del DNA del bacteriofago λ un incremento en su superenrollamiento aumenta el nivel de síntesis de RNA, ya que se activan algunos promotores que no son usados cuando el DNA está en forma lineal (Drlica, 1984).

Se sabe también que muchos factores ambientales modifican la topología del DNA.

Las respuestas celulares a cambios en el medio están generalmente acompañadas de cambios en el nivel de SE. Por ejemplo, los plásmidos aislados de células que crecían a 37°C estaban más enrollados que en células creciendo a 17°C y durante un choque calórico (de 37°C a 42-50°C) el SE de un plásmido reportero primero disminuye y luego se incrementa (Camacho et al. 1995)

Cuando la osmolaridad del medio aumenta, el SE también se incrementa y el operón *proU* se expresa más. Este operón codifica para un sistema de transporte glicina-betaina, esta sustancia no sólo ayuda a balancear la osmolaridad y restablecer la turgencia sino que también sirve como protector de proteínas ante la fuerza iónica alta. La sensibilidad de *proU* con respecto a los cambios de SE lo muestran las mutantes *topA* quienes simulan el efecto de un aumento en la osmolaridad. Los inhibidores de girasa y las mutaciones *gyr* también reducen la expresión de este operón (Higgins et al. 1988).

Otro ejemplo de que los cambios en las condiciones de crecimiento celular modifican el nivel del SE y la expresión de algunos genes, es la relación entre anaerobiosis y la expresión del gene *tonB*. El gene *tonB*, cuya función precisa se desconoce, sintetiza una proteína que es importante para procesos de acople de energía en la membrana externa. Durante la anaerobiosis, el SE del DNA se incrementa y la expresión de *tonB* disminuye. Por medio del estudio de la actividad de β -galactosidasa de fusiones *tonB-lacZ* se correlacionó el aumento en la expresión de este gene con la disminución del SE de un plásmido en la FS en condiciones aeróbicas (Dorman et al. 1988). Este es uno de los primeros trabajos donde se reporta que el nivel de SE disminuye en la FS.

A continuación se expondrán los conocimientos que se tienen hasta ahora con respecto a la fase estacionaria de crecimiento en *Escherichia coli*.

Fase estacionaria en *Escherichia coli*.

En la naturaleza las bacterias tienen que enfrentarse a diversas condiciones ambientales, la mayoría de las veces adversas, ya sea por la presencia de moléculas extrañas en el medio, cambios en la temperatura, falta de nutrientes, etc.

Esta última, es una etapa frecuente en la vida de las bacterias, como lo sugiere la presencia de sistemas de captación eficiente de nutrientes y la capacidad de incrementar rápidamente el volumen celular cuando estos reaparecen en el medio.

En el ciclo de vida de *E. coli*, las células llevan a cabo divisiones celulares continuas hasta el punto donde los nutrientes comienzan a agotarse, entonces las células disminuyen su velocidad de crecimiento hasta que se detiene por completo y entran en lo que se llama fase estacionaria de crecimiento. En esta fase, las células cambian su metabolismo a uno de menor costo energético y mayor resistencia celular para resistir el estrés nutricional y permanecer viables hasta que las condiciones mejoren y puedan reiniciar el crecimiento.

El mecanismo mediante el cual las bacterias sensan su población, en inglés 'quorum sensing', es una forma de comunicación célula-célula que les permite detectar la densidad de su población y regular genes específicos en respuesta a ciertos estímulos que generan las mismas células (Withers y Nordstrom, 1998).

En general el mecanismo de 'quorum sensing' involucra la síntesis, secreción y detección de factores difusibles que se liberan al medio, los cuales regulan la transcripción de ciertos genes. El resultado es la alteración de las características de la población en general. Por ejemplo, se pueden regular diversos procesos fisiológicos como la bioluminiscencia, la síntesis de ciertos antibióticos, la transferencia conjugativa de plásmidos, la virulencia o bien la división celular.

En *E. coli* se ha demostrado por experimentos de citometría de flujo que la iniciación de la replicación cromosomal está regulada por un factor extracelular producido al final de la FE. *E. coli* y *Salmonella typhimurium* sintetizan una molécula que permite relacionar el potencial metabólico del medio con la densidad celular del cultivo. La máxima secreción de esta molécula se da en la mitad de la FE y se va degradando hacia la FS o bien cuando la glucosa del medio se va acabando. Se sabe que esta molécula es una señal de 'quorum sensing' ya que estimula el sistema detector 2 de *Vibrio harveyi* (Surette y Bassler, 1998).

Hasta hace poco tiempo los estudios en biología molecular que tomaban como modelo a *E. coli* se habían hecho principalmente durante la FE, tal vez por el hecho de que como las bacterias gram-negativas no se diferencian en esporas, la FS se consideraba una variante de un estado de latencia.

Uno de los primeros trabajos con células en FS fue con respecto a la variación en la composición de la pared celular, en la cual se vuelven abundantes lipoproteínas unidas covalentemente y glicanos de cadenas más cortas, lo que refuerza la pared y la hace menos permeable (Pisabarro et al. 1985). En la FS, la superficie celular se cubre por moléculas hidrofóbicas que favorecen la adhesión y la agregación celular. Una de estas moléculas es la proteína de adhesión 'curli' que forma una especie de fimbria con afinidad a tejidos de fibronectina (Olsen et al. 1989).

La membrana celular se vuelve menos fluida, se incrementan los lipopolisacáridos y los ácidos grasos no saturados son convertidos a derivados ciclopropilados; mientras que en la capa de mureína se incrementan los enlaces covalentes, lo que le da una mayor adhesión a la membrana externa (Goodrich et al. 1996)

Durante la FS las células se vuelven más compactas y esféricas, el volumen relativo y la disposición de los compartimentos celulares cambia, el citoplasma se condensa y el

volumen del periplasma se incrementa, además la células acumulan compuestos glicogenados y polifosfatados que proveen una reserva de nutrientes y energía .

Las unidades de la RNA polimerasa se fosforilan, hay una síntesis de ppGpp que junto con los tRNA vacíos producen señales de estrés nutricional. Se induce el sistema de transporte glicina-betaina y la trehalosa se acumula en el citoplasma (Kolter et al. 1993).

Las células en FS presentan una mayor resistencia a otros tipos de estrés, como son el oxidativo y el calórico (Jenkins et al. 1988). Estas células también son resistentes a altas concentraciones de NaCl, agentes alquilantes, etanol, acetona, tolueno y deoxicolato (Hengge-Aronis, 1996). Estas resistencias se pierden gradualmente cuando el crecimiento se reinicia.

En general, la síntesis de proteínas es sólo el 10% de la que se presenta en la fase exponencial; esto se debe a la síntesis del factor RMF (ribosome modulation factor) el cual parece unirse a la subunidad 50S convirtiendo a los ribosomas en formas dimericas 100S inhibiendo así la unión aminoacil-tRNA al ribosoma. Este factor se sintetiza en condiciones de crecimiento lento o de estrés nutricional (Wada et al. 1995). La dimerización de los ribosomas posiblemente provee a las células con una poza que permite el reinicio rápido del crecimiento al añadirse nutrientes al medio.

La vida media de muchos RNA mensajeros aumenta en la FS y parece ser que existe también un almacenamiento de los mismos, ya que al reiniciar el crecimiento, la síntesis de proteínas no se ve afectada por la adición de rifampicina (un inhibidor de la transcripción) al medio (Kolter et al. 1993).

Durante la FS el nucleóide se compacta y las proteínas que se asocian a éste durante la FE se reemplazan casi en su totalidad por Dps (DNA-binding protein from starved cells). Esta proteína parece jugar un papel importante para la protección del DNA, se une en hexámeros a manera de anillos que interactúan con la doble hélice formando una estructura cristalina (Wolf et al. 1999). Las mutantes en este gen muestran una notoria pérdida de resistencia al peróxido de hidrógeno, agente que causa daños oxidativos en el DNA (Almirón et al. 1992). Adicionalmente, en la FS prolongada CbpA (curved DNA binding protein) aparece en niveles significativos (Ishihama, 1999) .

Por otro lado, en cuanto a los estudios a nivel genético en las células en FS, Gene y colaboradores (1986) demostraron que durante el estrés por falta de carbono existe una

síntesis diferencial de al menos 30 polipéptidos Pex (postexponencial proteins), muchos de estos péptidos no se sintetizan durante el crecimiento exponencial. Se sabe que las proteínas que se sintetizan durante los primeros 30 minutos tienen un papel importante para la supervivencia de la célula y las resistencias a los diferentes estreses se atribuyen a la síntesis de las proteínas Pex.

Así se empezaron a estudiar los genes que se inducen durante un estrés por falta de nutrientes hasta que se llegó a la detección del factor de regulación sigma de la FS: σ^3 .

El regulón de σ^3 .

La identificación del factor σ^3 se dio gracias al estudio previo de ciertos genes que codificaban para funciones diferentes, *nur katF* y *xhtA*, y que más tarde se supo que eran alelos de un mismo gene. El primer alelo identificado fue *nur* (near ultraviolet resistance), cuya función consiste en conferir resistencia a la radiación UV cercana. Después se identificó *katF*, un gene que codifica para dos catalasas y cuya síntesis es dependiente de la fase de crecimiento. Finalmente, el otro alelo, *xhtA*, codifica para una exonucleasa II que también se requiere para la resistencia a los rayos UV. Paralelamente se estudiaron otros genes relacionados con estrés nutricional como *appA* que codifica para la fosfatasa ácida y confiere un fenotipo característico en condiciones de estrés nutricional. Este gene también se activa bajo condiciones de falta de fósforo y anaerobiosis.

En un intento por identificar los genes que se inducen durante la FS, se aislaron y caracterizaron fusiones *csi::lacZ* (C-starvation induced). De éstas, estudió una con detalle, *csi2::lacZ*, la cual se induce durante la entrada a la FS y es regulada negativamente por cAMP. Las células que contenían esta fusión no producían glicógeno ni fosfatas ácida, no desarrollaban tolerancia al calor ni al H₂O₂ tampoco eran capaces de sintetizar por lo menos 16 proteínas con respecto a su cepa isogénica y su sobrevivencia era menor al cabo de periodos largos de ayuno (Lange y Hengge-Aronis, 1991 b).

La fusión se localizó en el minuto 59 del mapa genómico, en el marco de lectura abierta de *katF*. Posteriormente se mostró que las mutaciones *katF::Tn10* conferían defectos pleiotrópicos muy similares a los descritos por *csi-2::lacZ*

Con base en estos datos y a la gran similitud de la secuencia del gene con los factores sigma bacterianos se llegó a la identificación de un regulador central de la expresión génica durante la FS: el factor σ^5 o σ^{38} , codificado por el gene *rpoS*, de 330 aminoácidos y 37.9 kDa.

Una vez identificado este nuevo factor de regulación, se obtuvieron respuestas a algunas preguntas, como el por qué las células se volvían más pequeñas y de forma esférica. La explicación es que se induce el gene *bolA*, que es dependiente de σ^5 y cuyo producto es una proteína que incrementa la expresión de PBP6 (penicilin binding protein) que tiene que ver con la formación del septum (Lange y Hengge-Aronis, 1991 a).

Actualmente se han identificado aproximadamente 50 genes específicos de la FS regulados por σ^5 , mediante estudios con mutantes defectuosas para sobrevivir en esta fase (Ishihama, 1999). En geles de poliacridamida de dos dimensiones se detectaron alrededor de 30 proteínas reguladas que se inducen a la entrada de la FS y que son importantes para la sobrevivencia de la célula (Groat et al. 1986); sin embargo, la mayoría de los genes que codifican para estas proteínas no se han identificado.

Los genes que ya se identificaron codifican para proteínas con funciones diversas y no relacionadas. En realidad no se sabe cuántos genes son regulados directa o indirectamente por σ^5 , lo que hace pensar que la regulación se da en parte en forma de cascada; es decir, σ^5 activa genes que a su vez son reguladores de otros, constituyendo un sistema de regulación al que se le denomina el regulón de σ^5 .

Si bien σ^5 es el principal regulador de la FS, no es el único. Aproximadamente 20 proteínas se inducen ante la falta de carbono de manera independiente a σ^5 . Por ejemplo, *cstA* quien codifica un sistema de transporte de péptidos es inducido por cAMP; DnaK, GroEL y HtpG son proteínas inducidas por σ^{32} durante la FS y los genes *glgB* y *glgC*, implicados en la biosíntesis del glicógeno son regulados por el producto de *csrA* (Kolter et al. 1993).

En las tablas 1 y 2 se muestran algunos genes que se inducen en la FS que son regulados por el factor σ^5 o que se transcriben independientemente de σ^5 :

Genes dependientes de σ^*

Gene	Producto génico	Función	Posición en el mapa génico (min)
Morfología celular y división			
<i>bolA</i>	Proteína reguladora	Control de la síntesis de PBP6	10
<i>dacC</i>	PBP6 (D-alanina carboxi-peptidasa)	Estabilización de péptidoglicanos en FS	19
<i>ftsQAZ</i>	Proteínas de división Celular	Formación del septo	2.3
<i>ficA</i>	Proteína reguladora	Regulación de genes de división	74
<i>osmB</i>	Lipoproteína	Alteraciones de la superficie celular	28
<i>osmY</i>	Proteína periplásmica	?	99
<i>proP</i>	Proteína de transporte	Transporte de glicina y glicina betaina	93
<i>csgA</i>	Subunidad de la proteína curli	Unión a fibronectina	23
<i>cfa</i>	Sintetasa ácidos grasos ciclopropilados	Síntesis de ácidos grasos	
<i>treA</i>	Trehalasa periplásmica	Crecimiento en trehalosa en medio de alta osmolaridad	26
Multiresistencia			
<i>otsB</i>	Trehalosa-6-fosfatasa Trehalosa-6-sintetasa	Síntesis de trehalosa Osmoprotección Termotolerancia	41
<i>csiD</i>	Proteína reguladora	Termotolerancia	58
<i>cbpA</i>	Análogo de DnaJ	Chaperona molecular	?
<i>ecp-htrE</i>	Homólogos de PapD y PapC	Termotolerancia Osmotolerancia	158
<i>emrAB</i>	Translocasa de membrana	Resistencia múltiple a drogas	58
<i>mccABCDEF</i>	Varias proteínas	Síntesis y secreción de microcina C7	Plásmido
<i>katE</i>	Catalasa HPII	Resistencia a H ₂ O ₂	37
<i>katG</i>	Catalasa HPI	Resistencia a H ₂ O ₂	89
Productos de almacenamiento			
<i>glgS</i>	GlgS	Síntesis de glicógeno	66
<i>ppk</i>	Ppk	Síntesis de polifosfatos	
Regulación génica y configuración del nucleóide			
<i>aldB</i>	Aldehído deshidrogenasa	?	81
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa	?	19
<i>appY</i>	Proteína reguladora	Control de la expresión	13

<i>appABC</i>	Fosfatasa-ácida, citocromo oxidasa	de <i>appABC</i> Metabolismo anaerobio	22
<i>hyaABCDF</i>	Hidrogenasa I	Sistema de toma de hidrógeno	22
<i>aidB</i>	Deshidrogenasa	Protección del DNA	95
<i>dps</i>	Proteína de unión al DNA	Protección del DNA	18
<i>xthA</i>	Exonucleasa III	Resistencia a H ₂ O ₂ Reparación del DNA	38
<i>topA</i>	Topoisomerasa I	Relajación de DNA superenrollado	28
<i>dps</i>	Dps	Protección y compactaci- ón del DNA	18
<i>cbpA</i>	CbpA	Proteína de unión a DNA curvo	23
<i>himD</i>	Subunidad de IHF	Unión al DNA, regulación génica	34.2
Funciones desconocidas			
<i>csiDE</i>	Proteínas de estrés de carbón		
<i>pex</i>	Proteínas de la fase post- exponencial		

Tabla 1. Resumen de: Goodrich et al. 1996; Hengge-Aronis, 1996; Ishihama, 1997 y Lowen et al. 1998.

Genes independientes de σ^3

Gene	Producto génico	Función	Posición en el mapa génico (min)
<i>rmf</i>	Factor modulador del ribosoma	Dimerización de ribosomas	22
<i>hns</i>	H-NS	Regulación génica global y organización del cromosoma	28
<i>rpoS</i>	Subunidad σ^3 de la RNA polimerasa	Control de genes de FS y genes osmorregulados	58.9
<i>sspAB</i>	Proteína del sistema estricto	Regulación génica global	70
<i>gigCAP</i>	ADP-glucosa Pirofosforilasa Glicógeno sintetasa Fosforilasa	Síntesis y degradación de glucógeno	76
<i>rpoH</i>	σ^{32}	Control de los genes de estrés calórico	77.5
<i>uspA</i>	Proteína de estrés universal	?	78.4
<i>slpA</i>	Lipoproteína de membrana externa	?	79
<i>mcbABCDEFG</i>	Microcina B17 y 6 proteínas adicionales	Síntesis y exportación de microcina B17 e inmunidad contra ella	Plásmido

Tabla 2. Modificada de Hengge-Aronis, 1996.

El gene *rpoS* y la regulación de σ^s .

El gene *rpoS* que codifica al factor σ^s se encuentra en el minuto 59, entre las coordenadas 2885 y 2886 del mapa físico, su dirección de transcripción es al inverso de las manecillas del reloj y forma parte de un operón junto con *nlpD*, operon *nlpDrpoS*, quien codifica una lipoproteína de formación de pared celular.

Los dos promotores de *nlpD* contribuyen a la transcripción de *rpoS* durante la FE; sin embargo, el principal transcrito comienza dentro de *nlpD*. El promotor de este transcrito exhibe una secuencia consenso muy parecida a la reconocida por σ^{70} , la cual es reconocida *in vitro* por σ^s ; a este promotor se le denomina *rpoSp1*.

El análisis de deleciones en fusiones *rpoS::lacZ*, mostró que se necesita casi 1 kb río arriba (región 5' antes de la región codificadora del gene) para su expresión (Lange y Hengge-Aronis, 1994 b).

Una secuencia de terminación de la transcripción Rho-independiente se encuentra justo río abajo, región 3' después de la región codificadora del gene de *rpoS*.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de σ^s con otros factores sigma revela una gran similitud con el factor σ^{70} . Varios genes que son dependientes de σ^s como *bolA* y *xthA* pueden ser transcritos *in vitro* por σ^{70} (Hengge-Aronis, 1996). Debido a esto se hizo un estudio en el cual se reemplazaron al azar secuencias desde -38 a -19 y así se definieron elementos consenso para el reconocimiento de $E\sigma^s$: CTTGACAAA(n10)TGTGCTATAa/cT, esta secuencia contiene a la secuencia consenso para σ^{70} : TTGACA(n17) TATAAT. Por ello se propone que la diferenciación entre los dos factores sigma debe ser mediada por la tolerancia a bases no consenso. La habilidad de σ^s para unirse a secuencias subóptimas es mejor que la de σ^{70} y aunado a la mayor cantidad de σ^s en la FS, da como resultado el incremento en la transcripción de sus promotores (Gaal et al. 1999).

También es posible que se requieran factores de regulación adicionales; por ejemplo, se mostró que IHF se requiere para la transcripción del promotor de *dps* en la FS. El mismo promotor también se transcribe en FE en presencia de H_2O_2 pero requiere de σ^{70} y de OxyR como activador (Altuvia et al. 1994).

Se ha reportado competencia *in vivo* entre los factores sigma. En una mutante *rpoS*, disminuye la expresión de muchos genes y se induce la de otros. Este dato sugiere que la inducción se debe a que, en ausencia de σ^s , otros sigmas aumentan su actividad. Otro dato que apoya lo anterior es que la sobreproducción de σ^{70} simula el efecto de la mutación *rpoS* (Farewell et al. 1998).

Por esta razón se piensa que durante la FS los factores sigma compiten por una cantidad limitada de RNA polimerasa, la cual decrece aproximadamente 66% con respecto a la FE. Además, el factor anti- σ^{70} designado también como Rsd (Regulator of sigma D) se expresa en grandes niveles durante la transición a la FS (Ishihama, 1999), lo que hace que σ^s tenga menos competencia por σ^{70} .

La actividad de σ^s está regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y de estabilidad de la proteína. La regulación transcripcional de *rpoS* se da de manera negativa a través de la interacción con el complejo CRP-cAMP. Los datos de fusiones transcripcionales *rpoS::lacZ* en mutantes Δcya muestran que la actividad β -galactosidasa se reduce fuertemente al agregar cAMP al medio (Lange y Hengge-Aronis, 1994 a). En la región reguladora de *rpoS* se localiza una secuencia putativa de unión para CRP (Hengge-Aronis, 1996).

La regulación post-transcripcional de *rpoS* es muy importante. En medio mínimo, las fusiones transcripcionales *rpoS::lacZ* mostraron un incremento de 5 veces durante la entrada a la FS; sin embargo, bajo las mismas condiciones, la actividad de β -galactosidasa de fusiones traduccionales se incrementó de 10 a 30 veces y continuó aumentando después de tres horas (Lange y Hengge-Aronis, 1994 a). Las discrepancias en estos datos y otros en los que la degradación de σ^s después de agregar cloramfenicol era muy rápida en la FE pero no en la FS, indican que la regulación de σ^s no es sólo a nivel transcripcional y traduccional (Takayanagi et al. 1994).

La explicación a lo anterior se dio al analizar la estabilidad de σ^s en ambas fases de crecimiento. Mediante experimentos de pulso y caza se determinó la vida media de la proteína, que en FE es de 1.4 minutos, mientras que en FS se incrementa a 10.5 minutos (Lange y Hengge-Aronis, 1994 a); de manera que la estabilización es muy importante para el control celular de σ^s .

La regulación post-traducciona también se da durante la FE bajo estrés osmótico, durante el cual σ^s puede tener una vida media de hasta 45 minutos. Se propone que la expresión de σ^s se incrementa en estas condiciones a través de un mecanismo que opera a nivel post-transcripcional, ya que el tamaño de la región codificante de *rpoS* que precede a la fusión con *lacZ* afecta la expresión del gene (Muffler et al. 1998). La regulación de la proteólisis de σ^s además de requerir a ClpXP (Lowen et al. 1998), está modulada por la interacción de un factor de reconocimiento dentro de la región codificadora del factor sigma. Dentro de esta región, el aminoácido K173 es esencial para la interacción con la proteína RssB en su forma fosforilada favoreciendo la degradación de σ^s . Esta lisina también tiene un papel importante en el reconocimiento de los promotores (Becker et al. 1999).

Otro medio de regulación post-transcripcional es la estructura secundaria del mensajero de *rpoS* para quien se predice una conformación parecida a la que forma el mensajero de *rpoH* en el inicio de la traducción, comprendiendo la secuencia RBS (ribosomal binding site), el codón de inicio y una caja río abajo complementaria con la subunidad 16S del rRNA. Esta zona queda secuestrada mediante un apareamiento antisentido con la región comprendida entre los nucleótidos 160 y 210, lo que sugiere que esta estructura se resuelve bajo la inducción en ciertas condiciones (Lange y Hengge-Aronis, 1994 b).

Otro factor de regulación negativa de σ^s es la proteína H-NS, ya que mutantes *hns* presentan altos niveles de σ^s durante la FE (Barth et al. 1995). Los niveles de UDP-glucosa, que es un intermediario en el metabolismo de la glucosa, parecen reprimir la traducción de σ^s debido a que la disminución en los niveles de glucosa causa una baja de los niveles de UDP-glucosa y un aumento en σ^s (Bohringer et al. 1995).

Otros reguladores globales en la fase estacionaria.

La expresión de muchos de los genes de la FS esta regulada positiva o negativamente por diferentes factores. Entre estos factores están: el complejo receptor cAMP-CRP, la proteína Lrp (leucine-responsive regulatory protein), IHF y H-NS.

cAMP-CRP está implicado en la activación de dos terceras partes de los genes que se expresan durante la falta de nutrientes. Este factor induce un control positivo en los genes *cst*, *glgS*, *csiD*, *csiE* y *poxB*, el operón de microcina C7 y *cstA* y un control negativo sobre los genes *pex*, *rpoS*, *bolA*, *osmY* y *csiF* (Hengge-Aronis, 1996).

Lrp es un regulador específico de ciertos operones que se prenden o apagan en respuesta a leucina. Se calcula que esta proteína regula cerca de 70 genes y operones (Newman et al. 1996). Lrp también es un regulador global durante cambios de medio rico a mínimo. En este caso, reprime la toma y metabolismo de nutrientes en medio rico y activa la expresión de otros genes biosintéticos. En medio rico se comporta como regulador negativo del gene *osmY*, mientras que en medio mínimo es un regulador más general. Durante la FS regula positivamente al gene *csiD* (Hengge-Aronis, 1996).

IHF controla positivamente a *dps* y al operon de microcina B17 y ejerce un control negativo sobre el gene *osmY* parecido al que ejerce CRP (Hengge-Aronis, 1996).

H-NS es un regulador principalmente negativo, en especial durante la FE; sin embargo; aunque su concentración aumenta en la FS, parece estar más implicado en la organización del cromosoma (Dersch et al. 1993).

Como podemos notar, la regulación en la FS es el resultado del uso combinado de la acción de múltiples reguladores que ejercen su acción diferencialmente en tipo, momento y duración sobre sus respectivos genes, no se trata entonces de una inducción absoluta sino más bien de una complicada red de regulación muy fina.

También se observa que muchos genes controlados por σ^3 codifican para proteínas reguladoras, como por ejemplo AppY, BolA, Dps, CsiD y CsgD.

AppY es un miembro de la familia reguladora de AraC, que tiene un motivo hélice-vuelta-hélice característico de las proteínas de unión al DNA. Esta proteína induce genes que se expresan durante condiciones anaerobias. BolA controla a *dacC*, implicado en la formación del septo y la estabilización de la membrana con peptidoglicanos. Dps es una proteína cuya ausencia causa una disminución de por lo menos 23 proteínas de la FS, y baja la resistencia de las células al H_2O_2 , ya que los genes dependientes de OxyR en la FE son controlados por Dps en la FS (Almiron et al. 1992).

Las mutantes *csiD* exhiben alteraciones pleiotrópicas en la síntesis total de proteínas de la FS (Hengge-Aronis, 1996). El gene *csgD* es el responsable de la expresión del operón *csgBA* y estimula la transcripción del operón *csgDEFG* responsable de la síntesis de las subunidades del curli.

Los ejemplos anteriores nos muestra también que muchas respuestas a diferentes condiciones se encuentran relacionadas en la FS: el control del oxígeno, la represión catabólica, la resistencia a diferentes estreses, etc.

Señales que inducen la fase estacionaria.

Hasta ahora las señales que inducen la síntesis de σ^S son desconocidas. Tampoco se conoce bien cómo se sensa específicamente la falta de nutrientes, cómo se regula la inducción de sólo ciertas respuestas de un sistema global, etc.

Se ha propuesto que las alarmonas ppGpp podrían estar involucradas en la expresión de σ^S ya que mutantes *ΔrelA* y *ΔspoT* muestran alteraciones morfológicas y sensibilidad osmótica igual que las mutantes *rpoS* (Hengge-Aronis, 1996). La concentración de esta molécula cambia en respuesta al estrés nutricional por aminoácidos, carbono, nitrógeno o fosfatos (Cashel et al. 1996).

Otra molécula que se sospecha que puede estar implicada en la regulación de σ^S es la HSL (homoserin lactona), ya que mutantes en las vías de síntesis de treonina y metionina, donde la homoserina es un intermediario, presentan niveles bajos de σ^S en experimentos tipo Western blot (Kolter et al. 1993). También se ha mostrado que la adición de ácidos débiles estimula la actividad de fusiones transcripcionales *rpoS::lacZ* (Hengge-Aronis, 1996).

Inhibidores de girasa durante la fase estacionaria.

Durante la FE tardía se detecta una proteína de 18 kDa, GyrI, que es un inhibidor de la girasa. El mecanismo de inhibición de esta proteína se desconoce aún, sin embargo se

descartan para éste las actividades de nucleasa y proteasa. Al parecer la transcripción y síntesis de GyrI están acopladas, ya que el incremento en la actividad β -galactosidasa de fusiones transcripcionales aumenta paralelamente con la detección de anticuerpos anti-GyrI. Otros datos, como la sobreexpresión de GyrI, la cual provoca un crecimiento filamentosos, disminución del número de células viables y nucleoides con morfología anormal, parecidos a los de las células tratadas con quinolonas, sugieren que el blanco de acción de esta molécula es precisamente la subunidad GyrA (Akira et al. 1998). Otros genes presentes en plásmidos e involucrados en la inhibición de girasa en la FS son los genes del operón de microcina B17, operón *mcb*, que se inducen al inicio de ésta de manera dependiente a OmpR (Kolter et al. 1993).

El SE del DNA y la fase estacionaria de crecimiento

Como se mencionó anteriormente, el nivel de SE del DNA cambia en respuesta a diversos estímulos ambientales, uno de estos es el estrés nutricional.

Se ha reportado el cambio en el nivel de superenrollamiento de un plásmido reportero bajo condiciones de estrés por falta de nutrientes (Balke y Gralla, 1987). Estos autores estudiaron los cambios en el nivel de SE a lo largo del crecimiento hasta llegar a la FS y en células en fase exponencial que se centrifugan y resuspenden en un amortiguador sin nutrientes. En el primer caso las células agotan lentamente los nutrientes hasta establecerse la FS y cesar el crecimiento; en el segundo, el ayuno de nutrientes y la suspensión del crecimiento se establecen de forma rápida. Los experimentos de agotamiento lento de nutrientes se realizaron en amortiguador MOPS con poca glucosa, 0.05%; cabe señalar que con esta fuente limitada de energía, las células entran en FS con una densidad celular baja; los experimentos de ayuno rápido se realizaron en amortiguador MOPS con glucosa al 0.2% y casaminoácidos.

En el protocolo de ayuno lento de nutrientes, 15 horas después de la FS, el DNA se encontró relajado y frecuentemente se observó una distribución bimodal de topoisómeros. Cuando se añadieron nutrientes a estas células se observó que la recuperación del nivel de SE se dio después de 2.5 minutos. Esta recuperación se presentó en presencia de

cloramfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas, por lo que se sugiere que esta síntesis no se requiere para la recuperación del SE. En este trabajo no se presentan controles que prueben que las células después de un ayuno total prolongado sean permeables a este antibiótico.

En el caso del protocolo de ayuno rápido se observó que el DNA se relaja después de la primera hora del ayuno y cuando se añadieron nutrientes a células con dos horas de ayuno, la recuperación del SE se observó a los 30 minutos. En este experimento no se probaron tiempos más cortos.

En otro trabajo (Schneider et al. 1997) se correlacionó la presencia de la proteína Fis con la generación de una población de plásmidos de superenrollamiento intermedio después de 20 horas de FS y se observó la recuperación del nivel de SE con la desaparición gradual de la población de SE intermedio. El mismo grupo en un trabajo posterior (Schneider et al. 1999) mostró que Fis afecta la eficiencia de transcripción de los promotores de *gyrA* y *gyrB*, reprimiendo su actividad. En experimentos de 'footprinting' se observó una protección por Fis en los promotores de los dos genes. También se mostró que hay una correlación inversa entre la cantidad de Fis y el grado de SE de un plásmido.

De lo anterior se sugiere que Fis modula la dinámica cromosomal durante las fases de crecimiento, lo cual podría tener implicaciones sobre el control homeostático.

Se propone que la expresión de *fis* al inicio de la fase exponencial (FE) se debe en parte a una respuesta homeostática generada como respuesta al elevado nivel de SE, el cual se incrementa rápidamente durante la recuperación del crecimiento; de tal forma que es necesario que se compense o prevenga la generación de una tensión excesiva, de lo contrario se provocaría un SE inapropiado y potencialmente letal para la célula.

Como vemos, existen varias maneras de llevar a las células a una FS de crecimiento y en todas estas ocurren cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA. Lo anterior sugiere que bajo un estrés nutricional existe un cambio global en la expresión de los genes que es dependiente de las condiciones a las que las células son sometidas y que frecuentemente se acompañan de cambios en el SE.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los cambios inducidos por la limitación de nutrientes en la topología del DNA y los mecanismos de regulación de la actividad de la topoisomerasa II (girasa) que acompañan a estos cambios.

Objetivos particulares

Estudiar el nivel de SE del DNA durante el crecimiento celular hasta llegar a la FS y en el reinicio del crecimiento al añadir nutrientes nuevos al cultivo.

Estudiar si el incremento de pH que se presenta en la FS influye en el nivel de SE del DNA en esta fase y en el reinicio del crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS*

Cepas bacterianas y plásmidos

Todos los experimentos se realizaron con la cepa MC4100 y el plásmido pMSO1.

El genotipo de MC4100 es $\Delta(argF-lac)295 araD139 rpsL150 thiA1 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR$ y su fenotipo Lac⁻ Ara⁻ Sm^r Thi⁻. A esta cepa se le introdujo por transformación (ver más adelante) el plásmido pMSO1 Ap^r, que es un derivado del pBR322 (León et al. 1988).

Todos los experimentos se realizaron a 37°C.

Curvas de crecimiento bacteriano.

Las curvas de crecimiento de la cepa MC4100/pMSO1 en diferentes medios de cultivo se obtuvieron de la siguiente manera: primero se preparó un cultivo de 3 ml en un tubo de ensayo a partir de un inóculo bacteriano que se tomó de una caja Petri. Se dejó crecer el cultivo en un baño de incubación a 37°C con agitación de 180 r.p.m. por 12-16 horas. Este cultivo se diluyó 10⁻² en 10 ml de medio nuevo y se incubó en un matraz nefelométrico de 125 ml en el baño y condiciones ya descritas.

En todos los experimentos se usó el medio rico LB con o sin amortiguador MOPS (ácido 3-[N- morfolino] propanosulfónico) a una concentración de 40 mM.

La cepa MC4100/ pMSO1 se cultivó en los medios antes mencionados con carbecín a 300 µg/ml; este antibiótico es similar a ampicilina pero se degrada más lento.

El crecimiento bacteriano se midió indirectamente como el aumento en unidades de absorbancia del cultivo usando un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic) en la longitud de onda de 550 nm. Se tomaron lecturas cada 30 minutos.

* La composición de los medios de cultivo y soluciones se describe en el Apéndice.

Cuentas viables

Para obtener el número de células viables presentes en un cultivo (cuentas viables) en diferentes puntos de la curva de crecimiento y en la FS, se hicieron diluciones 10^{-1} del cultivo en medio de dilución (MD). Durante la FE las diluciones se realizaron cada 30 minutos; en la FS se realizaron cada 6 horas.

A partir de la dilución inicial se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se sembraron por goteo 100 μ l de las diferentes diluciones en cajas con LB sólido que se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se contaron las unidades formadoras de colonias.

Transformación por el método de polietilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO).

La transformación se realizó de acuerdo al método de preparación de células competentes en un solo paso (Chung et al. 1989).

Se tomaron 100 μ l de un cultivo de toda la noche de la cepa MC4100 y se inocularon en 10 ml de medio LB. Este cultivo se dejó crecer a 37 °C hasta alcanzar una D.O. a 550 nm de 0.4. De ahí se tomaron 500 μ l y se mezclaron homogéneamente con 500 μ l de TSS 2X.

De esta mezcla se transfirieron 100 μ l a un tubo Eppendorf y se adicionó 1 μ l del plásmido pMSO1 (aproximadamente 1 μ g de DNA), se incubó en hielo durante 30 minutos, después el tubo se transfirió a un baño a 43 °C y durante 5 minutos. El tubo se regresó al hielo 5 minutos, después se le adicionaron 900 μ l de medio LB al que se le agregó dextrosa 20 mM, se incubó a 30 °C durante 1.5 horas y se sembraron por goteo 100 μ l de cultivo en medio sólido LB-carbecín 300 μ g/ml .

Como control se procesó de la misma manera un tubo con 100 μ l de la mezcla sin plásmido.

Obtención de la distribución de los topoisómeros del plásmido pMSO1.

1. Purificación del plásmido por el método de lisis alcalina (Maniatis et al. 1982).

Para asegurar la reproductibilidad de estos experimentos, los cultivos se iniciaron a partir de un cultivo base al que se le añadió glicerol al 20% y se conservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se tomaron $50\text{ }\mu\text{l}$ de este cultivo, se inocularon en tubo de ensayo de $10 \times 1\text{ cm}$ que contenía 3 ml de medio LB con carbecín $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se dejó crecer toda la noche. De éste cultivo se tomaron $100\text{ }\mu\text{l}$ y se inocularon en 10 ml de medio LB o LB-MOPS con carbecín $300\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Se creció el cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante (180 r.p.m.) hasta alcanzar la densidad óptica deseada. Inmediatamente después se transfirieron los cultivos a tubos de 30 ml que contenían 18 g de medio LB congelado y triturado.

Las células se cosecharon por centrifugación a $11\text{ }000\text{ r.p.m.}$ durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en $200\text{ }\mu\text{l}$ de solución I con lisozima 0.005 g/ml y se adicionaron $15\text{ }\mu\text{l}$ de RNasa (10 mg/ml).

Se transfirió la solución a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agitó suavemente en el vortex para formar un homogenado, éste se incubó destapado en hielo-agua durante 10 minutos .

Posteriormente se adicionaron $400\text{ }\mu\text{l}$ de solución II. Se tapó el tubo, se invirtió cuatro veces con la mano y se incubó 10 minutos en hielo-agua.

Pasado este tiempo se adicionaron $300\text{ }\mu\text{l}$ de la solución III y se agitó el tubo invertido en el vortex por 10 segundos , se incubó en hielo-agua durante 10 minutos .

Después se centrifugó la mezcla a $10\text{ }000\text{ r.p.m.}$ durante 15 minutos en frío, se recuperó el sobrenadante, se le agregaron $650\text{ }\mu\text{l}$ de isopropanol y se incubó toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al día siguiente se centrifugaron los tubos a $12\text{ }000\text{ r.p.m.}$ durante 15 minutos en frío, se decantó el líquido y se dejó secar la pastilla a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas.

Finalmente la pastilla se resuspendió en $11\text{ }\mu\text{l}$ de agua y se agregaron $9\text{ }\mu\text{l}$ de colorante guía para DNA.

Antes de poner la muestra en el gel, se centrifugaron los tubos 30 segundos a 10 000 r.p.m. Se evitó llevar al gel la parte insoluble.

2. Separación de topoisómeros del plásmido pMSO1 por electroforesis en geles de agarosa.

Se prepararon 1000 ml de solución amortiguadora TBE 1X con la concentración deseada de cloroquina. De estos 1000 ml, 70 ml se utilizaron para preparar un gel de agarosa al 1% con dimensiones de 9x15 cm y el resto del buffer se colocó en la cámara de electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo a 25 Volts durante 22 horas.

Al terminar la electroforesis, el gel se lavó con agua destilada durante 4 horas con agitación suave y por lo menos con cuatro cambios de agua (para concentraciones de cloroquina >20 µg/ml los cambios de agua se hicieron cada 40 minutos).

El gel se tiñó con bromuro de etidio 2.5 µg/ml y se fotografió con película KODAK TRI-X PAN y filtro rojo utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

Marcaje radioactivo de DNA, RNA y proteínas.

Para marcar radioactivamente al DNA de las células en un cultivo se utilizó [metil-³H]-Timidina, para el RNA [5,6 ³H]- Uridina y para las proteínas L-[4,5 ³H]-Leucina, todas a una concentración de 10 µCi/ml.

Para detener el marcaje y precipitar las moléculas radioactivas se añadieron 200 µl de ácido tricloro acético (TCA) 50%/ml de cultivo. La mezcla se incubó en frío durante una hora y el precipitado se colectó en un filtro de fibra de vidrio >2.6 µm (Sigma) y se lavó con TCA 5% y etanol fríos. Se dejó secar el filtro y se transfirió a un vial que contenía 5 ml de líquido de centelleo. Se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en un analizador de líquido de centelleo (Tri-carb 1500 Packard) durante 4 minutos.

Los antibióticos rifampicina (300 $\mu\text{g/ml}$) y cloramfenicol (200 $\mu\text{g/ml}$) se utilizaron como inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas respectivamente.

La rifampicina fue añadida en solución acuosa y el cloramfenicol en polvo.

La síntesis de DNA se estudió según el protocolo de del Portillo y col (1987). Para esto, se dejó crecer un cultivo en presencia del precursor radiactivo hasta 18 horas después de la FS. El cultivo se diluyó 1:10 en 10 ml medio fresco suplementado con el precursor radiactivo a la misma concentración y se sacaron alícuotas de 1 ml, cada 30 minutos en los tiempos indicados.

Análisis densitométrico

Las curvas densitométricas de los topoisómeros se obtuvieron utilizando el programa RFLPscan 3.0 de Scanalytics, 1994. USA.

Resultados

L Cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario.

Las actividad celular de las topoisomerasas puede ser monitoreada a través de un plásmido reportero ya que el SE de éste, como el del DNA del cromosoma, está sujeto principalmente al balance de las actividades de la TopI y de la girasa.

El plásmido reportero que se utilizó fue el pMSO1, que es un derivado del pBR322 al cual le fué deletado el gene *tet* (León et al. 1988).

Como hemos visto, existen diversas maneras en que las células entran a una fase estacionaria de crecimiento: agotamiento súbito o paulatino de nutrientes, cantidad limitada de un nutriente preferencial, fuentes de energía pobres, etc. Los cambios en el nivel de SE dependen justamente de las condiciones a las que las células son sometidas previamente.

En este trabajo, se llegó a una FS por pérdida paulatina de nutrientes a partir de un medio rico. Se decidió emplear esta forma de estrés nutricional debido a que al ir agotando lentamente los diferentes nutrientes de un medio de crecimiento las células pueden modular su fisiología.

Se estudió también el efecto de un estrés adicional a la falta de nutrientes, que es el aumento en el pH del medio que se presenta en la FS. Estudiamos el efecto del pH sobre el crecimiento celular y los cambios en el nivel de SE.

Los medios empleados fueron:

1. LB, en este medio la principal fuente de carbono son aminoácidos y péptidos, de tal manera que cuando las células se van acercando a la fase estacionaria expelen al medio moléculas aminadas, lo cual produce un incremento progresivo del pH, llegando a un máximo de 9 (Lazar et al. 1998). En esta condición, además de que las células contienden contra la falta de nutrientes, se someten a un estrés adicional que es el aumento en el pH externo. *E. coli* es una bacteria neutrofilica y el intervalo de pH externo en el cual puede regular su pH interno es de 5 a 8, por encima o debajo de estos valores las células presentan

mecanismos regulatorios de tolerancia. Se ha reportado que la homeostasis del pH en *E. coli* requiere de una alta tasa respiratoria o bien de ATP. Las células que metabolizan sus reservas endógenas, tienen bajas tasas respiratorias y capacidad limitada para sintetizar ATP; también son susceptibles a descontrolar su pH interno; sin embargo son capaces de seguir generando una fuerza protónica motriz (Booth 1985). El pH del cultivo también afecta las propiedades metabólicas de las células, se sabe por ejemplo que a pH ácidos se sintetizan descarboxilasas y en pH alcalino, aminosas.

2. LB-MOPS, es un medio LB con el amortiguador (MOPS) que permite mantener un pH de 7.

Definimos como fase estacionaria el momento a partir del cual se deja de incrementar el número de células en un cultivo en medio LB, lo cual ocurre a una densidad óptica de 1.5 en la longitud de onda de 550nm.

Para el estudio del efecto del pH en el crecimiento celular se hicieron curvas de crecimiento bacteriano en medio LB y LB-MOPS.

En la figura 4 se muestran los resultados. En el medio LB se observa que el aumento en el número de células es un poco más lento que en LB-MOPS y el número final de células en la fase estacionaria también es menor. Sin embargo estas diferencias no son significativas ya que ensayos posteriores no se observó el mismo comportamiento, por lo que se puede decir que un aumento en el pH externo no influye en el crecimiento celular.

A continuación se estudió el efecto del pH externo sobre el SE del DNA. Para esto, se observaron los cambios en el nivel de SE desde la fase de crecimiento exponencial y hasta 18 horas después del inicio de la fase estacionaria en los dos medios.

En la figura 5 se muestran las diferencias en la cinética de los cambios del nivel de SE. En medio LB, los plásmidos comienzan a relajarse conforme llegan a la fase estacionaria (carril b); 6 horas después del inicio de la fase estacionaria los plásmidos están más relajados y van desapareciendo las formas más enrolladas (carril c); después de 12 horas además de los plásmidos relajados se hace notoria una población de plásmidos enrollados (carril d) la que se mantiene hasta 18 horas después del inicio de la fase estacionaria (carril e). En LB-MOPS la cinética de relajamiento de los plásmidos presenta un comportamiento diferente, en este caso se observa un relajamiento progresivo de los plásmidos (carriles b-d) hasta llegar a un máximo (carril e).

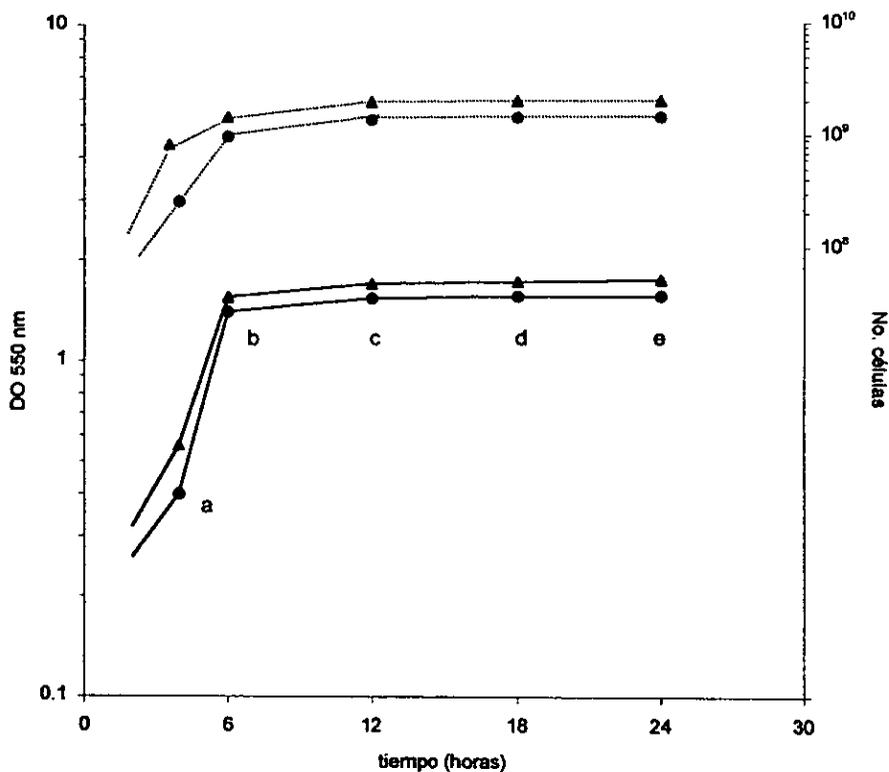


Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa MC4100/pMS01 de *E. coli* a 37°C en medio LB (●) y LB-MOPS 40 mM (▲). El cultivo y las cuentas viables se realizaron como se describe en material y métodos.

En los tiempos marcados se midió la densidad óptica (líneas continuas) y se contó el número de células (líneas punteadas). (a), fase exponencial, (b) inicio de la fase estacionaria, (c, d y e) 6, 12 y 18 horas respectivamente después del inicio de la fase estacionaria.

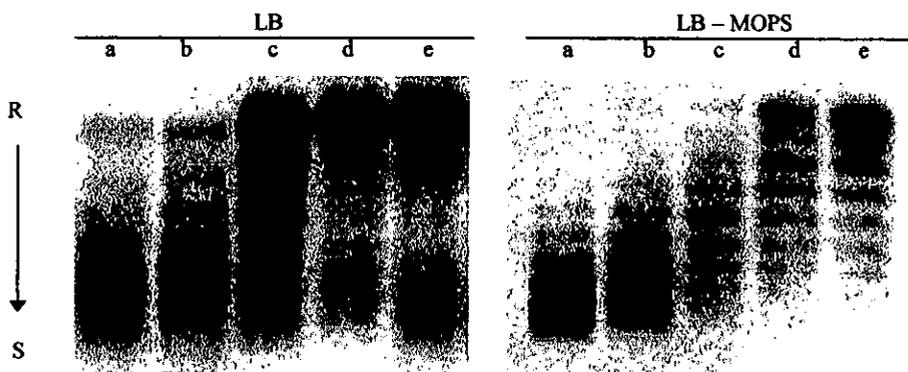
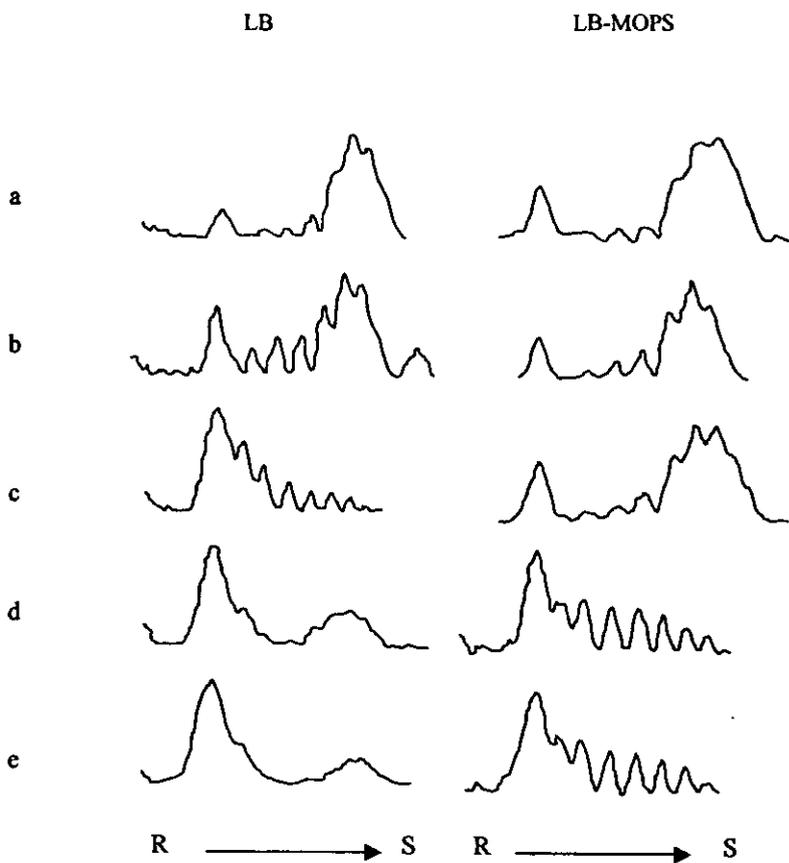


Figura 5. Cinética de los cambios en el superenrollamiento de pMSO1 en medio LB y LB-MOPS 40 mM. Las letras de los carriles corresponden a los tiempos marcados en la figura 1. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloroquina. Bajo estas condiciones, los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel. (R) relajado, (S) superenrollado.

Los resultados anteriores muestran que un aumento en el pH externo causa un comportamiento diferente en la cinética de cambios en el SE.

Lo anterior apoya la idea de que las condiciones previas a la fase estacionaria influyen en la regulación de la fisiología mediante un ajuste global del grado de SE.



Densitometría de la distribución de topoisómeros de la figura 2.

a) Determinación del sentido del SE plectonómico del DNA en células en FS.

Con el objetivo de conocer la naturaleza de la segunda población de plásmidos enrollados que se generan a partir de las 12 horas de fase estacionaria en medio LB (figura 2, carril d), se prepararon geles con concentraciones crecientes de cloroquina.

La cloroquina es una molécula plana que se intercala entre las bases del DNA alterando la tensión de la hélice; esto provoca que la molécula gire en el espacio adquiriendo vueltas de manera proporcional a la concentración de cloroquina presente en el medio. El tipo de vueltas que se genera con cloroquina sólo son de tipo positivo, de tal manera que una molécula que esté enrollada negativamente ganará vueltas positivas, lo que se traduce en una relajación de la misma.

Por el contrario, si una molécula está enrollada positivamente y se incuba con altas concentraciones de cloroquina, ésta no se relaja, sino que adquiere más vueltas.

En la figura 6 se muestra que los plásmidos que estaban enrollados en la fase exponencial se van relajando conforme la concentración de cloroquina aumenta, es decir pierden vueltas negativas (carriles correspondientes a la FE).

En los carriles que corresponden a la fase estacionaria la población de plásmidos relajados (FS12) se enrolla a mayores concentraciones de cloroquina y migran más rápido en el gel (FS16 y FS20), mientras que la población superenrollada (FS12) se relaja conforme aumenta la concentración de cloroquina ya que adquieren vueltas positivas (FS16 y FS20).

En la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ de la fase estacionaria (FS30) ya no se observan plásmidos enrollados, todos fueron capaces de ganar vueltas positivas relajándose y migrando más lento en el gel. De los datos anteriores podemos decir que la población de plásmidos enrollados en la fase estacionaria tiene un SE negativo ya que fue posible la relajación de los mismos en geles con cloroquina más concentrada.

Cloroquina
($\mu\text{g/ml}$)

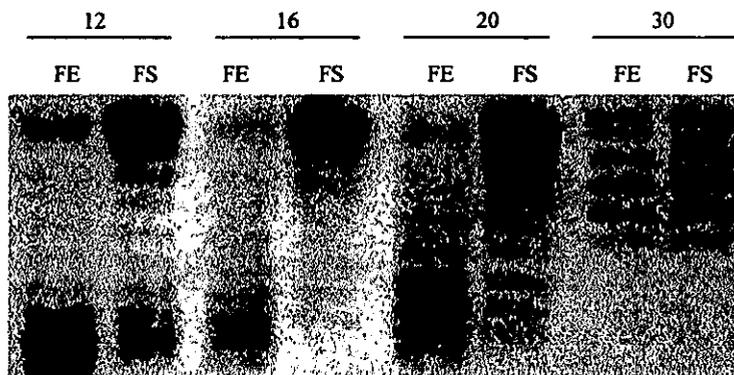


Figura 6. Inversión de la dirección del SE plectonómico debido a la adición de cloroquina. El DNA se purificó de células en fase exponencial (FE) y 18 horas después del inicio de la fase estacionaria (FS) para cada concentración de cloroquina: 12, 16, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

En la concentración de 12 $\mu\text{g/ml}$ los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel, en las concentraciones 16 y 20 $\mu\text{g/ml}$ los plásmidos más enrollados empiezan a perder vueltas y los más relajados a enrollarse positivamente, en 30 $\mu\text{g/ml}$ los topoisómeros más enrollados en la célula migran más lento a través del gel.

II. El SE en la recuperación del crecimiento de células en fase estacionaria.

En un trabajo previo (del Portillo et al. 1987) se estudió el inicio del crecimiento celular y la replicación en células sometidas a estrés nutricional de 24 horas en medio mínimo suplementado con timina, tiamina, glucosa y ácido 2,6-diaminopimélico; bajo estas condiciones se observó que al agregar medio nuevo a los cultivos, el inicio de la replicación ocurría después de una hora y la primera división celular a las dos horas.

A partir de esta observación, pensamos que la recuperación del superenrollamiento debería de darse en un intervalo de tiempo similar, tal que fuera posible llevar a cabo una replicación adecuada del DNA.

Otro grupo (Balke y Gralla, 1987) sometió a las células a un estrés nutricional súbito; en este caso, las células de un cultivo en fase exponencial en una solución del amortiguador MOPS con glucosa al 0.2% y casaminoácidos, se centrifugaron y se resuspendieron en el amortiguador MOPS sin nutrientes. Las células se incubaron en este amortiguador por dos horas. Durante este intervalo de tiempo el nivel del SE del plásmido reportero disminuyó y cuando se adicionaron nutrientes al medio el grado de SE se recuperó en 30 minutos.

Con estos antecedentes, decidimos estudiar el tiempo de recuperación del SE en nuestras condiciones. Se indujo, entonces, la salida de la FS adicionando medio fresco a los cultivos en medios LB y LB-MOPS y se obtuvo la distribución de topoisómeros para diferentes tiempos después del inicio de la recuperación.

En la figura 7 se observa que en el medio LB no se da una recuperación completa del SE aún después de 80 minutos de agregar nutrientes al cultivo (RE80), además se observan todavía plásmidos relajados y la población de plásmidos superenrollados se hace más notoria conforme pasa el tiempo de recuperación (RE, carriles 20, 40 y 80). En medio LB-MOPS la recuperación del SE es muy rápida, 30 segundos (RE, carril 0.5).

Las diferencias en el tiempo de recuperación del nivel de SE en estas condiciones son significativas, lo que sugiere que la suma del estrés que representa un aumento en el pH externo influye de manera importante en este parámetro.

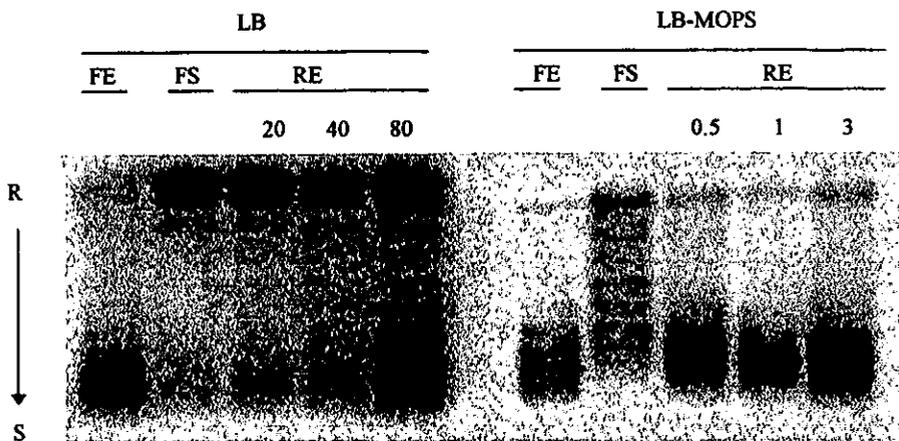


Figura 7. Distribución de topoisómeros de pMS01 en diferentes fases de crecimiento. (FE) fase exponencial, (FS) 18 horas de fase estacionaria. Para la recuperación del crecimiento (RE), un cultivo de 18 horas de FS se diluyó 1:10 en medio LB y se obtuvo la distribución de topoisómeros en los tiempos indicados: 20, 40 y 80 minutos para medio LB y 0.5, 1 y 3 minutos para LB-MOPS.

Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 12 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina. Bajo estas condiciones los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel. (R) relajado, (S) superenrollado.

III. Efecto de la novobiocina en el SE al salir de la fase estacionaria.

Después de observar la rápida recuperación del nivel de SE en medio LB-MOPS nos preguntamos si la girasa estaba implicada en este hecho, por lo cual se inhibió directamente la actividad de esta enzima. El inhibidor utilizado fue novobiocina, un antibiótico que se une a la subunidad B de girasa, impidiendo comenzar un nuevo ciclo de introducción de supervueltas.

Un cultivo de fase estacionaria se incubó durante 10 minutos con novobiocina para asegurar que todas las girasas estuvieran inhibidas al adicionar medio fresco suplementado con el inhibidor.

En la figura 8 notamos que en los carriles correspondientes a la fase estacionaria se presenta una mayor relajación de los plásmidos en presencia de novobiocina (FS, carril +) con respecto al que no tiene inhibidor (FS, carril -). En los carriles del tiempo de recuperación (RE) se observa claramente que en presencia de novobiocina las células no son capaces de enrollar nuevamente sus plásmidos (RE, carril +).

Los datos anteriores muestran que girasa es la responsable de la recuperación del SE y sugieren que esta enzima mantiene cierta actividad durante la fase estacionaria, ya que en presencia del inhibidor los plásmidos de FS se relajan aun más.

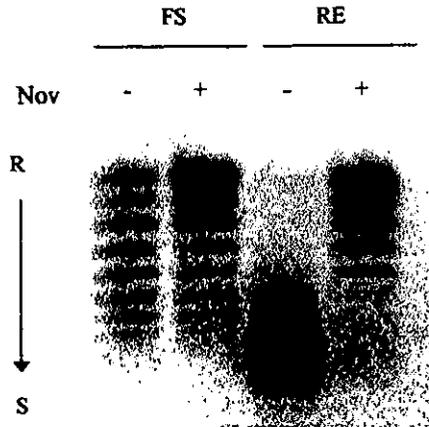


Figura 8. Efecto de la novobiocina (Nov) en la recuperación del SE. Las células de 18 horas de fase estacionaria en LB-MOPS se incubaron durante 10 minutos con novobiocina 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se diluyeron 1:10 en medio fresco a la misma concentración del inhibidor. (FS) fase estacionaria, (RE) un minuto de recuperación. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloroquina. Bajo estas condiciones los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel. (R) relajado, (S) superenrollado.

IV. Efecto de la inhibición de la transcripción y de la traducción en el SE durante la recuperación del crecimiento.

En un trabajo anterior (Albertson et al. 1990 a) se reportó que en células de *Vibrio sp* que se incuban por 24 horas en un medio sin nutrientes, la vida promedio de la poza total de mRNAs aumenta 6 veces. Estos autores sugieren que la estabilización de los mensajeros es un mecanismo celular para economizar energía en la síntesis de proteínas esenciales en condiciones de ayuno total de nutrientes. En estas condiciones la energía se emplea en la traducción de los mensajeros estables y debido al aumento en la estabilidad de éstos es posible transcribir menos y traducirlos más veces.

En el medio LB-MOPS, donde la recuperación del SE es muy rápida, nos preguntamos si este hecho podía ser debido a la presencia de mRNAs disponibles para ser traducidos.

Para contestar esta pregunta se realizaron ensayos de inhibición de síntesis de mRNA y de proteínas.

a) Inhibición de la transcripción.

Como inhibidor se utilizó rifampicina (Rif). Este antibiótico es una molécula que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa impidiendo su acción; sin embargo, una vez que la polimerasa se encuentra unida al DNA, la rifampicina es incapaz de inhibirla ya que el sitio de unión queda oculto.

Debido a esto, las células se incubaron con Rif 10 minutos antes de la recuperación para asegurar que todas las polimerasas estuvieran inhibidas al momento de la recuperación.

Como ya se mencionó, las células en FS se vuelven más resistentes a varios tipos de estreses y menos permeables a diversas moléculas. Para verificar si Rif entra a las células en FS e inhibe la transcripción, se determinó la incorporación de [5, 6 ^3H]- Uridina (10 $\mu\text{Ci/ml}$), durante 4 minutos en células en FE, FS y durante la recuperación (RE) en presencia de Rif 300 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de las células en RE, Rif se añadió en la FS 10 minutos antes de añadir medio fresco con Rif a la misma concentración.

En la tabla 3 se muestra que en la fase estacionaria y durante la recuperación del crecimiento Rif inhibe de manera importante la síntesis de RNA, 94% y 88% respectivamente. Esta inhibición es mayor que la observada en la fase exponencial de 67%. Los valores para la FS son aproximados, ya que el número de cuentas por minuto (cpm) que se incorporan en estas células es muy bajo. Este ensayo sirvió también para comparar la síntesis de RNA durante estas fases de crecimiento. Para calcular estos porcentajes, las cpm que incorporan 10^8 células en FE en ausencia de Rif se tomaron como 100%. Los resultados muestran que las células en FS incorporan menos del 1%, mientras que las células en RE incorporan el 5%.

Condiciones	cpm		% inhibición
	-	Rif	
FE	812 357	264 278	67.4
FS	1 508	8.25	94.5
RE	20 177	2 262	88.7

Tabla 3. Inhibición de la transcripción con rifampicina (Rif) en células en diferentes condiciones de crecimiento. La cepa MC4100 se cultivó en medio LB-MOPS hasta la fase de crecimiento indicada. Después se transfirió al mismo medio en presencia del precursor radiactivo [5, 6 ^3H]- Uridina con o sin inhibidor para ser incubadas durante 4 minutos. La determinación de las cuentas por minuto por 10^8 células (cpm) se realizó como se describe en Material y métodos. (FE) fase exponencial, (FS) fase estacionaria, (RE) recuperación del crecimiento

Los datos anteriores indican que Rif entra a las células en FS y que inhibe de manera eficiente la síntesis de RNA. Con este control procedimos a evaluar el efecto de rifampicina en el SE del DNA durante la recuperación del crecimiento.

Las células de 18 horas de FS se incubaron 10 minutos en presencia de Rif antes de agregarles medio fresco con inhibidor a la misma concentración. Se dejó que las células se recuperaran durante cinco minutos y se obtuvo la distribución de topoisómeros.

La figura 9 muestra que durante la FS Rif no afecta el SE del DNA de los plásmidos, ya que la distribución de los topoisómeros es igual en presencia o ausencia del inhibidor. Lo mismo sucede durante la recuperación del crecimiento, los plásmidos se superenrollan en un medio sin inhibidor de igual forma que en presencia de rifampicina (RE, carriles - y +).

De los datos anteriores podemos decir que la síntesis de RNA al salir de la fase estacionaria es prescindible para la recuperación de SE.

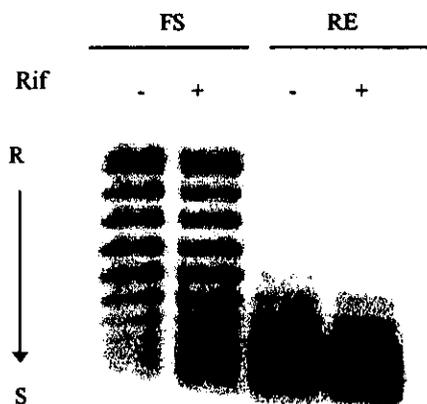


Figura 9. Efecto de la rifampicina (Rif) en la recuperación del superenrollamiento. Las células se crecieron en medio LB-MOPS durante 18 horas de FS. Rif se añadió 10 minutos antes de inducir la recuperación en medio fresco a la misma concentración del inhibidor. (FS) fase estacionaria, (RE) 5 minutos de recuperación. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 12 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina. Bajo estas condiciones los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel. (R) relajado, (S) superenrollado.

b) Inhibición de la traducción.

Para estudiar si la traducción era necesaria para la recuperación del SE se inhibió la síntesis de proteínas al salir de la fase estacionaria.

El inhibidor empleado fue cloramfenicol, una molécula que se une al ribosoma impidiendo la traducción de los mensajeros.

Para esto se siguió el mismo protocolo que para la inhibición de la transcripción, así como el control necesario para evaluar la entrada de cloramfenicol a las células. La concentración de Cm utilizada fue de 200 µg/ml.

En la tabla 4 se muestra que el porcentaje de inhibición en la fase estacionaria fue de 67% y de 61% durante la recuperación del crecimiento, lo cual indica que el cloramfenicol entra a las células e inhibe eficientemente la traducción de mensajeros. Ambos valores son mayores que el porcentaje de inhibición en la fase exponencial que fue del 32%. En comparación con esta última fase se observa también que durante la fase estacionaria se sintetiza solamente el 2% de proteínas y el 21% en la recuperación del crecimiento. Nuevamente, los valores para la FS son aproximados ya que la incorporación de L-[4,5 ³H]-Leucina fue muy baja.

Obteniendo valores satisfactorios de la inhibición de la traducción procedimos a evaluar el efecto del cloramfenicol sobre el SE durante la recuperación del crecimiento.

Condición	cpm		% inhibición
	-	Cm	
FE	10 908	7 365	32.4
FS	248	79	67.8
RE	2361	912	61.37

Tabla 4. Inhibición de la traducción con cloramfenicol (Cm) en células en diferentes condiciones de crecimiento. La cepa MC4100 se cultivó en medio LB-MOPS hasta la fase de crecimiento indicada. Después se transfirió al mismo medio en presencia del precursor radiactivo L-[4,5 ³H]-Leucina con o sin inhibidor para ser incubadas durante 4 minutos. La determinación de las cuentas por minuto por 10⁸ células (cpm) se realizó como se describe en Material y métodos. (FE) fase exponencial, (FS) fase estacionaria, (RE) recuperación del crecimiento

En la figura 10 se observa que el cloramfenicol no afecta al SE durante la fase estacionaria, la distribución de los topoisómeros es igual en presencia o ausencia de la molécula (FS, carriles - y +). Durante la recuperación del crecimiento cloramfenicol tampoco ejerce ningún efecto ya que los plásmidos son enrollados en presencia o ausencia del inhibidor (RE, carriles - y +).

Los datos anteriores muestran que la síntesis de proteínas no es importante para la recuperación del SE.

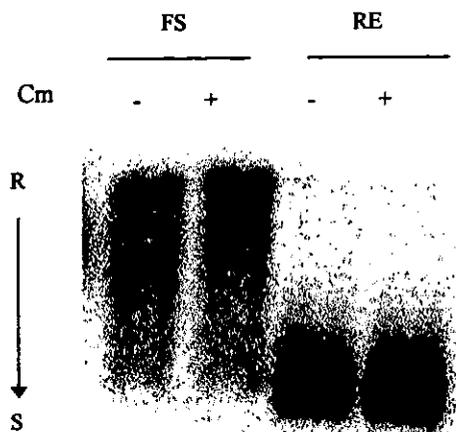


Figura 7. Efecto del cloramfenicol (Cm) en la recuperación del superenrollamiento. Las células se crecieron en medio LB-MOPS durante 18 horas de FS. Cm se añadió 10 minutos antes de inducir la recuperación en medio fresco a la misma concentración del inhibidor. (FS) fase estacionaria, (RE) 5 minutos de recuperación. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 12 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina. Bajo estas condiciones los topoisómeros que están más enrollados en la célula migran más rápido a través del gel. (R) relajado, (S) superenrollado.

V. Síntesis de DNA y división celular en la recuperación del crecimiento.

Hasta este momento hemos visto que el grado de SE del DNA es diferente en las dos condiciones de fase estacionaria estudiadas, tanto en la cinética de los cambios del nivel de SE como en los tiempos de recuperación del mismo. En medio LB la distribución de topoisómeros en FS es frecuentemente bimodal y se mantiene así hasta 80 minutos después de la recuperación del crecimiento, mientras que en FS en medio LB-MOPS la distribución muestra una sola población de plásmidos relajados y la recuperación del nivel de SE es muy rápida, 30 segundos.

Debido a esto, nos preguntamos si estas diferencias observadas influían en otros parámetros celulares muy importantes durante la recuperación del crecimiento, como son la replicación del DNA y la división celular. Para responder a esto se estudió el reinicio de la síntesis de DNA y el aumento en el número de células durante la recuperación.

Para determinar el reinicio de la síntesis de DNA, los cultivos se incubaron con [³H]-timidina (10 µCi/ml) desde la FE para marcar uniformemente al DNA.

Después de 18 horas en FS, el cultivo se diluyó en medio fresco con el precursor radiactivo a la misma concentración y periódicamente se determinaron las cpm incorporadas por 10⁸ células. Paralelamente se determinó el número de células viables/ml para conocer el momento de reinicio de la división y por lo tanto del ciclo celular normal.

La figura 11 muestra que la síntesis de DNA en ambas condiciones empieza 30 minutos después de agregar nutrientes a los cultivos LB y LB-MOPS (▲, △). En cuanto a la división celular, ésta se reinicia aproximadamente a los 60 minutos tanto en el cultivo en LB (●) como en MOPS (○). En el caso del cultivo en LB-MOPS se observó una disminución en la incorporación de [³H]-timidina a partir de los 90 minutos. Para verificar si esto es real, es importante realizar más experimentos.

Estos resultados muestran que las células en FS, tanto en medio LB o LB-MOPS, al añadirles nuevamente nutrientes, recuperan la replicación del DNA y el ciclo celular de manera similar. Esto contrasta de manera importante con el tiempo en que se recupera el nivel de SE en estos cultivos: más de 80 minutos en LB y 30 segundos en LB-MOPS.

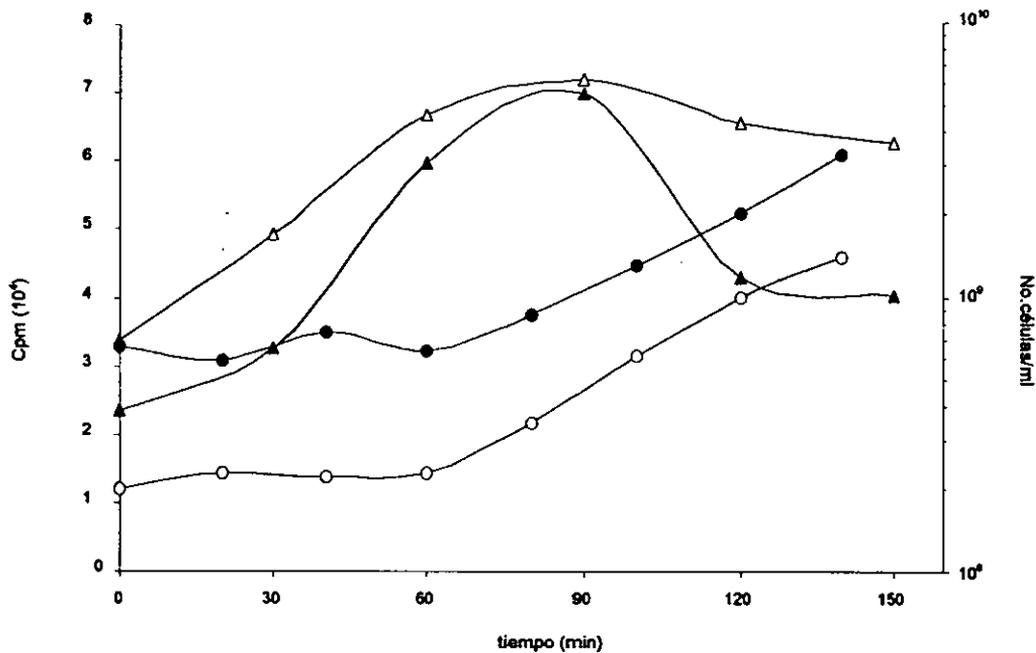


Figura 11. Inicio de la síntesis de DNA y de la división celular durante la recuperación del crecimiento. Células de 18 horas en fase estacionaria se diluyeron 1:10 en medio LB fresco. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas para contar el número de células. Para estudiar la síntesis de DNA, un cultivo de 18 horas de FS que crecía con [³H]-timidina 10 μCi/ml se diluyó 1:10 en medio LB fresco con la misma concentración del precursor radiactivo. Las cuentas viables y la determinación de las cuentas por minuto (cpm) se realizó como se describe en Material y métodos. (○, ●) número de células, (△, ▲) cuentas por minuto de la incorporación de [³H]-timidina. LB, símbolos abiertos; LB-MOPS símbolos llenos.

Discusión

La homeostasis del nivel de SE del DNA en *E. coli* está controlada principalmente por la acción de la topoisomerasas I y de la girasa; el balance de sus actividades debe ser tal que permita realizar adecuadamente el metabolismo del DNA.

Se sabe que el nivel de SE cambia en respuesta a diversos estímulos del medio como son: un aumento en la temperatura, incremento de la osmolaridad, condiciones de crecimiento anaerobio y durante estrés por falta de nutrientes; en todos estos casos cambia la expresión de los genes que son sensibles al SE.

La FS se caracteriza por la ausencia de uno o más nutrientes en el medio, lo que provoca un arresto en el crecimiento celular. Durante esta fase, el nivel de SE de un plásmido reportero disminuye.

El interés de este trabajo se centró en estudiar el nivel de SE del DNA en células en FS y al salir de esta fase al añadir nuevamente nutrientes. Este estudio tiene la finalidad de avanzar en el conocimiento del papel de girasa en la regulación del nivel de SE en células en estrés nutricional.

El nivel de SE se estudió en un plásmido reportero en células que se cultivaron en medio rico LB con y sin el amortiguador MOPS. En el medio LB el pH de la FS se incrementa hasta 9, mientras que en LB-MOPS se mantiene en 7.

Los resultados que se presentan aquí muestran que la relajación del DNA en FS y la recuperación del nivel normal de SE al reiniciar el crecimiento, son diferentes en células bajo estrés por falta de nutrientes y en células que además están en pH alcalino.

En medio LB-MOPS se observó que los plásmidos se relajan homogéneamente (Fig 5. LB-MOPS, carriles a-e), mientras que en LB la cinética de los cambios de SE mostró primero una relajación y más tarde el SE de aproximadamente el 30% de la población haciéndose evidente una distribución bimodal de topoisómeros al cabo de 18 horas en FS (Fig 5. LB-carril e).

En un trabajo previo (Balke y Gralla, 1987) se observó que después de incubar con DNP células en FS e inducir la recuperación del crecimiento, por medio de la adición de glucosa al medio, el SE de plásmidos reporteros no se recupera. A partir de este ensayo se concluye que el efecto de los niveles de ATP en la disminución de la actividad de girasa sólo es significativo en el caso de una FS prolongada (15 horas después de un estrés súbito de nutrientes).

En nuestros ensayos en medio LB-MOPS, la relajación de los plásmidos puede atribuirse a una disminución en la actividad de girasa debida a la falta de ATP, ya que el tiempo que las células permanecieron en FS fué de 18 horas.

En trabajos diferentes se ha reportado una distribución bimodal de topoisómeros bajo diferentes condiciones. Los autores antes mencionados (Balke y Gralla, 1987) observaron la generación de plásmidos superenrollados después de 15 horas en FS. Las condiciones bajo las cuales observaron esto fue mediante la forma de pérdida súbita de nutrientes al centrifugar las células que crecían en medio MOPS suplementado con glucosa y casaminoácidos, para dejarlas sólo en MOPS durante 15 horas. Estos autores proponen que tal fenómeno puede ocurrir dentro de una misma célula ya que el cromosoma bacteriano tiene ciertas zonas de superenrollamiento restringido, las cuales podrían comportarse diferente al resto del mismo.

Sin embargo, si esto fuera cierto para nuestras condiciones experimentales, lo que se observaría sería un relajamiento homogéneo que no llega a un máximo de relajación; además, el superenrollamiento lo estudiamos en un plásmido reportero, el cual tiene sólo un dominio topológico (Lockshon et al.1983) al contrario del cromosoma completo que tiene aproximadamente 43.

La generación de esta distribución bimodal de topoisómeros, tanto el reportado por este grupo como el observado por nosotros, no se presenta en todos los experimentos. En nuestro caso, de 21 experimentos realizados esta distribución se observó en 14 (66%). Sin embargo, durante el reinicio del crecimiento la distribución es evidente en todos los experimentos.

No podemos atribuir la generación de esta distribución bimodal al agotamiento lento de nutrientes debido a que el grupo de Balke y Gralla observa este fenómeno cuando las

células son sometidas a un estrés súbito. Una vez que las células llegaron a la FE fueron centrifugadas y transferidas a una solución de MOPS sin nutrientes.

Otro grupo (Schneider et al. 1997) observó también una distribución bimodal de topoisómeros en células que crecían en un medio rico (16 g/l triptona, 10 g/extracto de levadura y 5 g/l NaCl). Este grupo reporta que después de 20 horas en FS, las células presentan plásmidos de superenrollamiento intermedio que representan el 80% de la población y el resto es de alto SE.

Este fenómeno sólo se presenta en células que expresan Fis, indicando que la unión de esta proteína al DNA es necesaria. En células *fis* la población intermedia aparece sólo después de periodos prolongados en FS.

A pesar del bajo número de moléculas de Fis durante la FS, se sugiere que su actividad reguladora en la dinámica cromosómica esta dada por su actividad indirecta, ya que esta proteína es un regulador transcripcional de *hupA/hupB* y de los promotores de *hns*.

Sin embargo, los productos de estos genes HU y H-NS son proteínas del nucleóide que tampoco son tan abundantes en la FS, ya que durante esta fase casi todo el cromosoma queda cubierto por Dps (Ishihama, 1999).

Un último grupo (Lockshon y Morris, 1983) observó la generación de una segunda población de plásmidos enrollados positivamente después de 10 minutos de la adición de novobiocina a células hipersensibles a este antibiótico. Este grupo explica este fenómeno como el resultado directo de la inhibición de la actividad de girasa, ya que primero se relajan zonas de DNA por las que girasa tiene afinidad y después introduce las vueltas positivas. El mecanismo que explica este efecto paradójico del antibiótico en estas células no se conoce, ya que en células normales la novobiocina produce una relajación del DNA.

En nuestro caso, mostramos por medio de los ensayos con cloroquina, que el SE de la segunda población de plásmidos es de tipo negativo y no se trata entonces, de un tipo de SE anómalo; sin embargo, desconocemos si esta población se encuentra dentro de una misma célula o bien existen células que tienen todos sus plásmidos relajados y otras que por alguna razón pueden enrollarlos después de 6 horas en FS.

Existe el reporte de que en FS en medio rico, aparecen en la población celular mutantes llamadas 'gasp' (*growth advantage stationary phase*) las cuales debido a un corrimiento del marco de lectura durante la transcripción de *rpoS* producen una duplicación de los últimos 46 pb. Esta modificación produce una proteína con 39 aminoácidos más hacia el extremo carboxilo terminal. Las células con estas mutaciones son capaces de utilizar los aminoácidos expelidos por las células que van muriendo, por lo que pueden iniciar su crecimiento y división en esta fase, al contrario de las células silvestres (Zinser y Kolter, 1999).

Sin embargo estas mutantes aparecen después de diez días de FS (Zambrano et al. 1993) razón por la cual descartamos que se trate de ellas, ya que el tiempo de aparición y la cantidad de células no corresponde con el porcentaje de plásmidos enrollados que observamos.

Aún no tenemos ninguna explicación para la generación de plásmidos superenrollados durante la FS; sin embargo, los resultados mostrados apoyan la idea de que los cambios en el nivel de SE son dependientes de las condiciones del medio. Posiblemente estos cambios en el SE contribuyan a modular la expresión de algunos genes que se expresan en estas condiciones.

Durante la FS la composición de las proteínas del nucleóide cambia considerablemente, así como también el SE de plásmidos reporteros. Esto nos hizo pensar que al salir de esta fase, las células deben adquirir un nivel de SE propio de la fase de crecimiento exponencial, para que por consecuencia realicen eficientemente las actividades de su nuevo ciclo de crecimiento.

Es por eso que estudiamos la recuperación del nivel de SE en células que reinician el crecimiento.

Los grupos antes mencionados y nosotros observamos una desaparición de las formas más relajadas y la acumulación de especies superenrolladas al agregar nuevamente nutrientes a las células en FS. No obstante, en nuestra condición de pH alto observamos un fenómeno que no se había reportado antes: la distribución bimodal de topoisómeros se mantiene incluso después de 80 minutos de haber agregado medio fresco a los cultivos. Aunque la población de plásmidos superenrollados se va enriqueciendo conforme pasa el

tiempo de recuperación, la distribución de topoisómeros no asemeja a la observada durante la FE.

Sabemos también que los plásmidos que no recuperan supervueltas durante el reinicio del crecimiento no son moléculas lineares, ya que fue posible, en los experimentos de cloroquina, introducir supervueltas positivas en los mismos.

Desconocemos las causas por las cuales en estas condiciones el SE no se recupera, lo que si podemos descartar es que se deba a que las células estén entrando nuevamente a la FS relajándose otra vez. Esto se observó en un ensayo de la cinética de SE durante las dos horas siguientes a la recuperación del crecimiento de las células en LB-MOPS. En estas células en las que la recuperación del SE es muy rápida (30 segundos) se observó que el SE se mantiene estable hasta por dos horas sin que se presente la relajación característica de la entrada a la FS (dato no mostrado).

Un argumento para explicar por qué incluso después de periodos largos de tiempo estas células no pueden enrollar nuevamente sus plásmidos es la siguiente: ya que *E. coli* es una bacteria neutrofilica y su capacidad para regular el pH interno es de 5 a 8, pensamos que las células sometidas a pH alto adquieren un comportamiento anómalo del potencial de membrana, de tal forma que el gradiente electroquímico para llevar a cabo la fosforilación oxidativa se pierde. Por consecuencia la actividad de girasa que es dependiente de ATP puede tardar más tiempo en recuperarse.

Sin embargo, es posible que intervengan otros factores ya que en la recuperación del crecimiento se espera que el ATP se incremente rápido (Balke y Gralla, 1987).

Al transferir las células de FS en medio LB a un medio nuevo LB-MOPS con el fin de observar si ocurría la neutralización del pH y el SE se recuperaba de manera normal, se observó que aún amortiguando el pH, los plásmidos no se enrollan. Esto podría indicar que al cabo de 18 horas en FS con pH alcalino las células han estado expuestas a condiciones de estrés prolongado que les impiden regular de manera eficiente el SE al reiniciar el crecimiento (dato no mostrado).

En el caso del medio LB-MOPS, se observó una recuperación del nivel de SE muy rápida, 30 segundos. En este caso, se decidió estudiar si la recuperación era dependiente de la síntesis *de novo* de mRNAs o de proteínas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la transcripción mostraron que la transcripción *de novo* no parece ser necesaria para recuperar el nivel de SE; entonces pensamos que tal vez existían mensajeros que se traducirían de inmediato al agregar nutrientes al cultivo, pero esto tampoco es cierto, ya que la inhibición de la traducción tampoco modificó la rápida recuperación del SE.

Los ensayos anteriores mostraron que la transcripción y la traducción no son necesarias para la recuperación del SE, lo que hacía sospechar que la proteína girasa no se degrada como muchas otras durante la FS. Para probar esto inhibimos directamente la actividad de girasa con novobiocina, ensayo en el cual se observó que la recuperación del SE no se lleva a cabo en presencia del inhibidor.

Lo anterior sugiere fuertemente que en ausencia de un estrés adicional a la falta de nutrientes, la estrategia que lleva a cabo la célula con respecto a la regulación de la expresión de girasa es mantenerla sintetizada durante el tiempo que dura la FS inhibiendo casi totalmente su actividad.

Es posible que durante la FS la relación de las concentraciones de ATP/ADP sean tales que no favorezcan la actividad de la girasa. En un trabajo previo (amacho-Carranza et al, 1995; Castro, 1998) se observó que después de un choque calórico la relación [ATP]/[ADP] se incrementa en la célula y es seguida de un aumento en el nivel de SE de un plásmido reportero.

Groat et al. 1986, estudiaron la cinética de síntesis de proteínas al inicio de la FS. Estos autores reportan que durante un ayuno por glucosa hay cuatro cambios en el patrón de síntesis de proteínas. El tiempo más largo que se estudió fue de 180 minutos, en el cual todavía observan la síntesis de al menos 7 proteínas nuevas.

En nuestro caso, después de 18 horas en FS observamos una síntesis residual de RNA y de proteínas que puede inhibirse con rifampicina y cloramfenicol respectivamente. Esto aunado al reporte anterior, indica que durante la FS se genera por lo menos una cantidad de

energía limitada para llevar a cabo ciertas funciones. De ahí que es lógico pensar que girasa tenga cierta actividad basal durante esta fase, ya que algunos genes se transcriben y durante la transcripción se generan supervueltas positivas hacia delante de la RNA polimerasa y negativas hacia atrás, lo que requiere la actividad de la girasa para reestablecer el nivel de SE (Lewin, 1997)

Probablemente la baja actividad de girasa en la FS sea producto de la cantidad limitada de ATP y también por la presencia de un inhibidor específico como GyfI.

Es posible que durante la FS girasa no se degrade como otras proteínas, o bien que su degradación sea menor de manera que pueda tener cierta actividad durante esta fase.

Otros datos (no mostrados) que apoyan esta idea es que durante la incubación con 0.4% de etanol por diez minutos en la FS, se aprecia un ligero enrollamiento de los plásmidos, lo que podría interpretarse como la generación de ATP a partir de una fuente de carbono alterna que se puede degradar en esta fase de crecimiento. Además novobiocina induce un incremento en la relajación de los plásmidos en la FS (Fig 8, FS-carril-).

Schneider et al 1999, mostraron que la proteína Fis, la cual se incrementa de manera importante durante la recuperación del crecimiento, reprime la transcripción de los genes *gyr* reduciendo la actividad de girasa. De modo que durante los primeros minutos de la recuperación del crecimiento, el enrollamiento de los plásmidos probablemente es debido a la actividad de las girasas que no se sintetizan *de novo*.

Finalmente, observando las diferencias en los tiempos de recuperación de SE en los dos tipos de condiciones de FS pensamos que aquellas células sometidas a un estrés adicional de pH, mismas que no pueden recuperar su SE en un tiempo corto, tendrían problemas también para iniciar la replicación de su DNA y por consiguiente para dividirse.

Del Portillo y colaboradores (1987) estudiaron el inicio de la replicación después de 24 horas de FS en células que crecían en medio mínimo suplementado con ácido 2,6-mesodiaminopimélico, timina, tiamina, glucosa y aminoácidos. Bajo estas condiciones observaron que la síntesis de DNA empieza a los 60 minutos y la división celular a los 90 minutos después de agregar nutrientes al medio.

En otro ensayo en el que se agregó el antibiótico ácido nalidíxico a diferentes tiempos después de la recuperación, se observó que la síntesis de DNA se detiene y las células no se dividen, por lo que se concluye que completar un ciclo de replicación es necesario para la primera división en células que reinician el crecimiento.

Nuestros resultados del inicio de la replicación celular, así como de la primera división celular mostraron tiempos menores a los reportados por del Portillo et al (30 y 60 minutos respectivamente). Esto puede atribuirse a la diferencia en los medios de cultivo, LB y medio mínimo respectivamente.

Al contrario de lo esperado, observamos que la replicación celular y la división celular en las células sometidas a un aumento de pH se llevan a cabo en los mismos tiempos que en las células con pH constante. Esto podría sugerir que el SE es un parámetro que en estas condiciones no influye en la replicación ni en la división celular, ya que estas funciones se realizan independientemente del nivel de SE del plásmido. Sin embargo, no podemos extrapolar el comportamiento del nivel de SE del plásmido al cromosoma completo.

Con esto surge la pregunta de cómo puede replicarse el DNA si, al menos a través de un plásmido reportero, no se verifica actividad de girasa, ya que tanto en condiciones normales, fase exponencial, como a la salida de la FS la inhibición de la girasa resulta en un arresto de la replicación del DNA.

Una posible explicación es que al salir de la FS el nucleóide module su SE de manera diferente sólo para completar el primer ciclo de replicación y que la abundancia de las proteínas Dps en la FS y el incremento súbito de Fis al salir de la FS ayuden a regular la estructura del nucleóide.

Por su parte, el crecimiento celular durante la FE y a la entrada de la FS tampoco se ve afectado por el incremento en el pH y sin embargo la cinética de los cambios en el nivel de SE es diferente en las dos condiciones estudiadas.

En cuanto a los ensayos del marcaje radioactivo de RNA y proteína observamos, al igual que el grupo de Albertson et al. 1990 b, que la síntesis de proteína decae en esta fase.

Este grupo reportó que al inicio de la FS en *Vibrio* sp. la síntesis de proteínas se reduce en un 20% con respecto a la FE, nosotros observamos en *E. coli* que después de 18 horas en FS la síntesis de proteínas es el 2%, mientras que la síntesis de RNA disminuye al 0.5%. Esto puede indicar que la vida media de los mensajeros se incrementa ya que comparativamente hay mayor síntesis de proteínas que de RNA, esto también se observa en la recuperación, durante la cual la síntesis de RNA aumenta al 5 % mientras que la de proteínas se incrementa 21 %.

Los porcentajes de incorporación de uracilo y leucina radiactivos que reportamos en este trabajo son aproximados, esto es debido al bajo número de cpm que se observaron en algunas condiciones. Para tener porcentajes más precisos es necesario realizar más experimentos.

En los experimentos de marcaje de DNA se observa una disminución de la incorporación de timidina radiactiva después de 90 minutos de recuperación (Fig 11). Esta disminución no coincide con un incremento en el número de células, por lo que no se puede decir que sea debido a una dilución de la marca. No tenemos explicación para este fenómeno por lo que es necesario llevar a cabo más experimentos.

Hasta aquí, hemos mostrado que la regulación de girasa en la FS se ve afectada por un incremento en el pH del medio, esto da como consecuencia que el nivel de SE del DNA sea diferente a lo largo de esta fase y durante el reinicio del crecimiento.

Sin embargo el nivel de SE no afecta en funciones celulares como la replicación del DNA y la división celular.

Este trabajo es la parte inicial de un proyecto más grande en el que el objetivo es conocer a fondo el papel de la girasa durante el estrés por falta de nutrientes y saber cómo es la regulación de los genes de girasa durante esta fase.

CONCLUSIONES

- El pH del medio de cultivo en la FS es importante en la distribución de topoisómeros del plásmido reportero. A pH 7, el nivel de SE de todas las subpoblaciones de plásmido disminuye homogéneamente; sin embargo, a pH 9 se genera una distribución bimodal con plásmidos relajados y plásmidos superenrollados.
- El tipo de superenrollamiento de la segunda población de plásmidos que se genera en FS en medio LB es de tipo negativo.
- La recuperación del nivel de SE al añadir nutrientes a las células en FS es muy rápido (30 segundos) en las células a pH 7 y muy lento (más de 80 minutos) en células a pH 9.
- La transcripción y la traducción no son necesarias para recuperar el nivel de SE en células que reinician el crecimiento
- En las células en FS a pH 7, la girasa no se degrada como otras proteínas y su actividad se recupera rápidamente al añadir nutrientes al medio.
- El inicio de la replicación del DNA en células que reinician el crecimiento comienza 30 minutos después de agregar nutrientes al medio, mientras que la división celular se da 60 minutos después, independientemente del pH del medio.
- La recuperación del nivel de SE no se correlaciona con el inicio de la replicación ni con la división celular en células que reinician el crecimiento.

Perspectivas

Actualmente se están realizando en el laboratorio cuantificaciones de la actividad de β -galactosidasa en fusiones transcripcionales $\Phi_{gyrA-lac-Z}$ y $\Phi_{gyrB-lacZ}$ con el objetivo de conocer más a fondo la regulación de estos genes en la entrada y salida de la fase estacionaria.

Se realizarán también experimentos tipo Western blot, los cuales permitirán cuantificar la cantidad de las proteínas GyrA y GyrB en diferentes puntos de la FS y en el reinicio del crecimiento celular.

En cuanto a la pregunta respecto a las dos poblaciones de plásmidos en medio LB se propone llevar a cabo un ensayo utilizando un gene que codifique la resistencia para un antibiótico y cuya expresión sea dependiente del nivel de SE. En este experimento será posible observar diferencias en el crecimiento celular que podrían ser atribuidas al nivel de SE del plásmido.

Apéndice

Medios de cultivo y soluciones.

El medio de cultivo se esterilizó en el autoclave a 110°C y 115 libras de presión durante 25 minutos.

La solución de carbecín se esterilizó con un filtro Millipore HA 0.45 μm y se adicionó al medio LB estéril cuando su temperatura disminuyó a 50°C.

La solución MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico) se esterilizó en el autoclave al igual que el medio LB.

El medio sólido se vació en cajas Petri y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Medio Luria Bertani (LB)

1. Líquido

Extracto de levadura (Difco)	5g/L
Triptona (Difco)	10g/L
NaCl (Baker)	10g/l
Timina	20 $\mu\text{g/ml}$
pH	7

Para preparar medio LB-MOPS, al medio LB líquido se le adicionó el amortiguador MOPS a una concentración final de 40 mM.

2. Sólido. El medio LB sólido se prepara igual que el líquido pero se adiciona 2% de Bacto-agar (Difco).

Medio TSS 2X.

NaCl (Baker) 1%

Triptona (Difco) 1 %

Extracto de levadura (Difco) 0.5%

MgCl₂ (Merck) 50 mM

Polietilenglicol, PEG, 8000 (Sigma) 20%

Dimetil sulfóxido , DMSO (Merck) 10%

pH final 6.5

Medio de dilución.

Sulfato de magnesio 10 mM

Solución I.

Dextrosa (Baker) 50 mM

Etilen-diamin-tetraacetato de sodio

EDTA (pH 8) 10mM

Tris (Sigma) (pH 8)

Lisozima (Sigma) 25mM

Solución II.

Dodecil sulfato de sodio, SDS

(Sigma) 1%

NaOH (Baker) 0.2N

Solución III .

Acetato de potasio (Baker) 3M

Acido acético glacial (Baker) 11.5%

pH final 5.6

Colorante para DNA (6 X)

EDTA 1mM

Azul de bromofenol 0.25%

Xilen cianol 0.25%

Glicerol 30%

Solución amortiguadora TBE 1X

Trizma 90 mM

Acido bórico 90 mM

EDTA 10 mM

PH final 8.3

Solución de centelleo.

1 litro de tolueno

PPO (2,5-difeniloxazol) 8g/l

POPOP (2,2'-p-fenilenbis (5-feniloxazol) 0.1g/l

Moléculas radioactivas.

[5,6 ³H]- Uridina . AE= 1.33 TBq/mmol (Amersham).

L-[4,5 ³H]-Leucina . AE= 5.22 TBq/mmol (Amersham).

[metil-³H]-Timidina. AE= 3.11 TBq/mmol (Amersham).

Bibliografía.

ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO DEBE
BIBLIOTECA

Almirón, M., Link, A., Furlong, D., and R. Kolter. 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6:2646-2654.

Albertson, N., Nystrom. T., and S. Kjelleberg. 1990 a. Functional mRNA half-lives in the marine *Vibrio sp.* S14 during starvation and recovery. *J. Genet Microbiol.* 136: 2195-2199.

Albertson, N., Nystrom. T., and S. Kjelleberg. 1990 b. Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio sp.* S14 from starvation. *J. Genet. Microbiol.* 136: 2201-2207.

Altuvia, S., Almirón, M., Huisman, G., Kolter, R., and G. Storz. 1994. The *dps* is activated by OxyR during growth and by IHF and σ^3 in stationary phase. *Mol Microbiol.* 13: 265-272.

Akira, N., Tadahiro, O., Tadahiro, M., Shinobu, I., and T. Ohnuki. 1998. Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 273: 1933-1938.

Balke, V., and J. Gralla. 1987. Changes in linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 4499-4506.

Barth M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D., and R. Hengge-Aronis. 1995. Role of histone like protein H-NS in growth phase dependent and osmotic regulation of σ^3 and many σ^3 -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 3455-3464.

Becker, G., Klauck, E., and R. Hengge-Aronis. 1999. Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6439-6444.

Berger James. 1998. Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Bioph. Acta.* 1400: 3-18.

Berger, J, M., Gamblin, S, J., Harrison, S, C., and J. Wang. 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature.* 379: 225-232.

Bohringer, J., Fischer, D., Mosle, G., and R. Hengge-Aronis. 1995. UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of σ^3 and σ^5 -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 413-422.

Booth Ian. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 359-378.

Camacho-Carranza, R., Membrillo-Hernández, J., Ramírez-Santos, J., Castro-Dorantes, J., Chagoya, V., and M. Carmen Gómez-Eichelmann. 1995. Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 177: 3619-3622.

Cashel, M., Gentry, D., Hernández, V., and D. Vinella. 1996. The stringent response. In: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. Ed. Frederick Neidhardt. ASM Press. Washington, D.C.

Castro-Dorantes J. 1998. Síntesis de la DNA girasa y relación [ATP]/[ADP] durante la respuesta a estrés por calor en *Escherichia coli* K-12. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.

Chung, C., Suzanne, L., and R. Miller. 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2172-2175.

Confalonieri, F., Elie, C., Nadal, M., Bouthier, C., Forterre, P., and M. Dugeuet. 1993. Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Biochem.* 90: 4753-4747.

Del Portillo, G, F., Pisabarro, A., de la Rosa, E., and M. A de Pedro. 1987. Modulation of cell wall synthesis by DNA replication in *Escherichia coli* during initiation of cell growth. *J. Bacteriol.* 169: 2410-2416.

Dersch, P., Schmidt, K., and E. Bremer. 1993. Synthesis of the *Escherichia coli* K12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subject to growth phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* 8: 875-889.

Dorman, C., Barr, G., Bhriain, N., and C. Higgins. 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* 170:2816-2826.

Drlica K. 1984. Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol. Revs.* 48: 273-289.

Farewell, A., Kvint, K., and T. Nystrom. 1998. Negative regulation by *rpoS*: a case of sigma factor competition. *Mol. Microbiol.* 29: 1039-1051.

Forterre, P., and C. Elie. 1993. Chromosome structure, DNA topoisomerases, and DNA polymerases in archeobacteria (archaea). *New comprehensive biochemistry*. In Press.

Gaal, T., Ross, W., Estrem, S., Nguyen, L., Burgess, R., and R. Gourse. 1999. σ^{54} recognizes the same promoter elements as σ^{70} : promoter specificity is determined by differential tolerance for suboptimal sequences in the RNAP recognition elements. The Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting, August 3-8. Univ. of Wisconsin-Madison. USA.

Gene, G., Shultz, J., Zychlinsky, E., Bockman, A., and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168: 486-493.

Goodrich, H., Uría-Nickelsen, M and R. Kolter. 1996. Regulation of gene expression in stationary phase. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. E. C. C. Lin and Lynch, A. S. Chapman and Hall. R. G. Landes Company. NY. 27: 571-580.

Gómez-Eichelmann, M.C., and R. Camacho-Carranza. 1995 a. El nucleóide bacteriano. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 37: 281-290.

Gómez-Eichelmann, M.C., and R. Camacho-Carranza. 1995 b. Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 37: 291-304.

Groat, G., Schultz, E., Zychlinsky, A., Bockman, A., and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168: 486-493.

Hengge-Aronis, R. 1996. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and molecular biology. Ed. Frederick Neidhardt. ASM Press. Washington, D: C.

Higgins, C., Dorman, C., Stirling, D., Waddell, L., Booth, I., May, G., and E. Bremer. 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell.* 52:569-84.

Hsieh T. S. 1992. DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Cell. Biol.*4: 396-400.

Ishihama A. 1997. Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 1-13.

Ishihama A. 1999. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes to cell.* 4: 135-143.

Jenkins, D., Schultz, J., and A. Matin . 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂ O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 3910-3914.

Kolter R, Siegele, D., and A. Tormo. 1993. The stationary phase of the bacterial cell cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-874.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1991 a. Growth phase regulates expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ^S . *J. Bacteriol.* 173: 4474-4481.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1991 b. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 5: 49-59.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1994 a. The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Gen. Dev.* 8: 1600-1612.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1994 b. The *nlpD* gene is located in a operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* 13: 733-743.

Lazar, S., Almiron, M., Tormo, A., and R. Kolter. 1998. Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* 180: 5704-5711.

León, P., Alvarez, F., Díaz, L., and M. C. Gómez Eichelmann. 1988. Effect of DNA supercoiling and catabolite repression on the expression of the *tetA* genes in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 34: 839-842.

Lewin, B. 1997. *Genes VI.* Oxford University Press. Pags 308-309 y 748.

Lodish., Baltimore., Berk., Zipursky., Matsudaira., and Darnell. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule.* DeBoeck Université.

Lockshon, D, and D. Morris. 1983. Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA girase inhibitors. *Nucleic Ac. Res.* 10:2999-3017.

Lowen, P., Hu, B., Struntinsky, J., and R. Sparling. 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 44: 707-717.

Maniatis, T., Fritschi, E., and J. Sambrook. 1982. Alkaline lysis method. In: *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. N Y.

Muffler, A., Traulsen, D., Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1996. Post-transcriptional osmotic regulation of the σ^s subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 1607-1613.

Newman, E., Lin, R., and R. D'ari. 1996. The leucine/Lrp regulon. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*. Ed. Frederick Neidhardt. ASM Press. Washington, D. C.

Olsen, A., Jousson, A., and S. Normark. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 338:652-5

Pisabarro, A., de Pedro, M., and D. Vázquez. 1985. Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *J. Bacteriol.* 161: 238-242.

Reece, R., and A. Maxwell. 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 335-375.

Schneider, R., Travers, A., and G. Muskhelishvili. 1997. FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 26: 519-530.

Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T and G. Muskhelishvili. 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34: 953-64.

Surette, M., and B. Bassler. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7046-7050.

Takayanagi, Y., Takanaka, K., and H. Takanahashi. 1994. Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 243: 525-531.

Wada, A., Igarashi, K., Yoshimura, S., Aimoto, S., and A. Ishihama. 1995. Ribosome modulation factor: stationary growth phase specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 214: 410-417.

Withers, H., and K. Nordstrom. 1998. Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 15694-15699.

Wolf, S., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S., Kolter, R., and A. Minsky. 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature.* 400: 83-85.

Zambrano, M., Siegele, D., Almirón, M., Tormo, A., and R. Kolter. 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science.* 259: 1757-1760.

Zinser, E., and R. Kolter. 1999. Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J. Bacteriol.* 181: 5800-5807.