



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DEL GENE *gyrI* EN LA
GENERACIÓN DE MUTACIONES DE FASE
ESTACIONARIA EN *Escherichia coli* K12

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
VERÓNICA DE DIOS GARCÍA MATA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS RAMÍREZ SANTOS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2005

m 242956



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: García Mata

Verónica de Dios

FECHA: 10 octubre 2005

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Participación del gene *gyrI* en la generación de mutaciones de fase estacionaria en *Escherichia coli* K12

realizado por García Mata Verónica de Dios

con número de cuenta 400053716, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director Propietario Dr. Jesús Ramírez Santos

Propietario Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann

Propietario M. en C. Beatriz Rodarte Murguía

Suplente M. en IBB Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Suplente Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DEL GENE *gyrI* EN LA GENERACIÓN DE MUTACIONES DE
FASE ESTACIONARIA EN *Escherichia coli* K12

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA
PRESENTA:
VERÓNICA DE DIOS GARCÍA MATA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS RAMÍREZ SANTOS

2005

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann y al Dr. Jesús Ramírez Santos por haberme permitido estar en su laboratorio, por su guía, paciencia y todo lo que me ayudaron a aprender en el tiempo que estuve ahí.

A Miguel Paéz por su apoyo con la elaboración de medios, que si hubiera tenido que prepararlos yo, me hubiera tardado más en acabar la tesis.

Al Lic. en I.B.B. Sebastián Poggio del laboratorio de la Dra. Laura Camarena y al Lic. en I.B.B. Miguel Tapia del laboratorio del Dr. Gabriel Gutiérrez por su ayuda para las fotografías de este trabajo.

A mis padres por haberme apoyado todo este tiempo, a los buenos maestros que tuve en la carrera que me motivaron para interesarme más por la biología y en especial a mis amigos que siempre estuvieron ahí por escucharme y soportarme; ah y también por los largos ratos de plática.

Esta página podría estar llena de nombres de todas las personas agradables que conocí en la UNAM, pero la tesis ya quedó muy larga ...

El punto es que como mi memoria no es muy buena y no quiero dejar a nadie fuera de la lista A-Z abierta para todos los que algún momento estuvieron conmigo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. Carmen Gómez Eichelmann del Departamento de Biología Molecular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Ramírez Santos y fue financiado parcialmente por el proyecto CONACYT No.36984-N

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Fase estacionaria en bacterias.....	5
2. Mutación en fase estacionaria.....	5
2.1. Definición de mutación de fase estacionaria	5
2.2. Modelos de mutación de fase estacionaria en bacterias	7
2.3 Características de la mutación de fase estacionaria en el sistema Lac de <i>Escherichia coli</i>	10
3. La respuesta SOS en <i>Escherichia coli</i>	13
4. Mecanismo de generación de la mutación de fase estacionaria en la cepa de <i>Escherichia coli</i> FC40	16
5. Sobrevivencia <i>versus</i> mantenimiento de la estabilidad genética	22
6. El gen <i>gyrI</i> , la girasa y su interacción entre ambos	23
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Cepas bacterianas y plásmidos	32
2. Métodos de genética bacteriana.....	32
2.1 Construcción de las cepas <i>gyrI</i> (<i>sbmC::kan</i>) y <i>recA::Tn10dcam</i> por transducción generalizada con el fago P1 <i>virA</i>	32
2.1.1 Propagación del fago P1 <i>virA</i>	32
2.1.2 Titulación del fago P1 en <i>Escherichia coli</i>	33
2.1.3 Transducción generalizada con el fago P1 <i>virA</i>	34
2.2 Verificación del fenotipo de las mutantes <i>gyrI</i> (<i>sbmC</i>) y <i>recA</i>	35
2.2.1 Verificación de la morfología de las mutantes <i>gyrI</i>	36
2.3 Verificación del alelo <i>gyrI</i> por medio del ensayo de sensibilidad a microcina B17.....	36
2.4 Verificación del alelo <i>recA</i> por medio del ensayo de sensibilidad a luz ultravioleta (UV) de onda corta.....	38
2.5 Ensayo de mutación de fase estacionaria.....	38
2.5.1 Determinación de la frecuencia de mutación.....	40
2.6 Ensayo de fluctuación.....	41
3. Método de biología molecular	42
3.1 Verificación del genotipo de las cepas mutantes <i>gyrI</i> por medio de la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	42
RESULTADOS	44
1. Verificación del fenotipo de las cepas <i>gyrI</i>	44
1.1 Verificación fenotípica por observación al microscopio	44
1.2 Verificación de la sensibilidad a microcina B17 (MccB17).....	46
2. Verificación genotípica de la mutación <i>gyrI</i> por PCR.....	48

3. Verificación fenotípica del alelo <i>recA</i> ⁻	49
4. La ausencia del gen <i>gyrI</i> incrementa las mutaciones de fase estacionaria.....	50
5. La mutación <i>gyrI</i> no incrementa la frecuencia de mutación de fase estacionaria en Lac cuando el alelo <i>lacIZ33</i> se encuentra en el cromosoma.....	53
6. El incremento de la frecuencia de mutación de FS inducida por <i>gyrI</i> es dependiente de RecA.....	54
7. Las revertantes Lac ⁺ no se generan por amplificación de la región <i>lac</i> . 55	
8. El gen <i>gyrI</i> no interviene en la generación de mutaciones durante el crecimiento.....	57
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71

Resumen

En *Escherichia coli*, la DNA Girasa es blanco de diferentes inhibidores: antibióticos, como las cumarinas y las quinolonas, así como de las proteínas CcdB y microcina B17 (MccB17), ambas codificadas en plásmidos. Estas proteínas estabilizan los complejos transitorios de corte entre la girasa y el DNA, los cuales podrían causar lesiones en el DNA y la inducción de la respuesta SOS, muerte celular o la generación de mutaciones. La proteína Gyrl, codificada en el cromosoma por *gyrl*, es una proteína cuya expresión aumenta en fase estacionaria. Gyrl se une a la girasa *in vitro* e inhibe su actividad de superenrollamiento. Además, puede impedir la formación de los complejos de corte CcdB-girasa-DNA y MccB17-girasa-DNA. No se conoce con certeza su función *in vivo*, aunque se ha demostrado que protege de agentes que dañan el DNA. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del gene *gyrl* en la generación de mutaciones de fase estacionaria (FS) y de fase de crecimiento (FE). Para la primera parte, se hicieron ensayos de mutación de fase estacionaria en la cepa de *E. coli* FC40. Estos ensayos permiten evaluar indirectamente el daño al DNA por cortes de doble cadena, que se reflejan en una frecuencia de reversión de una mutación fuera de fase +1 en la fusión *lacIZ33* en un plásmido F'. Para la segunda parte se utilizaron ensayos de fluctuación.

Los resultados muestran que las células mutantes *gyrl* presentan un aumento en la frecuencia de mutación de aproximadamente 100 veces con respecto a la cepa silvestre. La introducción de un alelo silvestre *gyrl* en el cromosoma disminuye la frecuencia de mutación al nivel de la cepa silvestre. Este resultado muestra que *gyrl* participa en el mecanismo de la generación de mutaciones de FS, evitando la generación de las mismas.

La ubicación del alelo *lacIZ33* en el cromosoma disminuye alrededor de 80% la frecuencia de mutación en la mutante *gyrl*, por lo que la posición de *lacIZ33* en F' es importante para que se genere el aumento en la frecuencia de mutación.

Una doble mutante *recA gyrl* presenta la misma frecuencia baja de mutación que la mutante *recA*, por lo que el aumento en la frecuencia de mutación depende de las funciones de recombinación homóloga de RecA.

Además, se observó que existe la filamentación en algunas células *gyrl*, por lo que se puede pensar en una inducción de SOS.

Asimismo se verificó que la mayoría de las colonias Lac⁺ provenientes de la cepa *gyrl* se generan por mutación puntual y no por amplificación de la región *lac*.

Las tasas de mutación en fase de crecimiento obtenidas por medio de ensayos de fluctuación en células en fase exponencial de crecimiento no difieren significativamente entre la cepa *gyrl* y la cepa silvestre. Por lo tanto, la mutación en *gyrl* no afecta la tasa de mutación de células en FE. Los resultados del trabajo sugieren un papel protector de *gyrl* en la generación de mutaciones de FS.

INTRODUCCIÓN

1. FASE ESTACIONARIA EN BACTERIAS.

La homeostasis se define como la tendencia a mantener la estabilidad en el ambiente interno de un organismo. Su mantenimiento, es esencial para la sobrevivencia de cualquier organismo, particularmente cuando las condiciones ambientales son cambiantes, pues provocan estados de estrés que limitan el crecimiento y la reproducción y deben ser enfrentadas una vez que son detectadas.

Un ejemplo de lo anterior se puede observar en *Escherichia coli* cuando en un cultivo en el laboratorio se alcanza la fase estacionaria de crecimiento (FS). Las etapas que presenta un cultivo en líquido se pueden dividir en cuatro: fase de transición A ("lag A") (1), fase exponencial (2), fase de transición B ("lag" B) (3) y fase estacionaria (4) (Figura 1). La fase de transición A abarca el tiempo necesario para que las bacterias puedan reiniciar el ciclo celular después del ayuno al que estuvieron sometidas en la fase estacionaria. La fase exponencial representa el periodo en el que las células disponen de nutrientes suficientes para aumentar su masa celular su número aumenta exponencialmente. En la fase de transición B (3) los nutrientes disminuyen y también la velocidad de crecimiento. Finalmente la FS ocurre cuando alguno de los nutrientes requeridos se ha agotado, y/o cuando la concentración de metabolitos tóxicos excretados al medio se vuelve muy alta, y como resultado se presenta un cese en la división celular y el crecimiento poblacional. En la figura 1. la FS muestra 2 partes, la primera donde el número de células se mantiene constante (4.1) y otra (4.2) cuando se presenta la muerte celular (Huisman *et al.*, 1996).

La respuesta a un agotamiento en los nutrientes comprende los siguientes cambios: 1) La inducción de genes para poder incorporar nutrientes presentes en bajas concentraciones o la utilización de fuentes de carbono no preferenciales (Hengge-Aronnis, 1996); durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la FS disminuye la expresión de la mayoría de los genes requeridos para el crecimiento, mientras que se activa la de un grupo de genes implicados en la reorganización fisiológica para que la célula permanezca viable durante la inanición; 2) Cambios morfológicos en los que la célula se vuelve más pequeña y esférica; 3) En la membrana externa se incrementan los lipopolisacáridos y las uniones entrecruzadas covalentes en la capa de mureína (Wensink *et al.*, 1982; Pisabarro *et al.*, 1985). También se almacenan compuestos de alta energía como glicógeno y polifosfato (Preiss, 1984; Ishihama, 1997), así como otros que protegen del estrés osmótico (Giaver *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1992); 4) Otro cambio de las células en FS está relacionada con la estructura del DNA. Debido a que las bacterias tienen una capacidad energética baja, disminuye la tensión helicoidal o superenrolamiento del DNA (Ramírez-Santos *et al.*, 2005 en prensa). Cabe señalar que las células de un cultivo en FS difieren de acuerdo al tiempo en que fueron muestreadas y al nutriente que se agotó, pues las células que entran a FS por falta de glucosa son muy diferentes en composición, así como en expresión genética a las que lo hicieron por falta de fosfato (Nystrom, 2004). También existen diferencias en cuanto a la concentración de moléculas de reserva, agua, poliaminas y osmoprotectores. En estas condiciones se pueden

observar subpoblaciones celulares que originan colonias morfológicamente diferentes debido a variaciones genéticas entre ellas (Finkel y Kolter, 1999).

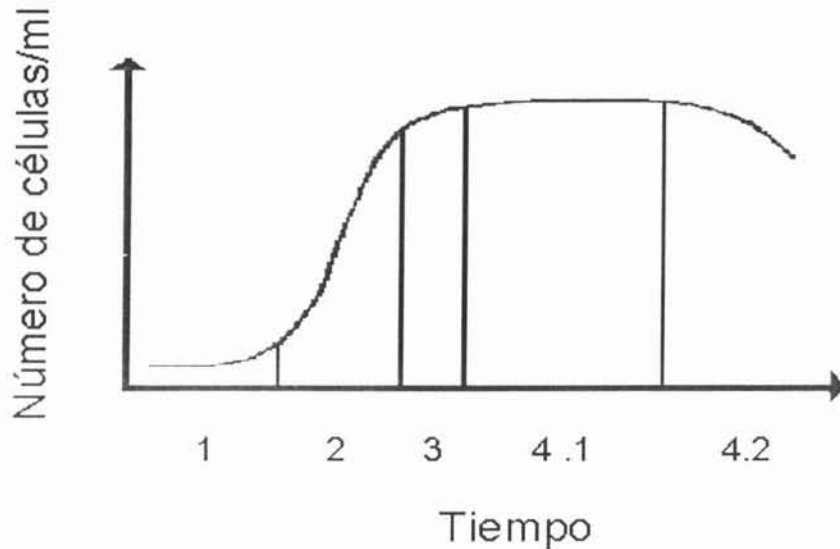


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano en un cultivo en líquido. 1. Fase de transición A "lag"; 2. Fase exponencial; 3. Fase de transición B; 4. Fase estacionaria, donde en 4.1 se mantiene el número celular constante y en 4.2 ocurre la muerte celular.

E. coli en sus diferentes nichos ecológicos (estos son primarios en el intestino de los animales homeotermos y secundarios en suelo y agua) se enfrenta comúnmente a la falta de nutrientes. Las bacterias gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Losick y Stragier, 1992), *Myxococcus xanthus* (Kim *et al.*, 1992) o *Streptomyces coelicolor* (Chater, 1993) generan una espora altamente diferenciada, pero *E. coli*, una bacteria gram-negativa, responde mediante la expresión de un programa reversible de genes específicos que se inactiva cuando la bacteria Este programa está regulado en gran medida por el factor de transcripción σ^S codificado por el gen *rpoS*, aunque en esta fase también se expresan genes no regulados por σ^S . La expresión de todos estos genes permite a

las células mantenerse metabólicamente activas para reiniciar el crecimiento una vez que los nutrientes estén disponibles (Jenkins *et al.*, 1988; Hengge-Aronnis, 1993).

Muchos de los genes que se expresan durante la FS codifican para proteínas que protegen de diferentes estreses, entre ellos: alta osmolaridad, baja o alta temperatura y pH ácido. Es decir, las células en inanición son altamente resistentes a una variedad de estreses, fenómeno conocido como protección cruzada (Jenkins *et al.*, 1988; Matin, 1991; Hengge-Aronnis, 2002).

Dadas las condiciones presentes en FS algunas células pueden presentar mutaciones. Por ejemplo, se ha observado un fenómeno de mutagénesis generalizada en colonias que envejecen (MAC por sus siglas en inglés "*Mutation in aging colonies*") (Bjedov *et al.*, 2003). Las colonias MAC, en cultivos en placa, aumentan la mutagénesis como consecuencia del estrés por falta de fuentes de carbono y por estrés oxidativo. En cultivos líquidos también existen otro tipo de mutantes conocidas como GASP (crecimiento ventajoso en fase estacionaria), las cuales forman una subpoblación que coexiste con la mayoría de la población parental o incluso la reemplaza, ya que presenta una ventaja para crecer en las condiciones de FS (Finkel y Kolter, 1999).

2. MUTACIÓN EN FASE ESTACIONARIA

2.1 DEFINICIÓN DE MUTACIÓN DE FASE ESTACIONARIA.

A partir de observaciones en las que las células durante la FS, en condiciones de selección no letal presentaban mutaciones que favorecían su crecimiento, se acuñó el término mutación "adaptativa". El término se utilizó porque se pensaba

que las mutaciones estaban dirigidas a los genes que permitirían a las células reproducirse durante el estrés (Cairns, *et al.*, 1988). Posteriormente, al analizar el mecanismo por el que surgen las mutaciones y comprobar que el origen no era dirigido, se cambió el término a mutación de fase estacionaria (que como las colonias MAC se presenta en cultivos en placas de agar). La mutación de fase estacionaria comprende una serie de fenómenos que se presentan en células sometidas a una presión de selección no letal, la cual limita el crecimiento y ocasionan que las células no se dividan. En algunas de estas células, debido al metabolismo basal que presentan, ocurre la generación de mutaciones (Cairns y Foster, 1991; Foster, 1999; Bull *et al.*, 2001; Rosenberg, 2001). La mutagénesis que ocurre es generalizada, es decir, no sólo se presenta en aquellos genes que pueden favorecer el crecimiento en condiciones específicas, como en un inicio fueron descritas, sino también en otros genes no relacionados (Foster, 1997, Torkelson *et al.*, 1997).

El tipo de mutante utilizado para analizar este fenómeno tiene un fenotipo negativo para permitir una selección directa una vez que se presenta la reversión.

Las mutaciones de FS se diferencian de aquellas que surgen en fase de crecimiento, por las condiciones presentes durante esta fase, y por los mecanismos moleculares que las generan (se describirán posteriormente) (Rosenberg, 1997; Lombardo y Rosenberg, 1999). La mutación de FS ha sido descrita en bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, y eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida*

albicans (Foster, 1993; Baranowska *et al.*, 1995; Storchova *et al.*, 1997; Foster 1999; Janbon *et al.*, 1999; Marini *et al.*, 1999).

2.2 MODELOS DE MUTACIÓN DE FASE ESTACIONARIA EN BACTERIAS.

Para entender el fenómeno de mutación de FS, se han utilizado diversos modelos genéticos que difieren entre sí en el organismo utilizado, el gen monitor de la mutación (genes que en general codifican para enzimas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos o el catabolismo de azúcares.) y el tipo de mutación requerida para el monitoreo.

En 1988 Cairns *et al* propusieron que las bacterias podían elegir las mutaciones en su genoma. La cepa que se usó originalmente, era una cepa de *Escherichia coli* con el plásmido F₁₂₈ que tiene el operón *lac* completo y una mutación ámbar en el gen *lacZ* polar para *lacY*. Esta cepa puede revertir la mutación tanto intragénicamente como por la creación de tRNA_s supresores.

La propuesta de Cairns es analizada posteriormente y al estudiar el mecanismo de generación de las mutaciones, se demuestra que no se trata de un fenómeno adaptativo ni dirigido. (Cairns y Foster, 1991). En este trabajo se elige al que será el modelo mejor entendido para estudiar mutación de FS, la cepa FC40 de *E. coli*, elegida por su alta tasa de mutación durante la selección (Cairns y Foster, 1991; Foster, 1999).

La cepa tiene una delección en el operón *lac* y *pro* en el cromosoma, pero porta al plásmido F₁₂₈ con un alelo *lac*⁻ derivado de una fusión de los genes *lacI* y *lacZYA*, en la que se pierden los últimos cuatro codones de *lacI*, la región reguladora que

contiene a *lacP* y *LacO* y los primeros 23 codones de *lacZ* (Calos y Miller, 1981). Su transcripción inicia constitutivamente a partir del promotor de *lacI^Q* (Brake *et al.*, 1978). La cepa FC40 es Lac⁻, pues presenta una mutación +1 por corrimiento del marco de lectura del mensaje (“frameshift”) en el codón 320 de *lacI*, que cambia de CCC a CCCC, (Calos y Miller, 1981) (Figura 2). Este arreglo se conoce como el alelo *lacI_{Z33}*.

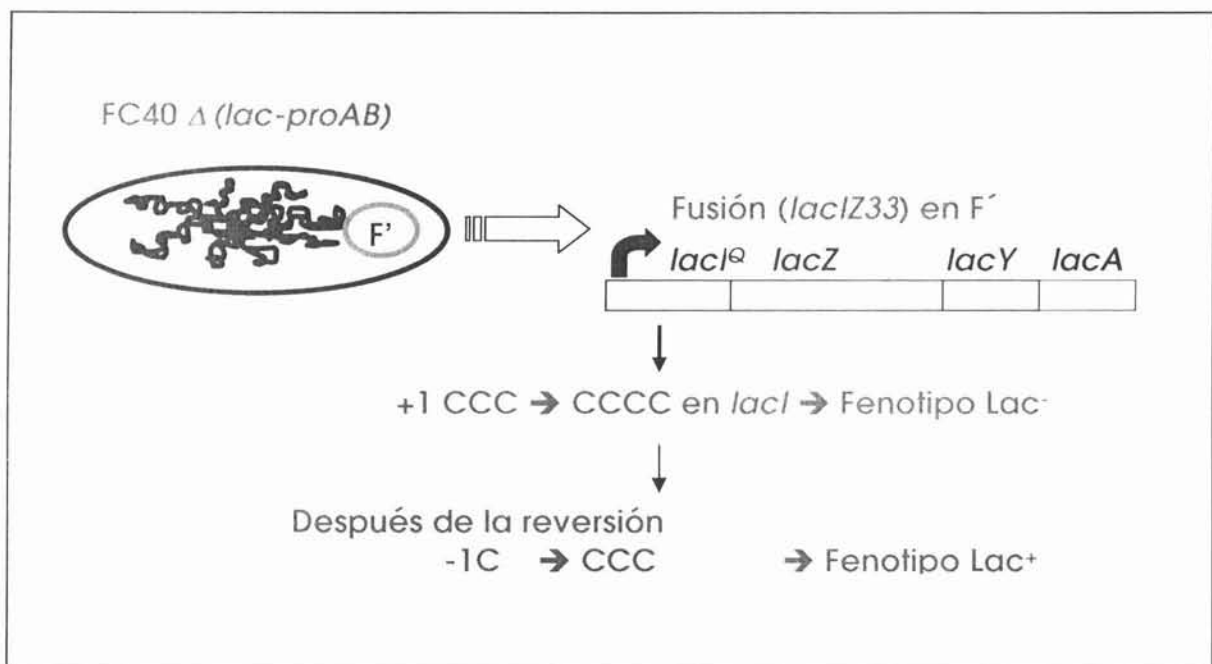


Figura 2. Modelo de la cepa FC40 de *E. coli*. La cepa no tiene el operón *lacZYA* y *proAB*, pero posee el plásmido F'₁₂₈ en el que se encuentra el alelo *lacI_{Z33}*. Dicho alelo presenta una mutación +1 en el codón 320 de *lacI* que cambia CCC a CCCC, por lo que la cepa es Lac⁻. La reversión posterior sucede por una mutación del mismo tipo, pero -1, devolviendo a la cepa la capacidad de metabolizar lactosa.

Otra característica del alelo, es la presencia de una actividad residual de la enzima β -galactosidasa (2 unidades Miller) (ligeramente débil) y la de una permeasa defectiva, porque la mutación de corrimiento del marco de lectura del mensaje es polar para *lacY*. Sin embargo, la energía que las células en FS obtienen por medio

de estas características no es suficiente para que crezcan en lactosa (Foster, 1994) pero es necesaria para el proceso de mutación y la reversión a Lac⁺.

Aunque este es el modelo mejor entendido, existen otros modelos menos estudiados y con algunos de ellos se ha dejado de trabajar.

En *E. coli* se han utilizado diferentes genes, por ejemplo los genes *trpA* o *trpB*, donde se requiere que se revierta una mutación de sentido erróneo. Las colonias se incuban en medio con una cantidad limitante de triptofano y generan papilas Trp⁺ (Hall, 1990). También se estudió la reversión de auxotrofías en células con mutaciones ocre en *trpE* o en *tyrA* plateadas en medio mínimo con glucosa sin el aminoácido requerido (Bridges, 1994).

Algunos modelos analizaron la mutación adaptativa por medios de operones que requieren que se inserte una secuencia de inserción, esto causa un cambio en la especificidad de la enzima por su sustrato y de este modo la célula puede metabolizar fuentes de carbono relacionadas a lactosa (Hall, 1999). En los operones silenciados que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de fuentes de carbono no preferenciales, se ha demostrado que la escisión precisa de elementos IS también permite la generación de mutantes de FS (Hall, 1988).

Un modelo que aún es estudiado es el de *Salmonella enterica* construido por Galintski y Roth (1996). *Salmonella* no puede metabolizar lactosa naturalmente (Lac⁻), por lo que para estudiar la reversión de un alelo lac se introdujo el operón *lac*. Para la construcción de este alelo se insertó un fago defectuoso MudF con el

operón *lac* en el gen *hisC*. A partir de esta cepa se generó una colección de distintas mutaciones Lac^- . En este sistema las reversiones a Lac^+ se deben a eventos de amplificación del alelo *lac* y no a la escisión de Mu. Los estudios realizados en este sistema han suscitado diferencias con respecto al mecanismo por el cual se generan las mutaciones de FS.

Otra bacteria utilizada es *Pseudomonas putida*, en ella se han estudiado genes que codifican para proteínas que generan mutantes resistentes a compuestos tóxicos como ácido dicloroacético o tolueno (Leddy *et al.*, 1995). Las mutantes se generan por rearrreglos genéticos que involucran silenciar genes por medio de un transposón, (Slater *et al.*, 1985) o pueden ocurrir inserciones, sustituciones y deleciones de bases que forman promotores activos (Kasak *et al.*, 1997).

2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA MUTACIÓN DE FASE ESTACIONARIA EN EL SISTEMA *Lac* DE *Escherichia coli*.

A diferencia de las mutaciones dependientes de crecimiento que generan mutaciones puntuales como deleciones, duplicaciones y corrimientos de mensaje, las mutaciones de FS se generan en su mayoría por corrimiento de mensaje -1 (pb) en secuencias pequeñas de mononucleótidos repetidos (Foster y Trimarchi, 1994; Rosenberg *et al.*, 1994); cerca del 75% suceden en el mismo sitio de la mutación por un corrimiento $+1$ del mensaje original (Foster *et al.*, 1995; Foster y Rosche, 1999).

La reversión a Lac^+ requiere de la reparación por recombinación homóloga de los cortes de doble hebra en el DNA. Por esta razón, la reversión requiere del sistema

RecA-RecBCD y de RuvA, RuvB y RuvC para la migración del entrecruzamiento de Holliday (Cairns y Foster, 1991; Foster, 1993; Harris *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1996).

Un requerimiento más es la expresión de algunas proteínas conjugativas del plásmido F', aunque la conjugación como tal no es necesaria, pues aunque exista un aumento en los eventos conjugativos (que son muy bajos en estas condiciones) no se afecta la frecuencia de reversión (Foster y Trimarchi, 1995b). El modelo sugiere (Foster y Trimarchi, 1995a) que se requiere de los cortes de doble cadena que en el *OriT* causados por TraI y TraY (que aunque no corta directamente al DNA se ha demostrado que es necesaria para una reacción de corte eficiente). Los cortes de una cadena pueden ocurrir aún en la ausencia de una señal conjugativa y persistir en las células de fase estacionaria (Frost *et al.*, 1998).

Otras proteínas Tra como TraQ (importante para el ensamblaje del pili) y TraD (probablemente involucrada en la transferencia del DNA durante la conjugación) (Frost *et al.*, 1994) disminuyen la reversión 10% cuando existen mutaciones en los genes que las codifican (Foster y Trimarchi, 1995a; Galinski y Roth, 1995). Esto sugiere que el proceso conjugativo se lleva a cabo en estas células, a excepción de la transferencia del DNA a la célula receptora.

Otra respuesta requerida para la reversión a Lac⁺ es la respuesta SOS, cuya participación es clave en la reparación de daño al DNA y la generación de mutaciones de fase estacionaria (McKenzie *et al.*, 2000; Rosenberg, 2001).

En *E. coli* y otras bacterias, el daño en el DNA induce la respuesta SOS (Friedberg *et al.*, 1995). Durante la respuesta SOS se induce la expresión de proteínas como

RecA, RuvA, RuvB y las DNA polimerasas IV y V (Pol IV y Pol V) (Goodman, 2002). De éstas, sólo Pol IV se requiere en la síntesis de DNA y provoca del 50-80 % de las reversiones, ya que el tipo de errores que produce son de corrimiento del marco de lectura -1 en mononucleótidos repetidos y en menor proporción transversiones G a T (Kim *et al* 1997, Wagner *et al.*, 1999; Wagner y Nohmi, 2000). Cabe mencionar que la expresión de Pol IV está regulada también por el factor σ^S y cuando *rpoS* se inactiva, la reversión a Lac⁺ disminuye hasta en 90% (aunque no se ha demostrado si σ^S participa directamente o lo hace por medio de los genes a los que regula) (Layton y Foster, 2003; Lombardo *et al.*, 2004). Esta polimerasa se induce en fase estacionaria tardía y se mantiene constante alrededor de tres días en condiciones de estrés de nutrientes en cajas de Petri (Layton y Foster, 2003).

Un evento relacionado con el requerimiento de las funciones conjugativas es que la frecuencia de reversión a Lac⁺ es 100 veces mayor cuando el alelo *lacI*Z33 se localiza en el plásmido F' a cuando se encuentra en el cromosoma y además no depende de RecA (Foster y Trimarchi, 1995a; Radicella *et al.*, 1995). Lo anterior se debe posiblemente a que el número de cortes de doble cadena es mayor en el plásmido por la presencia de las proteínas Tra. Aunque en estas condiciones el metabolismo celular es bajo, el plásmido puede iniciar la replicación en un origen vegetativo y después la horquilla se colapsa al encontrar el corte en *OriT*.

Por otra parte, la probabilidad de encontrar una región homóloga en el cromosoma es todavía menor, las regiones duplicadas en el cromosoma están presentes en 10^{-2} - 10^{-3} células para cualquier segmento de DNA (Anderson y Roth, 1981) y

alrededor del 40% de las células tienen dos copias del cromosoma (Akerlund *et al.*, 1995), en cambio se estima que el número de copias de F' debe ser mayor (Foster, 1999).

3. LA RESPUESTA SOS EN *Escherichia coli*.

La respuesta SOS es una respuesta celular inducida por la exposición de las células a una variedad de estreses genotóxicos o metabólicos que dañan al DNA e interfieren con su replicación (Walker, 1996). Esta respuesta se debe a la inducción de un regulón de más de 40 genes (Courcelle *et al.*, 2001), cuyas proteínas están relacionadas con la tolerancia al daño en DNA (por ejemplo la síntesis de DNA dañado) y reparación del daño (por ejemplo reparación por escisión de nucleótidos o reparación por recombinación). La regulación del sistema SOS está mediada por las proteínas LexA y RecA. LexA actúa como represor de los genes, incluyendo a *recA* y *lexA* mismos, uniéndose a la secuencia regulatoria en la región del operador (cajas SOS) de los genes (Little y Mount, 1982; Walker *et al.*, 1984, 1985).

La señal propuesta que induce al regulón es DNA de cadena sencilla, al que se une RecA activa formando un filamento helicoidal y RecA se vuelve una co-proteasa activa (Friedberg *et al.*, 1995). RecA activada promueve la autoproteólisis del represor LexA y la desrepresión del regulón de SOS. RecA activada interviene en la inducción de la respuesta SOS, en la recombinación del DNA (aunque no se induzca SOS), en la reparación del DNA de una y doble cadena, y en la recombinación dependiente de replicación (Kuzminov, 1999; Asai *et al.*, 1994; Kowalczykowski, 1994). El tiempo de expresión de los diferentes genes ocurre en

etapas y está regulado por la afinidad de LexA por sus cajas SOS, por lo que los genes se expresan asincrónicamente. Entre los genes que se expresan en la primera etapa están *recA*, *lexA*, los genes *uvr* relacionados en la escisión de nucleótidos de una cadena (NER), *ruvA* y *ruvB*, cuyos productos intervienen en la reparación de DNA por recombinación. También *dinI* que codifica para un inhibidor del procesamiento de UmuD a UmuD activada (Yasuda *et al.*, 1998), y *polB* que codifica para la DNA Pol II (Bonner *et al.*, 1988), que permite la reanudación de la síntesis del DNA cuando la replicación se detiene. En la siguiente etapa, se expresan genes como *recA* y *recN* que participan en la recombinación.

Entre los últimos genes en inducir su expresión están *sulA* (*sfiA*) que codifica para un inhibidor de la división celular que causa filamentación celular durante SOS, *umuD* y *umuC* que codifican para la DNA polimerasa V (Tang *et al.*, 1999). En relación a otros genes, como *dinB* (que codifica para Pol IV) y el gen *gyrI* (que codifica para Gyrl, un inhibidor de girasa); entre otros, no se sabe con certeza en qué etapa de la respuesta SOS se expresan.

El nivel y la duración de la inducción de la respuesta depende del grado y la persistencia de DNA de una hebra en la célula. Una vez que las lesiones se reparan, las funciones de SOS de nuevo se reprimen.

E. coli posee a Pol IV y Pol V, que pertenecen a la superfamilia de DNA polimerasas Y, que pueden omitir el daño en el DNA que bloquean el crecimiento de las cadenas catalizado por las polimerasas. Estas polimerasas introducen muchos errores y son poco procesivas (Goodman, 2002; Yesei *et al.*, 2002). Pol V puede polimerizar pasando por los sitios de DNA dañados, pero Pol IV puede

replicar limitadamente DNA dañado, además, no tiene un papel importante en la tolerancia a las lesiones introducidas en el DNA por UV y su papel en la célula aún no es claro (Napolitano *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

Asimismo, la inducción máxima de Pol IV, codificada por el gen *dinB*, bajo estas condiciones requiere de σ^S y sólo es parcialmente dependiente de LexA. Es decir, se induce independientemente del sistema SOS por agentes externos que dañan al DNA, sugiriendo que la inducción de Pol IV y de las otras polimerasas de SOS podría ser necesaria para la sobrevivencia en fase estacionaria (Yeiser *et al.*, 2002).

Existen otros genes cuya función durante la respuesta SOS no es claramente conocida, entre ellos *din*, *yeb*, *yig*, *ydg*, *ydi*, *ydj* y *sbmC* (*gyrI*). De éste último se tratará posteriormente.

Otras funciones de SOS que permiten cambios en la información genética se explican de la siguiente manera: La inducción del regulón aumenta la eficiencia de la recombinación debido a la sobreproducción de RecA, RecN y las proteínas RuvA y RuvB, por lo tanto se permite la reparación eficiente de cortes de doble cadena de DNA y cortes en las hebras hijas. Sin embargo, también pueden generarse rearrreglos cromosómicos (Dimpfl y Echols, 1989), se aumenta la eficiencia de la conjugación, consecuentemente la transferencia horizontal (Matic *et al.*, 1995) y la adquisición de material genético extracelular. Lo anterior también se promueve por la inhibición de la función de la exonucleasa V (RecBCD), que protege a la célula del DNA extraño (Hiom y Sedgwick, 1992; Rinken y Wackernagel, 1992).

4. MECANISMO DE GENERACIÓN DE LA MUTACIÓN DE FASE ESTACIONARIA EN LA CEPA DE *Escherichia coli* FC40.

Retomando lo mencionado anteriormente, se ha propuesto un modelo de mutación de FS en el que participan genes regulados por σ^S , por la respuesta SOS, y por ambos.

El modelo propuesto (Harris *et al*, 1994; Foster, 1999) supone lo siguiente:

Las células sometidas a estrés nutricional pueden inducir la formación de cortes de doble cadena [de diversos orígenes (Figura 3)], sustrato para la reparación mediada por recombinación homóloga.

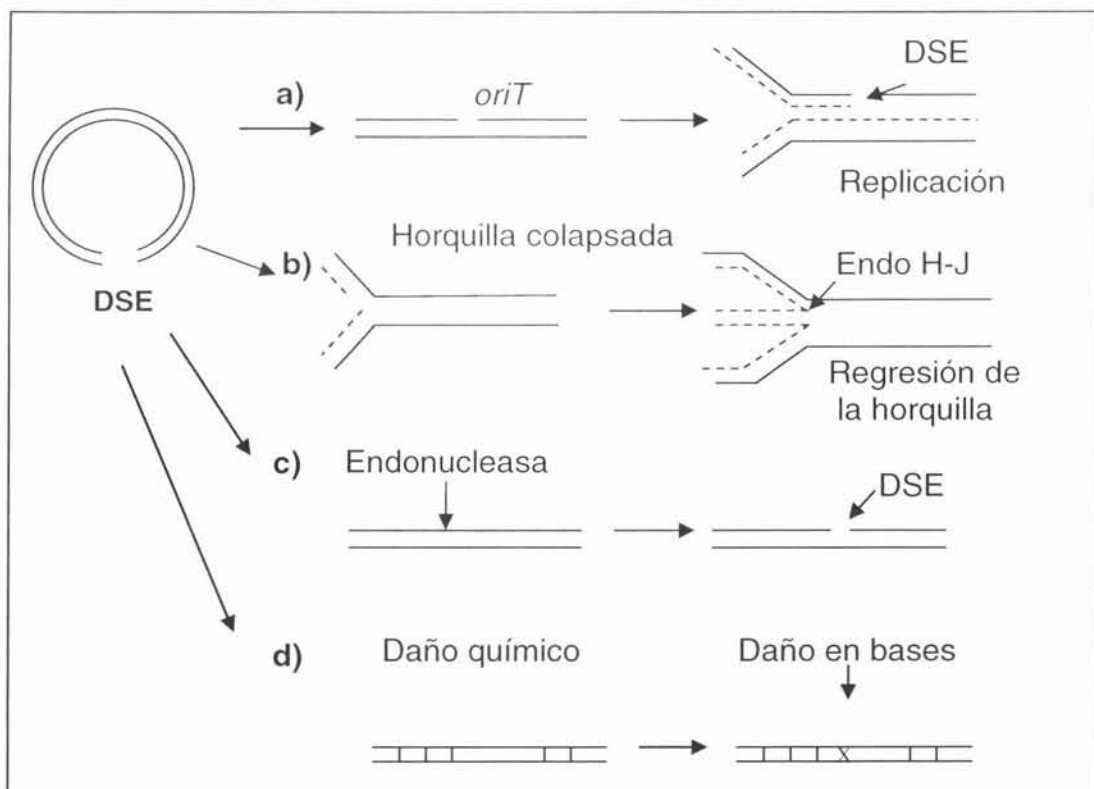


Figura 3. Formación de cortes de doble cadena (DSB) y extremos de doble cadena (DSE) en la fase estacionaria. a) Durante la replicación se genera un corte en el *OriT* del plásmido F' o cuando hay un corte de una cadena en el DNA cromosómico. b) La horquilla de replicación se colapsa y la horquilla se regresa sobre sí misma. c) Por corte enzimático con enzimas de restricción o girasa. d) Los DSB también se generan por daño químico causado por daño oxidativo. Modificado de Rosenberg (2001).

Entre las formas en que se pueden generar los cortes en el plásmido, se encuentra el que ocurre cuando ocasionalmente se inicia la replicación en uno de los orígenes vegetativos del plásmido *oriS* u *oriV*, pero al existir un corte de una cadena en *oriT*, la horquilla de replicación se colapsa (Kuzminov, 1995) y se generan extremos de doble cadena (DSE) que permitirán el inicio de la reparación por recombinación (Carter *et al.*, 1992). También se generan cuando las horquillas colapsadas (Michel, 2000, Michel *et al.*, 20001) se regresan, siendo el molde una de las cadenas nuevas, y dejan también extremos de doble cadena libres para su procesamiento por RecBCD (Harris *et al.*, 1994), con o sin el procesamiento posterior de las resolvasas de cruciformes H-J (Rosenberg *et al.*, 1996). Los cortes de doble cadena también (DSB) pueden ser provocados por enzimas con actividad de endonucleasas o a consecuencia de daño químico, como el daño oxidativo.

Se piensa que los mismos mecanismos generan los cortes en el cromosoma y en el plásmido F', pero que es más probable que los cortes de doble cadena ocurran en el plásmido. Lo anterior tomando en cuenta que F' posee a las proteínas TraI y TraY que pueden promover los cortes de DNA que se convierten en DSB (Harris *et al.*, 1994, Foster y Trimarchi, 1995; Kuzminov, 1995; Rosenberg *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1996).

Los DSB son reconocidos por RecBCD y se inicia la reparación, degradando el extremo 5' para producir una hebra 3' invasiva. RecA cataliza la invasión de una cadena en el DNA homólogo, el cual puede provenir de un cromosoma homólogo (del 30 al 40% de las células de fase estacionaria pueden poseerlo) (Akerlund *et al.*, 1995), de una región duplicada (presente en 10^{-2} - 10^{-3} células para cualquier

segmento de DNA (Anderson y Roth, 1981), o incluso se sugiere que se puede tomar DNA que se encuentra fuera de las células, aunque no se ha demostrado que esto suceda en *E. coli* (Figura 4).

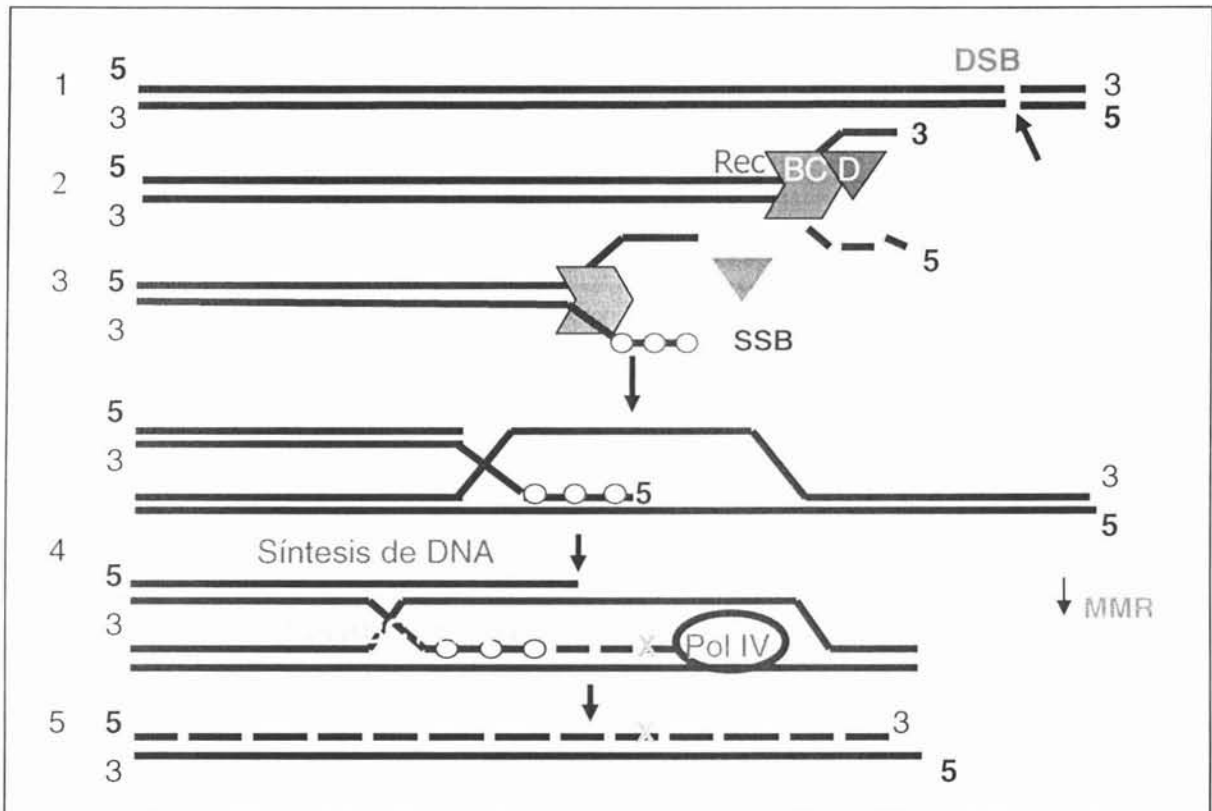


Figura 4. Modelo del mecanismo de generación de mutaciones de fase estacionaria. Una vez que se presenta el corte de doble cadena de DNA (DSB), el sistema de reparación RecBCD reconoce el corte y lo procesa con la intervención de RecA. La síntesis del DNA la realiza Pol IV y cuando comete errores permite la reversión a Lac⁺. Se presenta además una disminución del sistema de reparación de apareamiento erróneo de las bases (MMR). Modificado de Bull *et al.*, (2000a). Para más detalles ver el texto.

La síntesis de DNA durante la reparación es llevada a cabo principalmente por Pol IV, no obstante también pueden intervenir Pol II, inducida también por la respuesta SOS (Bonner *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1995) y Pol III (Foster, 2000).

Cuando Pol IV copia la región *lac* introduce principalmente los errores fuera de fase, que provocan la reversión a Lac⁺. Los intermediarios de la síntesis de DNA

que aún permanecen, migran por medio de RuvA, RuvB y se propone que en sentido contrario por RecG y posteriormente se resuelven por RuvC. Una mutación en *ruvA*, *ruvB* o *ruvC* elimina la mutación de FS, pero una en *recG* la aumenta 100 veces (Foster *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1996) debido a los altos niveles de Pol IV en estas células (Lloyd y Buckman, 1991; Layton y Foster, 2003). Aunado al incremento de Pol IV, el sistema de reparación de apareamiento erróneo de las bases (MMR) disminuye su actividad transitoriamente por un decremento de la proteína MutL (Harris *et al.*, 1997; Foster, 1999b; Harris *et al.*, 1999). Esto promueve condiciones de hipermutación transitoria (Torkelson *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1998; Rosche *et al.*, 1999), lo cual se propone que ocurre en una subpoblación de las células, ya que las revertantes Lac⁺ tienen una alta frecuencia de mutaciones secundarias en sus genomas [50 veces más alto que las células Lac⁻ (Torkelson *et al.*, 1997; Rosche y Foster, 1999)].

Haciendo un resumen, existen ciertos genes dentro del sistema de la cepa FC40 que al inactivarlos producen un cambio dramático en la frecuencia de mutación de FS. Estos son: el gen *rpoS* que disminuye la frecuencia de reversión a Lac⁺ ≈ 10 veces, los genes de conjugación *traD* y *traQ* que disminuyen la frecuencia de reversión en un 10%; la inactivación del gene *dinB* que codifica para la DNA polimerasa IV, provoca un descenso de entre 50-80% del total de las mutantes generadas. El represor de la respuesta SOS, *lexA*, provoca un descenso del 80% del total de revertantes. En el caso de mutaciones en los genes que codifican para proteínas de recombinación como RecA y RecBC, disminuyen la frecuencia 100 y

10 veces, respectivamente. Las proteínas RuvAB con sus respectivos genes mutados también disminuyen la frecuencia 10 veces.

Mutaciones en genes que aumentan la frecuencia de mutación de FS se encuentran en: *recD*, que la aumenta 5 veces; *recG* que la aumenta 100 veces. También *mutL* al no estar presente causa un incremento de 100 veces en la frecuencia (Foster *et al.*, 1996) y el gene *dam*, que codifica para la metilasa Dam, la aumenta 10 veces.

El modelo de hipermutación sugiere que cuando las bacterias se encuentran sometidas a condiciones de estrés, la tasa de mutación aumenta en todo el genoma (Rosenberg, 2001). Durante la selección en lactosa, cerca del 0.1% de las células FC40 son hipermutantes y tienen una tasa de mutación que es aproximadamente 200 veces mayor que la normal. Ya que la población (o poblaciones) hipermutante es pequeña, sólo cerca del 10% de las revertantes Lac⁺ se originan a partir de ellas, y el resto se origina por medio de los mecanismos dependientes de la reparación por recombinación descritos anteriormente (Bull *et al.*, 2000a, Bull *et al.*, 2000b).

Es necesario señalar que el modelo descrito no es un consenso aceptado, existe una polémica sobre el mecanismo principal que genera las mutaciones. Un modelo alternativo, es el modelo de crecimiento críptico o de amplificación que se basa en que las mutaciones surgen en poblaciones de células que crecen en el estrés sin la necesidad de mutagénesis (Galintski y Roth, 1995; Hendrickson *et al.*, 2002). El modelo supone la existencia previa de células que portan una amplificación en *lac*, las cuales debido a la actividad residual de β - galactosidasa

del alelo *lacIZ33* pueden crecer lentamente en el medio selectivo. Algunas células dentro de las microcolonias que se están formando adquieren más amplificaciones o copias de *lacIZ33* y pueden crecer más rápido. La probabilidad de un evento de reversión (por una mutación de corrimiento del marco de lectura -1 se incrementa al tener más copias de *lac* (de 20 a 50). Con las posteriores replicaciones o por medio de recombinación, se pierden las amplificaciones y la segregación permite observar únicamente células que tienen una mutación puntual (Hendrickson *et al.*, 2002; Schlechta *et al.*, 2003).

Este último modelo es discutido, porque se piensa que la amplificación es otra respuesta al estrés de nutrientes que requiere a su vez del factor general de transcripción σ^S en células que no están creciendo (Hastings *et al.*, 2000; Layton y Foster, 2003; Lombardo *et al.*, 2004). Las células con el arreglo amplificado no son hipermutantes (Hastings *et al.*, 2000) y no requieren de la inducción de la respuesta SOS, ni de los errores generados por Pol IV (McKenzie *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta que entre 50-80 % de mutantes puntuales son generadas por Pol IV (mientras que las amplificaciones del alelo *lacIZ33* no depende de esta polimerasa), resulta incompatible el supuesto de que la mayoría de las mutaciones son generadas a partir de errores dependientes de la síntesis de DNA. Lo anterior se debe a que si los mismos mecanismos operantes en mutación de FS fueran los de FE, en donde las tasas de mutación basales producen los errores, no se podría generar una frecuencia de mutación tan alta como la observada en FS (McKenzie *et al.*, 2001; McKenzie *et al.*, 2003). Cerca de un 1-5 % de las colonias FC40 Lac⁺ aisladas del día 5 al 7 tienen amplificado al alelo *lac*. (Foster, 1994; Foster *et al.*,

1995). Aunque el porcentaje aumenta a 40- 60% del total después del día, 7 tal vez por muerte celular que permite el crecimiento de otras células (Hastings *et al*, 2000; Powell y Wartell, 2001).

Es probable que este tipo de arreglos puedan surgir a partir de la reparación por recombinación de extremos de doble cadena que se reparan por medio de un mecanismo no homólogo, que crea un segmento duplicado o un intermediario de círculo rodante (Rosenberg, 2001). Cualquiera de los dos puede amplificar la región rápidamente en tandem (en sentido directo). Alternativamente la reparación homóloga de los cortes de doble cadena puede generar horquillas de replicación que se colapsan y se produce un cambio de templado que posteriormente genera un segmento duplicado o el intermediario de círculo rodante (Hastings *et al.*, 2004).

5. SOBREVIVENCIA *versus* MANTENIMIENTO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA.

La respuesta celular por la inducción de σ^S protege a la célula de diferentes estreses, siendo esta respuesta básicamente de protección y prevención. Sin embargo, también se pueden presentar respuestas que pueden parecer contrarias a lo anterior. Por ejemplo, se ha observado el fenómeno descrito anteriormente de mutagénesis general en colonias envejecidas (MAC) (Bjedov *et al.*, 2003). Entre los requerimientos genéticos de la MAC están dos de los genes del regulón SOS, *recA* y *polB*, además de la actividad del sistema de reparación de apareamiento erróneo dependiente de metilación (MMR) y la presencia de CRP. Continuando con el tema de mutagénesis están las ya mencionadas mutantes GASP, que

aunque no se generan en FS, es en estas condiciones cuando las mutaciones que se adquirieron en FE les permiten un crecimiento ventajoso. En estas mutantes, las DNA polimerasas IV y V son importantes para conceder ciertas ventajas en el crecimiento en FS (Yeiser *et al.*, 2002).

Janion *et al.*, (2002) muestran que al someter a células de *E.coli* AB1157 a inanición en distintos medios de cultivo, se induce la respuesta SOS pero únicamente después de incubarse en medio que contiene 0.2% de glicerol como fuente de carbono. El sistema de mutación de FS presenta condiciones experimentales similares a las usadas por Taddei *et al.*(1995), y en ambos se observa una inducción de la respuesta SOS ante la inanición. Entre los genes que se inducen, están las polimerasas IV y V que pueden generar más mutaciones.

Se ha propuesto que en condiciones de estrés de nutrientes y competencia intensa se podría aumentar en algunas células la frecuencia de mutación como un mecanismo potencial para la generación de nuevos alelos en la población, esto a pesar de que un aumento en la frecuencia de mutación puede ser deletéreo (Foster, 1997; Torkelson *et al.*, 1997; Matic *et al.*, 2004).

6. EL GEN *gyrI*, LA GIRASA Y SU INTERACCIÓN ENTRE AMBOS.

El gene *gyrI* (*sbmC*), se encuentra en el minuto 44.8 del cromosoma de *E. coli* (Baquero *et al.*, 1995) y codifica para la proteína citoplásmica GyrI de 18 kDa, denominada así por sus siglas en inglés (*gyrase inhibitor*). Un estudio teórico muestra que el gen está también en *Salmonella enterica*, y la secuencia de la proteína tiene una identidad de 70%. En otras bacterias como *Clostridium*

acetobutylicum, *Listeria innocua* y *Bacillus haldurans* la identidad de la proteína es de 21%, 22 % y 25%, respectivamente (Romanowski *et al.*, 2002).

La regulación de la transcripción de *gyrl* es compleja y aumenta a partir de la fase exponencial tardía, la síntesis de la proteína presenta un patrón similar (Nakanishi *et al.*, 1998). La transcripción también aumenta al inducirse la respuesta SOS y depende de LexA (Baquero *et al.*, 1995). Su expresión depende además del factor σ^S , de HNS (Oh *et al.*, 2001) y podría depender de CRP (Baquero *et al.*, 1995) (Figura 5).

Para entender el mecanismo de protección/inhibición propuesto para Gyrl, es necesario entender cómo actúa la proteína a la cual se une, la Topoisomerasa II o DNA girasa.

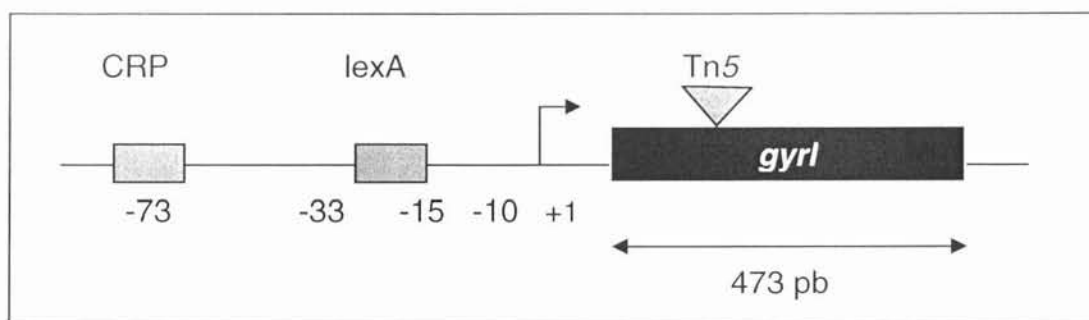


Figura 5. Modelo de la regulación del gen *gyrl*. El gen es regulado positivamente por σ^S , y HNS; LexA reprime su expresión. Además, presenta un sitio posible de unión a CRP. La cepa mutante en *gyrl* presenta un transposón Tn5 insertado a 94 pb después del codón de inicio de la traducción.

Las enzimas denominadas topoisomerasas son responsables de catalizar cambios topológicos en el DNA. Existen dos tipos de topoisomerasas: las del tipo I introducen un corte de una cadena de DNA y no requieren de ATP, y las del tipo II

pueden cortar las dos cadenas del DNA y requieren ATP. Dentro del grupo II, la DNA girasa es la única que puede introducir supervueltas negativas en el DNA en presencia de ATP y en su ausencia relaja al DNA superenrollado negativamente (Gómez-Eichelmann y Camacho-Carranza, 1995). También concatena y desconcatena círculos de DNA, genera y resuelve nudos intramoleculares en DNA circular.

La DNA girasa es un heterotetrámero formado por dos subunidades GyrA, de 97 kDa cada una, codificadas por el gen *gyrA* y dos subunidades GyrB, de 90 kDa cada una codificadas por el gen *gyrB*. La proteína GyrA tiene actividad de corte en su extremo N-terminal, mientras que el C-terminal se une al DNA (Reece y Maxwell, 1991). La actividad de ATPasa de la enzima se encuentra en el extremo N-terminal de GyrB, mientras que el C-terminal está relacionado en la unión al DNA y a GyrA (Brown *et al.*, 1979; Tingey y Maxwell, 1996, Chatterji *et al.*, 2000).

Cabe mencionar que, pese a que muchas proteínas se degradan en fase estacionaria, los niveles de girasa son similares en las células en fase de crecimiento exponencial y en la FS (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción de la enzima procede de la siguiente manera (Figura 6):

Un fragmento de DNA de 140 pb se enrolla en el tetrámero (segmento G) formando una supervuelta toroidal positiva. Cada hebra quedará situada cerca de una Tyr122 de las subunidades GyrA para formar un enlace covalente con el fosfato del DNA. El segmento se corta independientemente de ATP, permaneciendo unido gracias al enlace covalente. Posteriormente, con la unión del ATP a uno de sus sitios en la subunidad B, se produce un cambio

conformacional que permite que los dominios de GyrA se acerquen, así como la unión de un segundo ATP y la unión de otro fragmento de DNA (Segmento T) (Champoux, 2001). Esto promueve que se separen los dos extremos del segmento G cortado y se transloque el segmento T intacto en la cavidad central así formada, donde posiblemente la hidrólisis del ATP promueva la translocación (Baird *et al.*, 1999).

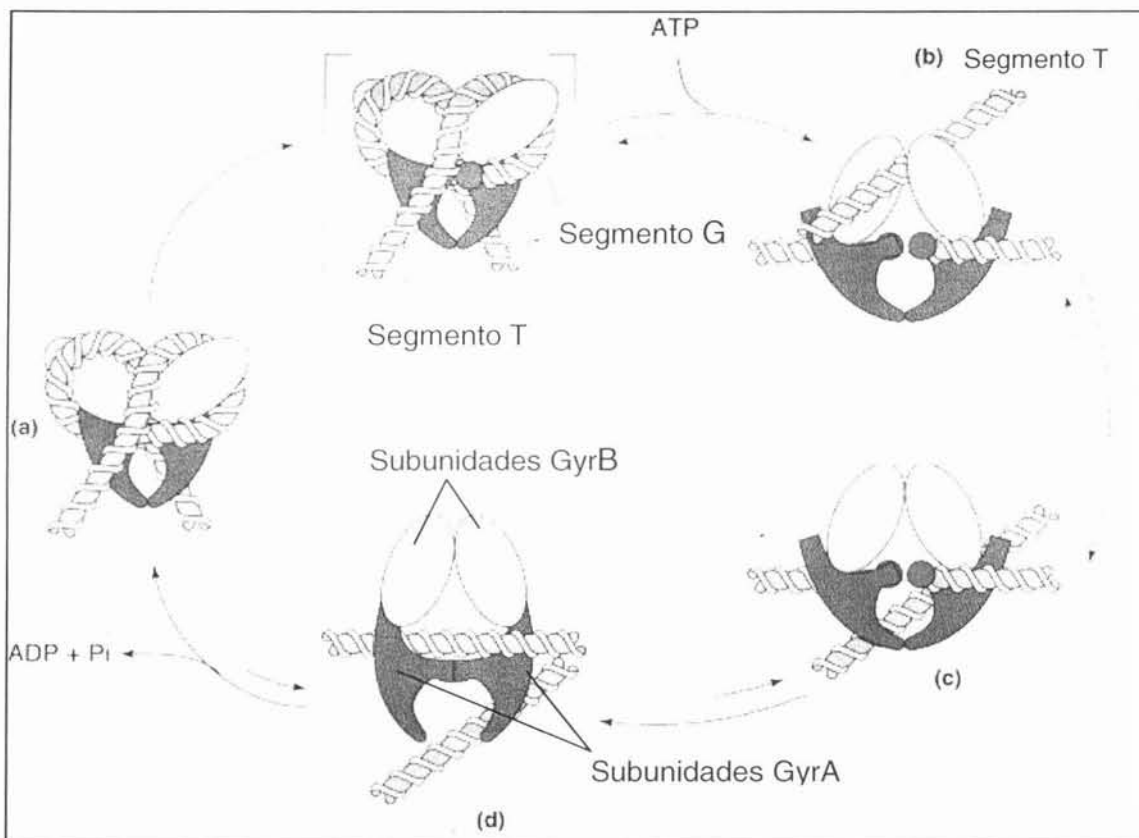


Figura 6. Modelo del ciclo de actividad de girasa. a) Un fragmento de DNA se enrolla en girasa (segmento G). b) Cuando el ATP se une a las subunidades B ocurre un cambio conformacional, se captura el fragmento T de DNA y se corta el segmento G, el cual se mantiene covalentemente unido a GyrA. c) El segmento T se transloca a través del segmento G cortado. d) Posteriormente se religa el segmento G y el T es liberado por la puerta en la base de la enzima, quedando girasa libre para otro ciclo. Tomado de Couturier, *et al* (1998)

La ligación del segmento G permite que se libere el segmento T traslocado por la puerta en la base de la enzima, terminando el ciclo de reacción con la hidrólisis del

segundo ATP y la separación de los dominios que se unen a DNA y la girasa queda libre para otro ciclo.

La girasa es una enzima esencial para la sobrevivencia de las bacterias, que interviene en procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación. Muchos organismos que compiten con *E. coli* sintetizan inhibidores que afectan la función de girasa (Maxwell, 1997). Además, se han identificado un gran número de compuestos químicos de origen natural y sintético que inhiben la actividad de la enzima (Lewis *et al.*, 1996, Maxwell, 1997). Los inhibidores naturales se pueden dividir en no proteináceos como las cumarinas, que se unen a GyrB e inhiben la actividad ATPasa compitiendo por el sitio de unión del ATP (Maxwell, 1993) y proteináceos, como microcina B17 (MccB17), CcdB y Gyrl. Las dos primeras son toxinas codificadas en plásmido, cuya actividad consiste en estabilizar el complejo de corte DNA-girasa de manera dependiente de ATP (Vizan *et al.*, 1991; Bernard *et al.*, 1993; Liu, 1994; Couturier, 1998). Estos complejos actúan como obstáculos para las DNA y RNA polimerasas, que cuando colisionan con ellos, el corte hecho por girasa queda desprotegido y se hace evidente: La célula sensa lo anterior como cortes de doble cadena que se reparan por recombinación homóloga o de otro modo puede llevar a distintas formas de inestabilidad genética o causar la muerte celular (Drlica y Zhao, 1997).

CcdB forma parte de un módulo toxina – antitoxina codificados en el operón *ccdABresD*, cuyos genes *ccdA* y *ccdB* codifican para la antitoxina CcdA y la toxina CcdB, respectivamente. La toxina MccB17 es un péptido modificado postraduccionalmente que se encuentra codificada en el operón *mcbABCDEFG*.

En cuanto a los inhibidores sintéticos, se encuentran las quinolonas, como el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina, que se unen a girasa cuando la enzima se encuentra en complejo con el DNA, atrapando a la enzima en un complejo abortivo de manera similar a las proteínas MccB17 y CcdB.

Relacionado con los inhibidores de girasa, se ha demostrado que *in vitro* la proteína Gyrl inhibe la actividad de superenrollamiento de girasa (Nakanishi *et al.*, 1998). Sin embargo, *in vivo* este efecto no ha sido demostrado.

Además, la proteína tiene una acción protectora porque reduce los complejos estables de corte formados por CcdB-girasa-DNA y MccB17-girasa-DNA; incluso es capaz de revertir el complejo CcdB-girasa, pero no así el complejo MccB17-girasa (Chatterji y Nagaraja, 2002). *In vivo*, la sobreproducción de Gyrl protege a las células del efecto tóxico de MccB17 y CcdB, y de las quinolonas. Pero no tiene efecto protector sobre inhibidores del tipo de las cumarinas (Chatterji y Nagaraja, 2002; Chatterji *et al.*, 2003). La protección de Gyrl se extiende a mutágenos químicos como la Mitomicina C (MMC) y la *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG), que provocan entrecruzamiento y alquilación en el DNA, respectivamente. Aunque la sobreproducción de Gyrl parece proteger de agentes que dañan al DNA, no protege de la radiación UV (Chatterji *et al.*, 2003). La producción de niveles anormalmente altos o bajos de Gyrl provocan una supresión en la proliferación y viabilidad celular. Además, produce filamentación de algunas células y anormalidades en el nucleoide (Nakanishi *et al.*, 1998). A pesar de lo anterior no se conoce con certeza su función *in vivo* (Chatterji *et al.*, 2003).

La interacción de Gyrl con girasa, consiste en la unión de Gyrl específicamente los residuos 89-96 (Nakanishi *et al.*, 2002), a la holoenzima de la girasa, para

secuestrarla en un paso previo a su unión al DNA (Chatterji y Nagaraja, 2002). Esta interacción no depende de ATP (Nakanishi *et al.*, 2002).

Las toxinas codificadas en plásmido son principalmente utilizadas para competencia entre especies o intraespecies, además de asegurar la segregación del plásmido, así que la existencia de un inhibidor cromosómico como Gyrl genera preguntas sobre su función en la célula, particularmente cuando se analizan las condiciones de fase estacionaria, ya que Gyrl se expresa en su nivel más alto en esta fase y los niveles de girasa se mantienen igual a los presentes en fase exponencial.

HIPÓTESIS

Si se considera que:

1. El gene *gyrl* está regulado por LexA y por σ^S , como lo está *dinB*, y se induce al presentarse daño en el DNA y en fase estacionaria;
2. La DNA girasa no se degrada ni cambia su concentración durante la FS;
3. En esta fase la girasa se encuentra en exceso si se considera el bajo metabolismo del DNA, y el ATP disponible es menor, por lo que algunos ciclos de la girasa pueden quedar inconclusos como complejos de corte girasa-DNA. Dadas estas condiciones, el equilibrio dinámico de cortes en el DNA aumenta y cuando las DNA o RNA polimerasas encuentran en el DNA los complejos estables de corte girasa-DNA, se provoca que la horquilla de replicación o transcripción se colapse y que el corte se haga evidente. Esto inducirá la respuesta SOS que desencadena el mecanismo de mutación de FS.

Si Gyrl participa como un protector/inhibidor de girasa que se une en un paso previo de la unión de la girasa al DNA, debido a que en FS la cantidad de Gyrl es mayor, más moléculas de Gyrl se unirán a la girasa y se evitará que la girasa en exceso afecte el equilibrio dinámico de cortes y consecuentemente el procesamiento posterior del corte de doble cadena que inicia el mecanismo de generación de mutaciones en FS.

Por lo tanto, en una cepa mutante en *gyrl* se esperaría que la girasa pueda unirse al DNA sin impedimentos, aumentando la probabilidad de que la girasa corte al DNA y que no se completen más ciclos. Esto ocasionaría que se genere más

daño al DNA mediado por girasa, el cual se espera observar como un aumento en la frecuencia de mutación de FS.

OBJETIVO:

Estudiar la posible participación del gen *gyrI* en la generación de mutantes de fase estacionaria y en fase de crecimiento.

daño al DNA mediado por girasa, el cual se espera observar como un aumento en la frecuencia de mutación de FS.

OBJETIVO:

Estudiar la posible participación del gen *gyrI* en la generación de mutantes de fase estacionaria y en fase de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
FC29	$\Delta(lac-proAB)$ XIII <i>thi ara</i> [F' <i>proAB</i> ⁺ $\Delta(lacI-lacZ)$]	Cairns y Foster, 1991
FC40	$\Delta(lac-proAB)$ XIII <i>thi ara</i> Rif ^R [F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI33</i> $\Omega lacZ$]	Cairns y Foster, 1991
VGR41	FC40 <i>gyrI::kan</i>	Este trabajo
SMR4576	FC40 <i>upp::Tn10dtet+1</i>	Bull <i>et al.</i> , 2001
VGR42	SMR4576 <i>gyrI::kan</i>	Este trabajo
SMR4608	SMR4576 <i>recA::Tn10dcam</i>	Bull <i>et al.</i> , 2001
GM4792	<i>lacI33</i> $\Omega lacZ$	Foster y Trimarchi, 1995a
JR4792	GM4792 <i>gyrI::kan</i>	Este trabajo
VGR43	FC40 <i>recA::Tn10dcam</i>	Este trabajo
VGR44	VGR41 <i>recA::Tn10dcam</i>	Este trabajo
UGM505	MC4100 <i>gyrI::kan recA56</i>	Baquero <i>et al.</i> , 1995 \diamond
VGR45	FC40 <i>zed-3069::Tn10</i>	Este trabajo*
VGR46	FC40 <i>gyrI⁺ zed-3069::Tn10</i>	Este trabajo*
ZK4	MC4100 [F' <i>araD139</i> $\Delta lacU169$ <i>rpoL thiA recA56</i>] pPY113	Yorgey <i>et al.</i> , 1994 \odot

\diamond A partir de esta cepa se transdujo con el bacteriófago P1 *virA* la mutación *sbmC::kan* (*gyrI::kan*) a las cepas que fue necesario.

\odot Cepa sobreproductora de Microcina B17 (MccB17)

* Construidas por la Dra. Carmen Gómez (Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM) por cotransducción con el fago P1 a partir de la cepa CAG18451.

2. MÉTODOS DE GENÉTICA BACTERIANA

2.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS *gyrI* (*sbmC::kan*) y *recA::Tn10dcam* POR TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL FAGO P1 *virA*.

2.1.1 PROPAGACIÓN DEL FAGO P1 *virA*.

Para la construcción de las cepas mutantes *gyrI* se propagó al fago P1 *virA* en la cepa UGM505.

Se llevó a cabo un cultivo de 10 ml de la cepa UGM505 en medio rico (LB). El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una D.O._{550nm} de 0.4. Entonces, se le añadió CaCl₂ a una concentración final de 5 mM y se incubó a 37° por 10 minutos en agitación constante. Posteriormente, se mezcló un mililitro del cultivo con $\sim 10^7$ - 10^8 unidades formadoras de placa (ufp) del fago P1 y se incubó a 37°C por 20 minutos

sin agitación. La mezcla anterior se vació en tubos de medio LB con calcio 2.5 mM (LC), con 0.7% de agar, y se sembró en cajas de LC. Como control se hizo la misma mezcla sin fago P1. Las cajas se incubaron a 37°C por 18 horas. Para obtener al fago propagado, se agregó 1 ml de medio Luria a cada caja y se incubó a 4°C por 3 horas. El agar blando se colectó y se centrifugó para obtener el sobrenadante, donde estaba presente el fago. A lo anterior se le añadieron 50 µl de cloroformo para eliminar células contaminantes.

Todo el procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para enriquecer al fago P1 con el fragmento de DNA que comprende la región en la que se encuentra el gen *gyrI* mutado.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Baker)	10 g
Timina (Sigma)	20 µg/ml

El volumen se aforó a un litro con agua desionizada

El pH se ajustó a 7.0 con 1 ml de solución de NaOH (Baker) 2.5 N. El medio LB sólido se preparó de la misma forma, pero se le agregó Bacto-Agar (Difco) al 2%. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C a una presión de 22 libras.

En los medios que se requería antibiótico (kanamicina 25 µg/ml, cloramfenicol 25µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y tetraciclina 25 µg/ml), éste se adicionó después de que el medio había sido esterilizado y se encontraba a una temperatura aproximada de 50°C.

Medio Luria Calcio (LC) y LC agar blando

El medio se preparó del mismo modo que el medio LB sólido y únicamente se le adicionó glucosa a concentración final 0.2% y CaCl₂ 2.5 mM. Para los tubos de agar blando se utilizó el agar a concentración final 0.7%.

2.1.2 TITULACIÓN DEL FAGO P1 EN *Escherichia coli*.

Se inició un cultivo de células en 10 ml de medio LB a partir de un cultivo fresco de toda la noche. El cultivo se dejó crecer hasta una D.O_{550nm} de 0.4 y se centrifugó para concentrar el cultivo 10 veces. Posteriormente se hicieron mezclas

con 100 µl del cultivo, 100 µl de una solución de CaCl₂ 0.015 M y MgSO₄ 0.030 M y 100 µl del fago obtenido en la propagación. Del fago se realizaron diferentes diluciones (10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷) para poder obtener su título.

Las mezclas se incubaron por 20 minutos a 37°C sin agitación, después se agregaron a un tubo con medio LC y se sembraron en cajas de Petri con medio LC. Las cajas se incubaron a 37°C por 12 horas. Se contó el número de placas de fago P1 observadas en cada caja y se realizó el cálculo del título de P1 en relación a la dilución del fago utilizada.

2.1.3 TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON EL FAGO P1 *virA*.

Para construir las cepas VGR41, VGR42, JR4792 se utilizó el método de transducción generalizada con el fago P1 *virA*.

Se inocularon 200 µl de un cultivo fresco de toda la noche de la cepa a transducir (FC40, SMR4576, GM4792) en 10 ml de medio LB. El cultivo se dejó crecer hasta fase exponencial y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos; las células se resuspendieron en 1 ml de triptona al 1%. Un volumen de 500 µl de concentrado celular ($\approx 1 \times 10^9$ células/ml) se mezcló con 500 µl de una solución de CaCl₂ 0.015 M y MgSO₄ 0.030 M. La mezcla se mantuvo por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó a la mezcla P1 ($\approx 5 \times 10^7$ ufp) y se incubó a 37° C por veinte minutos sin agitación. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.5 ml de medio de dilución (MgSO₄, 10 mM). Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió 2 veces para eliminar el P1 fago libre y la pastilla celular se

resuspendió en 100 µl de medio de dilución. Todas las células se sembraron en cajas de medio LB con kanamicina (25 µg/ml) para seleccionar a las células transductantes. El mismo procedimiento se llevó a cabo para la transducción de la mutación *recA::Tn10dcam* de la cepa SMR4608 a la cepa FC40. En este caso la selección de las transductantes se hizo en medio LB con cloramfenicol (25 µg/ml). Para su almacenamiento, las cepas construidas se inocularon en 3 ml de LB o M1 y se crecieron durante toda la noche. De estos cultivos, 500 µl fueron transferidos a tubos con glicerol al 40% y se almacenaron a -70 °C.

Medio de dilución

MgSO₄ 10 mM

La solución se esterilizó a una presión de 22 libras por 15 minutos a 121°C.

Solución CaCl₂- MgSO₄

La solución se preparó con CaCl₂ 0.015 M y MgSO₄ 0.030 M a concentración final y se aforó el volumen a 10 ml.

2.2 VERIFICACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS MUTANTES *gyrI* (*sbmC*) y *recA*.

Las posibles colonias transductantes *gyrI* (Km^R) y *recA* (Cm^R) se sembraron en los medios correspondientes a las características de cada cepa.

Medio MacConkey.

Agar MacConkey (Difco) 50 g/L.

Este medio se esterilizó a una presión de 22 libras durante 20 minutos a 20°C.

Medio Mínimo M1 0.2% glucosa

NH ₄ Cl	0.6 M	Agar	2%
KH ₂ PO ₄	0.03M	Vitamina B1	1.6 X 10 ⁻⁴ µg/ml
Na ₂ HPO ₄	0.04M	MgSO ₄	0.03%
NaCl	0.009 M	Glucosa	0.2%
H ₂ O desionizada	1L		

El medio se aforó a 1 litro con agua. Las sales (NH₄Cl, KH₂PO₄, Na₂HP₄, NaCl) se prepararon por separado en 500 ml de agua desionizada y el agar en 500 ml del agua restante. El medio se esterilizó a una presión de 22 libras por 20 minutos a una temperatura de 121°C. Después de esterilizar se agregaron la vitamina B1, MgSO₄ y glucosa (todos esterilizados previamente).

2.2.1 VERIFICACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS MUTANTES *gyrf*.

Para su observación, las células de las cepas FC40, VGR41, VGR45 y VGR46 se crecieron del mismo modo que en el ensayo de FS (descrito posteriormente en el apartado 5). Después de su incubación por 30 horas en medio mínimo M9 con glicerol al 0.01%, las células se concentraron 10 veces para poder analizar un mayor número de ellas y 5 μ l de cada cultivo se observaron en un microscopio óptico Nikon E600 a 60X de aumento en DIC (“*differential interference contrast*”). Se fotografiaron con una cámara Hamamatsu Orca-II. Como referencia se observaron células de fase exponencial (crecidas en medio mínimo M9 con glicerol al 0.1% hasta una $D.O_{600}$ de 0.4, esta D:O. Se usó para asegurar que las células llegaran a fase exponencial.) para determinar el intervalo de tamaños presentes en esta fase. Se fotografiaron distintos campos que se visualizaron en la computadora por medio del programa Adobe Photoshop 7.0 y se determinó el porcentaje de células filamentadas para cada cepa.

2.3. VERIFICACIÓN DEL ALELO *gyrf* POR MEDIO DEL ENSAYO DE SENSIBILIDAD A MICROCINA B17.

Las cepas mutantes *gyrf* así como FC40 y UGM505 como testigos, se crecieron toda la noche en 3 ml de medio mínimo M9 con 0.2% glucosa. Después se sembraron 400 μ l de cada cultivo en 10 ml de medio mínimo 0.2% glucosa (Foster, 1991) y se crecieron hasta llegar a una $D.O_{600nm}$ de 0.4. Paralelamente se hizo un cultivo de toda la noche de la cepa ZK4 (sobreproductora de microcina B17) en el mismo medio. Los cultivos se diluyeron 10 veces y alícuotas de 100 μ l se

mezclaron con 3 ml de medio M1- agar blando con glucosa al 0.2%. La mezcla se vació en placas de M1 con glucosa 0.2%. Una vez que las placas gelificaron se agregó una gota con $\approx 5 \times 10^5$ células del cultivo de la cepa ZK4. Los cultivos se incubaron a 37°C por 12 horas. Posteriormente se midió el radio de los halos de inhibición del crecimiento y se comparó con los testigos. (Modificado de San Millán *et al.*, 1985).

Medio mínimo M9 Sales 10X

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.8 M
KH ₂ PO ₄	0.2 M
NaCl	0.09 M
NH ₄ Cl	0.2 M
H ₂ O desionizada	a 1000 ml

Las sales se disolvieron y se distribuyeron en volúmenes de 100 ml. Se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos y se retiraron inmediatamente antes de que la presión bajara a cero.

Solución de Glucosa 10%

10 gramos de glucosa se disolvieron en 75 ml de agua desionizada y se aforó a 100 ml. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos o por filtrado por membrana de Millipore de 0.45 µm.

Medio M9 0.2% glucosa (100 ml)

Medio M9 Sales 1X		(10 ml)
MgSO ₄	1 mM	(100 µl)
Tiamina	5 µg/ml	(50 µl)
Glucosa	0.2%	(1 ml)
CaCl ₂	1 x 10 ⁻⁴ M	(10 µl)
H ₂ O desionizada	88 ml	

Después de agregar el CaCl₂ el medio se mezcló inmediatamente para evitar la precipitación. El medio se prepara con los reactivos esterilizados previamente.

Placas de medio M9

Agar	2.5 %
M9 sales	1X
MgSO ₄	1 mM
Tiamina	5 µg/ml
Glucosa	0.2%
H ₂ O desionizada	890 ml

El agar se esterilizó en autoclave con las condiciones mencionadas anteriormente y se dejó enfriar para agregar el resto de los compuestos. El medio con agar blando se preparó del mismo modo, pero con el agar a 0.7% de concentración final.

2.4 VERIFICACIÓN DEL ALELO *recA* POR MEDIO DEL ENSAYO DE SENSIBILIDAD A LUZ ULTRAVIOLETA (UV) DE ONDA CORTA.

Las cepas VGR43 y SMR4608 se crecieron en medio LB hasta una D.O_{550 nm} de 0.4. Con los cultivos se hicieron líneas rectas en placas de medio mínimo (M1), que atravesaban toda la caja. Una vez secas las líneas de los cultivos (10-20 minutos), se procedió a irradiar las cajas.

La irradiación se efectuó con una fuente de luz UV de onda corta a 20 cm de distancia. Las cajas se irradiaron sin tapa por intervalos de 10, 20, 30 y 40 segundos (incluyendo un intervalo sin irradiar). Las cajas estaban cubiertas con papel aluminio y en cada intervalo de irradiación se descubría aproximadamente 1 cm de las líneas del cultivo. Al término de la exposición, las cajas se cubrieron con papel aluminio para evitar la activación de los sistemas de reparación fotoactivables y se incubaron a 37 °C (Ensayo modificado de Miller, 1972).

Medio mínimo M1

Como el descrito en el apartado 2.

2.5 ENSAYO DE MUTACIÓN DE FASE ESTACIONARIA .

Todas las cepas que participaron en este ensayo se crecieron en medio mínimo M9 glicerol 0.1 % (Miller, 1972), en tubos con 3 ml por 24 horas a 37°C, en agitación constante. Posteriormente, de los cultivos se hizo una dilución 10⁻⁵ en medio M9 glicerol al 0.01% y se crecieron por 30 horas en agitación constante en 10 cultivos separados de 1 ml cada uno. Los cultivos se cosecharon por centrifugación, se lavaron con NaCl 0.8% y se resuspendieron en 100 µl de NaCl al 0.8%; con excepción de la cepa mutante *gyrI*, la cual se resuspendió en 1 ml de

NaCl 0.8%. La cantidad de células presente en los cultivos fue de aproximadamente 10^8 células.

Paralelamente se hizo un cultivo de 24 horas de la cepa FC29 en M9 glicerol 0.1%. (Esta cepa utiliza todas las trazas de nutrientes que pudieran existir en el medio sólido, donde se sembró la cepa a probar junto con la FC29). La cepa FC29 se concentró por centrifugación 10 veces antes de realizar la mezcla, por lo que se siembra 10 veces más células de esta cepa que de la cepa en estudio.

Los cultivos concentrados de la cepa a probar se mezclaron con 100 μ l (10^9 células) de la cepa FC29 en 2.5 ml de M9 agar blando con 0.2% lactosa. En el caso de la cepa VGR41 (mutante *gyrI*) se utilizaron sólo 20 μ l del cultivo ($\approx 10^6$ células) para que el número de revertantes obtenidas se pudiera contar, pues de lo contrario se obtiene un número que no es posible contabilizar y se generan colonias que crecen aprovechando los metabolitos que las verdaderas mutantes excretan al medio y no porque hayan revertido la mutación. Las mezclas se vaciaron en placas de M9 con 0.2% de lactosa y se incubaron a 37°C por 5 días. Las colonias revertantes Lac⁺ se contaron diariamente a partir del día 2 y hasta el día 5.

Medio M9

Sales 10X

Descrito en el apartado 2.

Soluciones de glicerol y lactosa

Lactosa 10% o glicerol 10%

La solución de lactosa se hizo con alrededor de 75 ml de agua desionizada y se aforó a 100 ml con agua desionizada. Ambas soluciones se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos o por filtrado por membrana Millipore de 0.45 μ m.

Placas de M9 0.2% lactosa

Agar	2.5 %
M9 sales	1X
MgSO4	0.001 M

Tiamina	0.005 mg/ml
Lactosa	0.2%
H ₂ O desionizada	880 ml

El agar se esterilizó en autoclave con las condiciones mencionadas anteriormente y se dejó enfriar para agregar el resto de los compuestos. El medio con agar blando se preparó del mismo modo, pero con el agar a concentración final de 0.7%.

Medio M9 con glicerol al 0.1% (100 ml)

M9 Sales	1X
MgSO ⁴	1mM
Tiamina	5µg/ml
Gelatina	0.001%
Glicerol	0.1%
CaCl ₂	1 x 10 ⁻⁴ M
H ₂ O desionizada	88 ml

Al agua desionizada estéril se le agregaron todos los compuestos. Después de agregar el CaCl₂ el medio se mezcló inmediatamente para evitar su precipitación. En el caso del medio al 0.01% se realizó del mismo modo, únicamente se varió la concentración final de glicerol.

Agar MacConkey.

El agar Mac Conkey se preparó del mismo modo que en el apartado 2 y después de esterilizar se le agregó rifampicina 100 µg/ml.

2.5.1 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN.

Para determinar la frecuencia de mutación, se calculó el número de células viables presentes en las placas. Este número se determinó removiendo de la placa un fragmento circular de 0.8 cm que se fragmentó en partículas pequeñas. Después, se hicieron las diluciones necesarias hasta obtener un número de células entre 50 y 200 que permitiera contarlas. Las células se sembraron en placas de agar MacConkey con 100 µg/ml de rifampicina para evitar que las células de la cepa FC29 (Rif^S) crecieran. Después se hizo el ajuste con respecto al tamaño de la caja.

La frecuencia acumulada de revertantes Lac⁺ se determinó contando las colonias blancas que se observaron a partir del día 3 de incubación (Cairns y Foster, 1991).

2.6 ENSAYO DE FLUCTUACIÓN.

Para conocer las tasa de mutación en fase de crecimiento exponencial, se llevaron a cabo los ensayos de fluctuación (Voogd, 1977) con las cepas FC40, VGR41, SMR4576 y VGR42. Las cepas se crecieron por 24 horas (hasta aproximadamente 3×10^9 células/ml) en medio LB en agitación constante a 37 °C. A partir de ese cultivo se hizo una dilución 10^{-7} y se inocularon ≈ 100 células en 1.5 ml de medio de cultivo NB (“*Nutrient Broth*”) en 50 cultivos separados. Los cultivos se incubaron por 20 horas a 37 °C en agitación constante. Posteriormente, cada cultivo se centrifugó, la pastilla de células se resuspendió en 300 μ l de MD, se mezcló en tubos con agar LB al 0.7%, que contenían el antibiótico correspondiente (estreptomicina 200 μ g/ml, ácido nalidíxico 20 μ g/ml o tetraciclina 25 μ g/ml) y se sembró por vaciado en placas de LB con el antibiótico respectivo. Las cajas se incubaron por 48 horas en el caso de estreptomicina y 24 horas para ac. nalidíxico y tetraciclina (Bull *et al.*, 2001). Las colonias se contaron en cada placa (mutantes espontáneas) y se realizaron los análisis estadísticos pertinentes: media, mediana y tasas de mutación.

Las tasas de mutación fueron calculadas por el método de Po en el caso de las mutantes seleccionadas en estreptomicina y por el estimador de la mediana de Jones para las mutantes obtenidas en tetraciclina y ac. nalidíxico.

El método de Po (Po=proporción de cultivos sin mutantes) calcula la tasa de mutación con la siguiente fórmula $m = -\ln P_o$.

El estimador de la mediana de Jones calcula la tasa de mutación con la fórmula $m = [r - \ln(2)] / \ln(\bar{r}) - \ln[\ln(2)]$; Donde r = media del número de mutantes en un

cultivo y \bar{x} = mediana del número de mutantes en un cultivo. (Rosche y Foster, 2000).

Medio “Nutrient Broth” (NB).

Medio “NutrientBroth”	10	g
NaCl	8	g
Triptofano	0.02	mg/ ml

El volumen se aforó a un litro con agua desionizada.

El medio se esterilizó a presión de 22 libras por 20 minutos a 121°C. El medio con agar blando se prepara del mismo modo, pero usando el medio nutrient Broth con el agar al 0.7%.

Placas de medio LB con antibiótico.

El medio se preparó igual que en el apartado 2. Los antibióticos agregados fueron: estreptomicina 200 µg/ml, ácido nalidíxico 20 µg/ml, tetraciclina, 25 µg/ml, del mismo modo que el descrito en el apartado 2.

3. MÉTODO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1 VERIFICACIÓN DEL GENOTIPO DE LAS CEPAS MUTANTES *gyrI* POR MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

La verificación del reemplazamiento del gene silvestre *gyrI* por el alelo mutado *gyrI::kan* se llevó a cabo por PCR. El transposón Tn5 se encuentra insertado a 91 pares de bases corriente abajo del codón ATG de inicio de traducción. Los oligonucleótidos que se utilizaron GYRI5 “forward” (5'-GACCTTTCTTTTGCAGCAGACTGG-3') y GYRI3 “reverse” (5'-ACACACCGCCCTGAGATGAATTAG- 3'), hibridan a partir de la base 96 a la base 120 corriente arriba del ATG, y 467 a 491 corriente abajo del ATG, respectivamente. Este par de oligonucleótidos permite amplificar un fragmento de 614 pb dentro del gene silvestre *gyrI* (Figura 7). Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 54 °C por 30 seg y 72 °C por 45 seg, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La reacción se realizó en un

termociclador Perkin Elmer 9600 con la mezcla de PCR indicada por el proveedor Invitrogen para la DNA polimerasa Taq. El producto de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

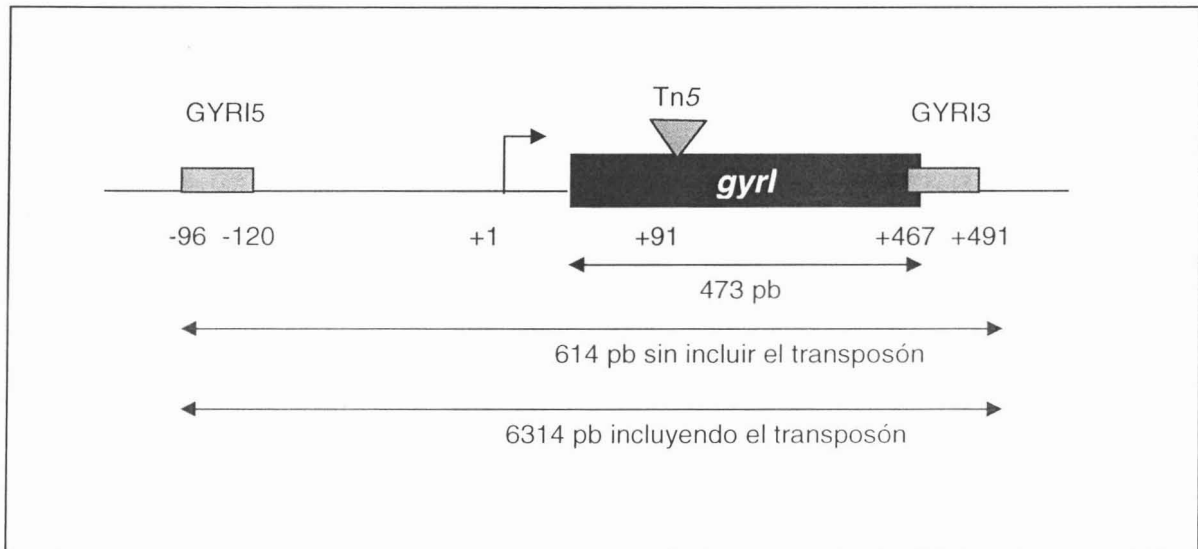


Figura 7. Ubicación de los oligonucleótidos GYRI3 y GYRI5. Los oligonucleótidos GYRI5 "forward" y GYRI3 "reverse" hibridan a partir de la base 96 a la base 120 corriente arriba del ATG, y 467 a 491 corriente abajo del ATG, respectivamente. Este par de oligonucleótidos permite amplificar un fragmento de 614 pb dentro del gen silvestre *gyrl*.

RESULTADOS

1. Verificación del fenotipo de las cepas *gyrf*.

1.1 Verificación fenotípica por observación al microscopio.

Las cepas *gyrf* fueron construidas a partir de transducción generalizada con el bacteriófago P1 *virA* propagado en la cepa UGM505; el gen se transdujo a la cepa FC40 o derivadas (VGR41, VGR42 y JR4792), que se utilizaron en los ensayos de mutación de fase estacionaria (FS). La cepa *gyrf::kan* (UGM505) construida por el grupo de Baquero *et al.* (1995), no presenta un fenotipo distintivo. Sin embargo, se ha observado la filamentación de algunas células así como irregularidades en los nucleoides y una disminución en la viabilidad y proliferación celular, cuando se induce la sobreexpresión de *gyrf* o de un RNA anti-sentido de *gyrf* (Ohnuki *et al.*, 1998). Por lo anterior, en este trabajo se llevaron a cabo observaciones en microscopio óptico para determinar si las células mutantes *gyrf::kan* derivadas de la FC40 presentaban algún cambio en su morfología. Además, para el ensayo de mutación de FS (mencionado en materiales y métodos) es necesario obtener la viabilidad celular y de existir filamentación se debe ajustar la cuenta viable. Las observaciones de FS se hicieron en células crecidas de acuerdo al protocolo de mutación de FS, es decir, en cultivos independientes por 24 horas que se diluyeron 10^{-5} veces y se volvieron a crecer por 30 horas. Después, se lavaron con NaCl al 0.8% y se concentraron 10 veces. Se tomaron 5 μ l para la observación al microscopio. La observación se realizó también en células en fase exponencial de crecimiento (FE), en medio M9 con glicerol 0.1% hasta una D.O₆₀₀ de 0.4, para tener como referencia el intervalo de tamaños celulares existentes en esta fase.

Se observó a estas células para después determinar las mutantes ya presentaban una morfología distinta de la cepa silvestre en la FE y/o si en FS había cambios morfológicos como filamentación. Las células se observaron a 60X en DIC (“*differential interference contrast*”) en un microscopio óptico Nikon E600. Las imágenes se capturaron con una cámara Hamamatsu ORCA - II y se visualizaron en la computadora a través del programa Adobe Photoshop 7.0.

Se observaron diferentes campos con un total de 1930 células para la cepa silvestre y 1644 para la mutante *gyrI* y se realizó el análisis estadístico correspondiente. Los resultados muestran que la cepa silvestre en FS (Figura 8C) presenta un grado de filamentación muy bajo, estimado en 0.46 % y la cepa mutante (Figura 8D) un 1.2 %, por lo que no se observa una diferencia significativa en el grado de filamentación de ambas cepas. Cabe mencionar que los filamentos en FS de la cepa *gyrI* tienen una longitud mayor (aproximadamente 3.5 veces más) que los de la cepa silvestre; las células *gyrI*, en su mayoría presentan una longitud menor que la cepa silvestre, incluso que la misma *gyrI* en FE (Figura 8B). El parámetro tomado como referencia para determinar el porcentaje de filamentación, fue el intervalo de los tamaños presentes en la cepa silvestre (Figura 8A) correspondientes al tamaño mínimo de una célula y al doble en masa celular en fase exponencial (tamaños arbitrarios).

También se realizó la observación de las cepas VGR45 (FC40 *zed-3069::Tn10*) y VGR46 (*gyrI*⁺ *zed-3069::Tn10*) y se comprobó que no existe una diferencia significativa entre ambas cepas y la silvestre FC40. Esto es, decir tenían un fenotipo silvestre para este carácter.

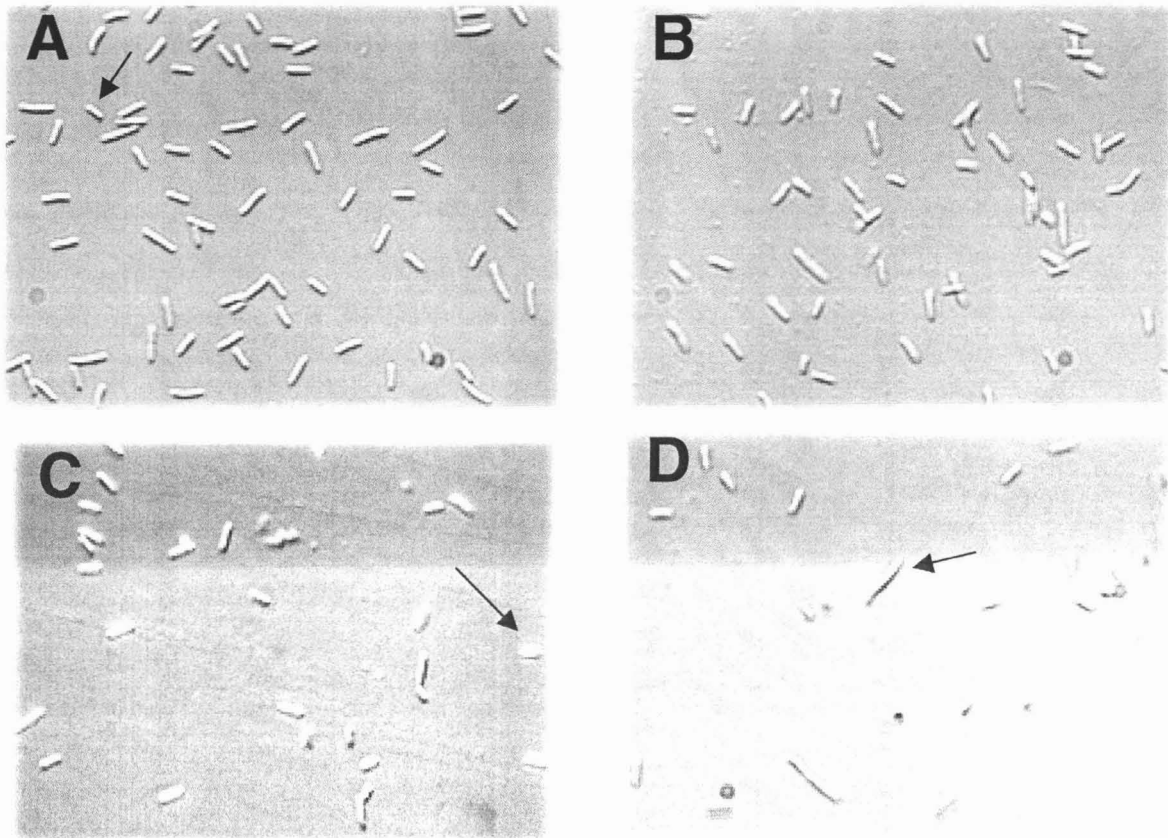


Figura 8. Morfología de las cepas en fase exponencial de crecimiento y fase estacionaria. Cultivos de las cepas FC40 en fase exponencial (panel A) y fase estacionaria (panel C); VGR41 mutante en *gyrI* en fase exponencial (panel B) y fase estacionaria (panel D). Los cultivos se crecieron de la misma forma en la que se realizan los experimentos de mutación de FS (protocolo Cairns y Foster, 1991). Los cultivos se concentraron 10 veces y 5 μ l del cultivo se observaron al microscopio. Las flechas muestran una célula individual en la cepa silvestre y una célula filamentada en la mutante *gyrI*.

1.2 Verificación de la sensibilidad a Microcina B17 (MccB17)

La sobreexpresión del gene *gyrI* permite que las células adquieran mayor resistencia a la toxina plasmídica MccB17, mientras que su ausencia provoca mayor sensibilidad a la misma (Moreno *et al.*, 1995). Esta toxina es un péptido modificado postraduccionalmente que arresta la replicación y por lo tanto induce la respuesta SOS. La Microcina B17 induce cortes de doble cadena de DNA

mediados por la girasa, ya que estabiliza el complejo transitorio de corte entre la DNA girasa y el DNA.

Para poder comparar el nivel de sensibilidad de las bacterias a MccB17 se utiliza un ensayo en el que sobre un césped de la bacteria en prueba, se siembran 5×10^5 células de una cepa sobreproductora de la toxina MccB17. Lo anterior inhibe el crecimiento alrededor de la cepa sobreproductora. La diferencia de sensibilidad entre una cepa *gyrI⁺* y una *gyrI⁻* es un halo de inhibición del crecimiento del doble de tamaño del radio (San Millán *et al.*, 1985).

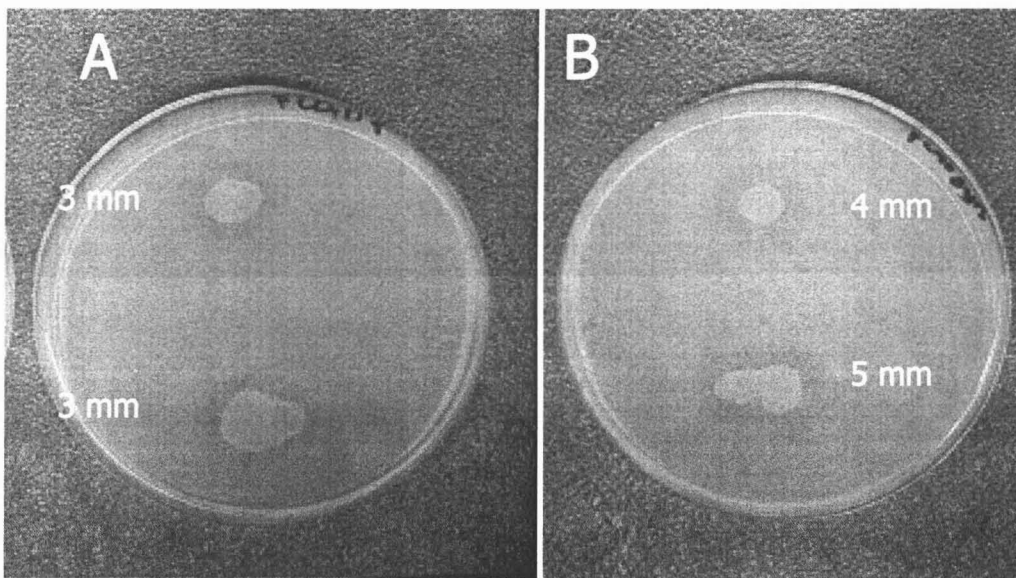


Figura 9. Sensibilidad de las células *gyrI* a MccB17 . Las cepas se crecieron en medio M9 glucosa hasta una $D.O_{600nm}$ de 0.4. La cepa sobreproductora ZK4 se creció en medio LB hasta que llegó a fase estacionaria. Los cultivos de la cepa a probar se mezclaron con M9 agar blando y se vaciaron en placas. Una vez que el agar solidificó, se agregó una gota de $5 \mu l$ de $\approx 5 \times 10^5$ células de la cepa sobreproductora de MccB17 y se incubó toda la noche. [Panel A, césped de FC40 silvestre. Panel B, césped de VGR41 (*gyrI*)]. Los radios fueron promediados con un duplicado. La figura es representativa de 4 observaciones.

El ensayo de sensibilidad a MccB17 se llevó a cabo para las mutantes *gyrI* (con sus respectivos testigos), de las que se puede observar en la Figura 9 a las cepas FC40 y VGR41. La cepa FC40 presentó un halo de inhibición promedio de 3 mm de diámetro, mientras que su mutante *gyrI* (cepa VGR41) presentó un halo de

alrededor 4 y 5 mm. Resultados similares se observaron en las otras cepas mutantes *gyrl*. Esto confirmó la presencia de la mutación *gyrl* en las cepas VGR41, VGR42 y JR4792, pues el diámetro del halo de inhibición siempre fue mayor al obtenido en la cepa silvestre.

2 . Verificación genotípica de la mutación *gyrl* por PCR.

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de 614 pares de bases del gen *gyrl* silvestre con los oligonucleótidos GYRI3 y GYRI5. La figura 10 muestra la presencia del fragmento esperado de 614 pb, que corresponde al gene *gyrl* en las cepas FC40 (carril 2), VGR45 (carril 3) y VGR46 (carril 5). Los mismos resultados se observaron para la cepas SMR4576 y JR4792.

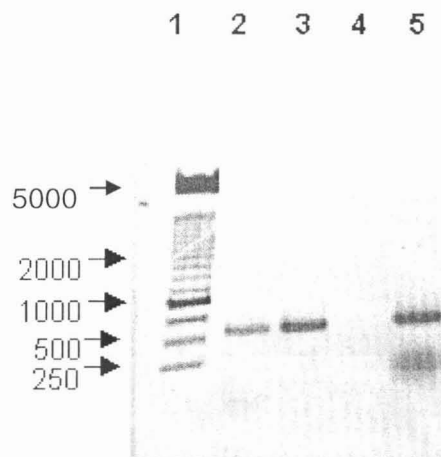


Figura 10. Amplificación por PCR del fragmento de 614 pb correspondiente al gen *gyrl*. La reacción se llevó a cabo con los oligonucleótidos GYRI3 y GYRI5. Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de amplificación se especifican en materiales y métodos. Carril 1, marcador de tamaños (pb); carril 2, FC40; carril 3, VGR45; carril 4, VGR41(*gyrl*); carril 5 cepa VGR46.

La reacción con estos oligonucleótidos permitiría que en las cepas *gyrl* se amplificara el fragmento de *gyrl* incluido el transposón, sumando 4986 pb. Sin

embargo, no fue posible la amplificación del fragmento esperado, posiblemente por el tamaño. Sin embargo, la reproducibilidad en los ensayos de PCR de la ausencia del fragmento de *gyrI*, sugiere que el gene silvestre no está presente.

3. Verificación fenotípica del alelo *recA*⁻.

La ausencia del gene *recA* provoca una eficiencia baja tanto en la reparación y recombinación del DNA, ya que la proteína RecA tiene varias funciones relacionadas con la reparación del DNA dañado que garantiza la viabilidad celular.

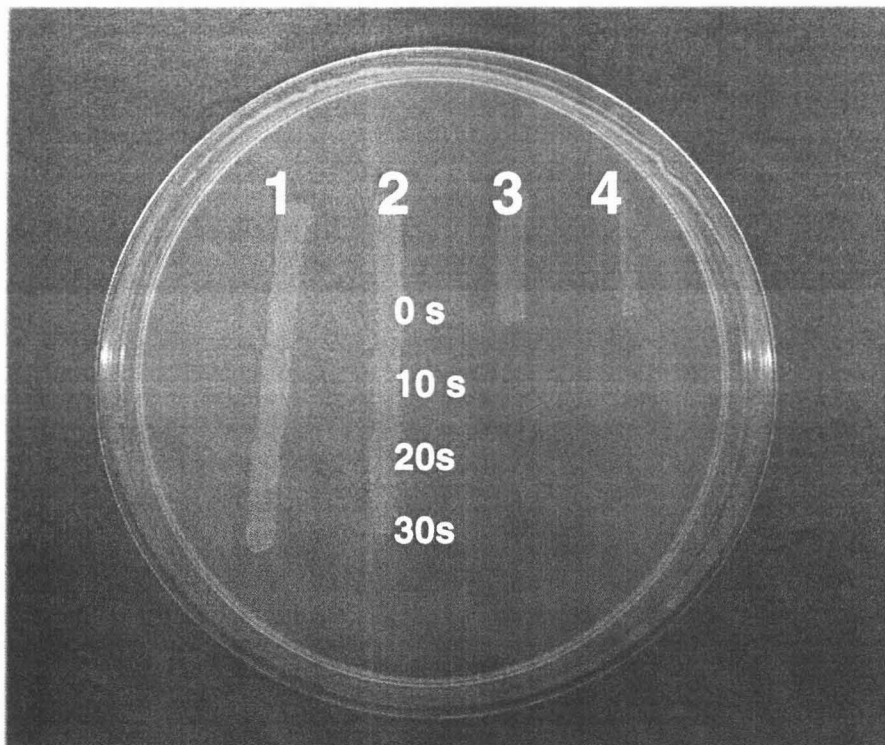


Figura 11. Verificación del alelo *recA*⁻ por sensibilidad a luz UV. Las cepas se crecieron en medio LB hasta una D.O_{550nm} de 0.4. Se trazaron líneas verticales en placas de M1 de cada uno de los cultivos y después que secaron, se irradiaron con una fuente de luz UV de onda corta por 0, 10, 20 y 30 seg. Terminada la irradiación las cajas se cubrieron con papel aluminio y se incubaron toda la noche a 37°C. Línea 1, FC40; línea 2, VGR41 (*gyrI*⁻); línea 3, VGR43 (*recA*⁻); línea 4 VGR44 (*gyrI*⁻ *recA*⁻).

Las células carentes de esta proteína presentan defectos en los sistemas de reparación y recombinación y no son capaces de sobrevivir a la exposición a la luz UV.

En el ensayo de sensibilidad a UV (Figura 11) se observó que la cepa silvestre (línea 1) y la mutante *gyrI* (línea 2) son capaces de soportar la irradiación a UV de 40 segundos, mientras que las cepas *recA*⁻ (líneas 3 y 4), como se esperaba, no sobreviven a la irradiación. Esto confirma la presencia de la mutación en *recA* en la cepa VGR43. En todas las mutantes *recA* no se presenta crecimiento alguno después de la incubación, de acuerdo a lo esperado. La presencia de la mutación en *gyrI* no afecta el fenotipo causado por la mutación *recA* (línea 4).

4. La ausencia del gen *gyrI* incrementa las mutaciones de fase estacionaria.

Los niveles de DNA girasa presentes en FS se mantienen constantes y la expresión de los genes que la codifican también es mayor en esta fase. Además, la transcripción de *gyrI* (regulado positivamente por σ^S), así como la cantidad de la proteína Gyrl son mayores en FS (Baquero *et al.*, 1995, Nakanishi *et al.*, 1998). Partiendo de estos datos se estudió si *gyrI* afecta la frecuencia de mutación de fase estacionaria. Si se considera que en FS el ATP presente y disponible es menor que en fase exponencial, y que la actividad de girasa depende de ATP, es posible que la enzima no termine su ciclo de reacción quedando atrapada en el complejo covalente de corte; la síntesis de DNA en FS puede hacer evidentes los cortes de doble cadena, que se procesarían como daño al DNA. Esta actividad de girasa, en una cepa silvestre, estaría controlada por Gyrl, es decir habría menos

cortes mediados por la girasa; en cambio, en una mutante *gyrf* se vería aumentada. Para verificar si *Gyrf* provocaba un aumento en la frecuencia de mutación de FS, se hicieron ensayos de mutación de fase estacionaria con el alelo mutante *gyrf::kan* dentro del modelo de la cepa FC40. Se utilizó el ensayo de mutación de fase estacionaria porque es una forma indirecta de estudiar el daño al DNA.

Los resultados muestran que la mutación *gyrf* incrementa la frecuencia de mutación de FS de 80 a 100 veces. Este comportamiento se observa a partir del día 3 y hasta el día 5; la frecuencia acumulada se incrementa linealmente (Figura 12A). El día 2 no se toma en cuenta, ya que en este día sólo se observan las mutantes que se generaron durante el crecimiento del cultivo, es decir previamente a la incubación con lactosa. Las revertantes Lac^+ que se generan en en las placas requieren de dos días para formar una colonia visible.

Al observar este efecto en la frecuencia de mutación, se podría pensar que el gene *gyrf* interviene en el mecanismo de generación de este tipo de mutaciones en el sistema *lac*. Para confirmar que se tratara de un efecto derivado de la ausencia de *gyrf* se introdujo un alelo silvestre en el cromosoma (figura 12B). La figura 12B es una ampliación de la parte inferior de la figura 12A, ya que en la figura 12A la frecuencia de mutación tan alta de la cepa mutante no permite hacer un ajuste en la escala que haga posible apreciar el comportamiento de la cepa silvestre así como de las cepas con un alelo cromosomal silvestre y su control.

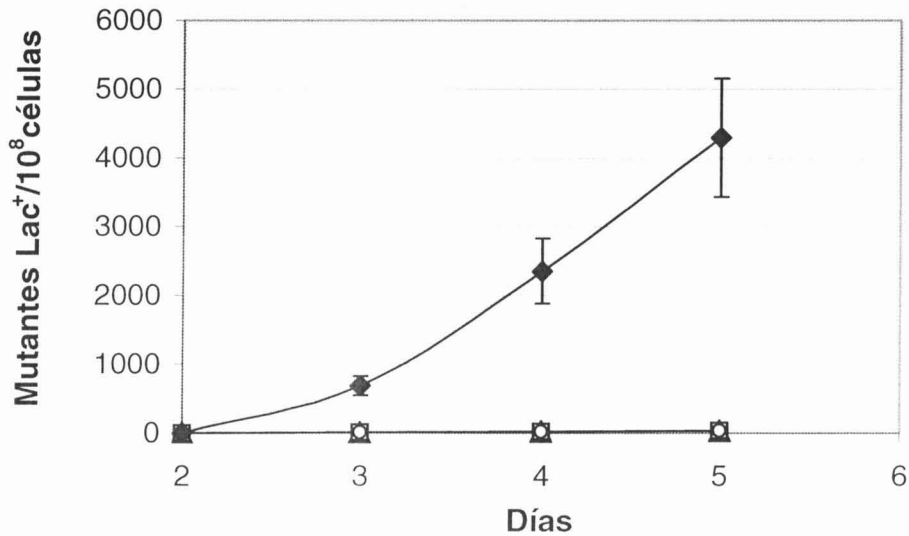
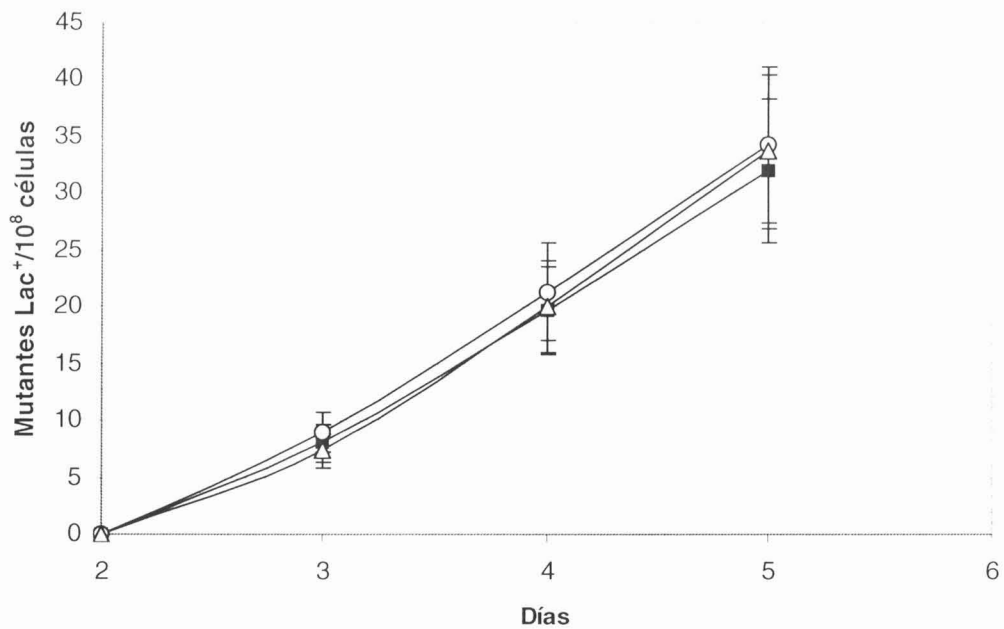
A**B**

Figura 12. El alelo *gyrI* incrementa la frecuencia de mutación de fase estacionaria. Panel A, frecuencia de mutación para la cepas mutantes y una cepa con un alelo silvestre cromosomal. Panel B, ampliación de la parte inferior de la figura 12A. Los cultivos se crecieron siguiendo el protocolo de Foster y Cairns (1991). Las cepas se crecieron en M9 por 24 horas, posteriormente se hizo una dilución 10^{-5} y se crecieron en cultivos independientes (8-10) por 30 horas. Se sembraron $\approx 1 \times 10^8$ células/ caja, pero de la cepa *gyrI* se sembró $\approx 10^6$ células/caja para poder cuantificar las colonias con facilidad. \blacklozenge , VGR41(*gyrI*); \blacksquare , FC40; \circ , VGR45 ; \triangle , VGR46 (*gyrI*). Las barras representan el SEM (Error estándar de la media) de 3 experimentos.

Así, en esta ampliación se observa que el efecto producido por la mutación en *gyrI* puede ser revertido totalmente con un alelo *gyrI*⁺ cromosomal y que la introducción del transposón Tn10 no provoca un efecto adicional en la frecuencia de mutación. A partir de lo que muestra la figura 12B, se puede afirmar que el cambio en la frecuencia de mutación es únicamente causado por la mutación en *gyrI*, regresando la frecuencia de mutación al estado silvestre. Este dato sugiere que *gyrI* podría ser un antimutador, ya que en su ausencia la frecuencia de mutación aumenta considerablemente en este sistema (Figura 12B).

5. La mutación *gyrI* no incrementa la frecuencia de mutación de fase estacionaria en Lac cuando el alelo *lacIZ33* se encuentra en el cromosoma.

Al observar una frecuencia de reversión tan alta cuando *lacIZ33* está en el plásmido, se decidió probar si el efecto se conservaba cuando *lacIZ33* se localiza en el cromosoma. La fusión *lacIZ33* en el modelo de la cepa FC40 se ubica en un plásmido F', Además es conocido que cuando la fusión se ubica en el cromosoma, la frecuencia de reversión disminuye 100 veces y no depende de RecA (Foster y Trimarchi, 1995a). Este no es el único caso estudiado de genes monitores en el cromosoma, pero siempre se observa una clara disminución de la frecuencia de reversión, independientemente del tipo de monitor utilizado.

Para determinar si el efecto de la mutación en el gene *gyrI* dependía también de esta condición, se llevó a cabo un ensayo de mutación de FS con la cepa VGR43 con el alelo *lacIZ33* en el cromosoma. Los resultados muestran que las cepas mutante *gyrI* y la silvestre disminuyen la frecuencia de mutación alrededor del 80% con respecto a la cepa silvestre con el alelo *LacIZ33* en el plásmido F' (Tabla

2), lo que indica que la ausencia de *gyrf* no afecta la frecuencia de mutación si la fusión *lacIZ33* está en el cromosoma. Este comportamiento confirma la importancia de la presencia de *lacIZ33* en el plásmido en el fondo genético *gyrf*.

TABLA 2

Frecuencia de colonias Lac⁺ al día 5, cuando la fusión *lacIZ33* se encuentra en el cromosoma o en el plásmido F' en un fondo *gyrf* y *gyrf*⁺.

Posición del alelo <i>lacIZ33</i>	Genotipo <i>gyrf</i>	Revertantes Lac ⁺ en 10 ⁸ células
En plásmido en F' *	+	42 ± 6.6
En plásmido en F' **	-	4371 ± 420
En el cromosoma ^a	+	0.83 ± 0.16
En el cromosoma ^b	-	0.975 ± 0.24

- * cepa FC40
- ** cepa VGR41
- ^a cepa GM4792
- ^b cepa JR4792.
- ± representa el SEM de 3 experimentos.

6. El incremento de la frecuencia de mutación de FS inducida por *gyrf* es dependiente de RecA.

Sabiendo que el mecanismo por el que se generan las mutaciones en el plásmido F' es el que se origina a partir de cortes de doble cadena, cuyo posterior procesamiento depende de RecA (Cairns y Foster, 1991; Bull *et al.*, 2000), se determinó con la cepa VGR43 (*recA*⁻) si el incremento en la frecuencia de mutación observado dependía de las funciones de recombinación donde participa RecA.

Los resultados muestran que la frecuencia de mutación a partir del día 3 al día 5 se ve disminuida alrededor de 3 veces en la cepas VGR44 (*recA*⁻*gyrf*) y VGR43

(*recA*⁻) con respecto a la cepa silvestre (Figura 13). La cepa *gyrI recA*⁻ no presenta un incremento como el obtenido en la mutante *gyrI*. Lo anterior sugiere que las funciones desempeñadas por el gen *recA* que permiten la reparación y recombinación del DNA dañado, son indispensables para la reversión a Lac⁺ también en una cepa *gyrI*, indicando que el mecanismo por el cual se generan estas mutantes sigue el modelo propuesto por Bull *et al.* (2000a).

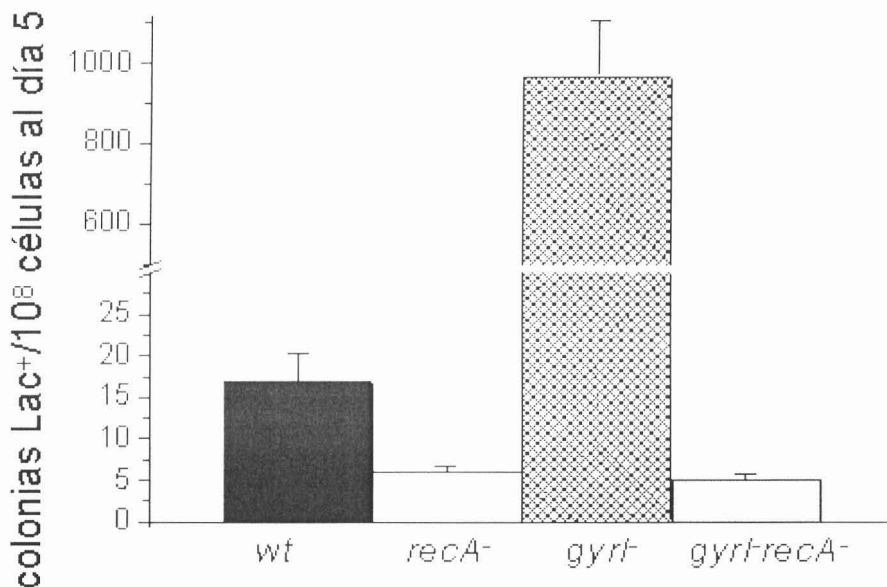


Figura 13. La frecuencia de mutación de FS inducida por *gyrI* depende de RecA. Las cepas se crecieron siguiendo el protocolo de mutación de FS. Los datos muestran la frecuencia de mutación de las cepas al día 5. wt, cepa FC40; *recA*⁻, cepa VGR43; *gyrI*⁻ cepa VGR41; *gyrI-recA*⁻, cepa VGR44. Las barras representan el SEM de 3 experimentos.

7. Las revertantes Lac⁺ no se generan por amplificación de la región *lac*.

Debido a que existen dos formas en las que se puede generar una colonia Lac⁺, una por la corrección de la mutación fuera de fase (mutación puntual) y la otra por amplificación de la región *lac*, se llevó a cabo un ensayo del fenotipo de las

microcolonias Lac⁺, con la finalidad de saber si las mutantes Lac⁺ obtenidas en un fondo genético *gyrf* tenían su origen por amplificación de la región *lac* o por mutación puntual.

Para lo anterior, se procedió a aislar y resembrar 100 minicolonias Lac⁺ de la cepa silvestre y 100 de su mutante en medio LB con rifampicina (para eliminar a las posibles células de la cepa FC29) y con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) para diferenciar si el fenotipo Lac⁺ era debido a una mutación puntual (azul), o a un evento de amplificación inestable (sectores blancos y azules). La Figura 14 muestra el ejemplo de los fenotipos Lac⁺.

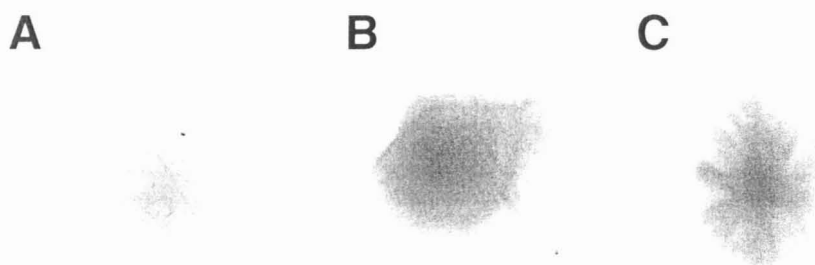


Figura 14. Fenotipo de las colonias Lac⁺. Las cepas se crecieron en M9 con glicerol (protocolo Foster y Cairns, 1991) y las microcolonias obtenidas al día 5 de incubación en M9 con 0.2% de lactosa. Se resembraron en cajas de medio LB con Rif 100 µg/ml y X-gal. Las cajas se incubaron por 48 horas y se observaron al microscopio estereoscópico. Panel A, Colonia Lac⁺; panel B, colonia Lac⁺ proveniente de mutación puntual; panel C colonia Lac⁺ proveniente de amplificación. Las observaciones se hicieron por triplicado.

El análisis de la proporción de colonias muestreadas para ambas cepas y su comparación permitió determinar que la mayor parte de las colonias Lac⁺ en ambas cepas provienen de mutaciones puntuales en las que se corrigió la mutación fuera de fase +1. De la fracción que presentaba el fenotipo con sectores correspondientes a un evento de amplificación, no existe una diferencia

significativa entre el número de éstas en la cepa *gyrf* con respecto a su silvestre, este dato se obtuvo por medio de una prueba de Z con una confianza de 95%. Por lo anterior se puede concluir que la gran mayoría de las colonias Lac⁺ son mutantes puntuales que corrigen el frameshift +1 y se puede sugerir que se generan debido a cortes de doble cadena que se reparan por recombinación homóloga.

8. El gen *gyrf* no interviene en la generación de mutaciones durante el crecimiento.

A partir de los resultados obtenidos en condiciones de fase estacionaria (Figura 12), en los que se observa que el gen *gyrf* incrementa considerablemente la frecuencia de mutación en Lac, pareciendo ser un antimutador, se decidió probar si la mutación *gyrf* provocaba algún efecto en la tasa de mutación en células en fase exponencial. Para verificar lo anterior, se llevaron a cabo ensayos de fluctuación y se contaron las mutantes espontáneas que crecieron en los marcadores seleccionados. Estos fueron ácido nalidíxico y estreptomina, dos monitores de mutación puntual (uno en la subunidad *gyrA* de la girasa y el otro en genes que codifican a proteínas ribosomales) y una mutación de corrimiento del marco de lectura en tetraciclina *upp::Tn10dtet+1*. Como se observa en la Tabla 3, no existe diferencia significativa en las tasas de mutación entre las cepas mutante y silvestre para el gen *gyrf*. Esto independientemente del tipo de mutación que se evaluó con cada uno de los marcadores. Los resultados sugieren que el gene *gyrf* no actúa como un antimutador generalizado, sino más bien como un protector de mutaciones de fase estacionaria.

TABLA 3

Tasa de mutación durante la fase de crecimiento exponencial en un fondo genético *gyrf*.*

Cepa	genotipo <i>gyrf</i>	Resistencia a		
		Ac. nalidíxico ^a	Estreptomicina ^b	Tetraciclina ^a
FC40	+	1.06 (± 0.4) x 10 ⁻¹⁰	9.68 (±0.9) x10 ⁻¹²	3.18 (± 0.3) x 10 ⁻¹⁰
VGR41	-	1.11 (± 0.49) x 10 ⁻¹⁰	1.14(±0.37) x10 ⁻¹¹	2.2 (± 0.23) x10 ⁻¹⁰

Los cultivos se crecieron en medio "nutrient broth" a saturación, se mezclaron con LB agar blando con el antibiótico correspondiente y se sembraron en cajas de LB con el antibiótico respectivo. Entre paréntesis se indica el SEM de tres experimentos.

^a Se incubaron por 24 horas

^b se incubaron por 48 horas.

* Tasa de mutación/célula/generación

DISCUSIÓN

E. coli se enfrenta comúnmente en sus nichos ecológicos a condiciones de fase estacionaria (FS), en donde los nutrientes son limitantes y responde mediante la expresión de un programa genético que induce diferentes cambios, morfológicos y fisiológicos, para contender con estas condiciones.

Durante la FS no todas las células responden de la misma forma, así que se forman distintas poblaciones que difieren en composición, morfología y genotipo (Finkel y Kolter, 1999; Nystrom, 2004; Ramírez *et al.*, 2005 en prensa).

También se han reportado distintos tipos de mutación en FS, entre ellas la mutación de fase estacionaria o “adaptativa”, la cual se presenta cuando las células están sometidas a un estrés no letal que limita el crecimiento y la división celular (Foster, 2000; Rosenberg, 2001). El evento que permite que este tipo de mutaciones se genere es la presencia de cortes en el DNA, principalmente de doble cadena, los cuales se reparan por recombinación homóloga.

Retomando la situación de las células en esta fase y específicamente en las de mutación de FS, los nutrientes disponibles son pocos y su capacidad energética es baja, por lo que la actividad de la DNA girasa, que requiere ATP, se ve afectada.

El interés de este trabajo se centró en analizar y entender mejor la función del gen *gyrl* partiendo de los datos de Nakanishi *et al.* (1998), en los que se muestra que en fase estacionaria, la proteína Gyrl se encuentra en mayor cantidad en la célula y de los datos de Reyes-Domínguez *et al.* (2003) que mostraron que los niveles de

girasa se mantienen constantes en FS. La exploración se hizo a través de un ensayo de mutaciones de fase estacionaria en la cepa modelo FC40 para poder evaluar indirectamente el daño al DNA por cortes de doble cadena, del cual se sabe que GyrI protege (Chatterji y Nagaraja, 2002).

Los resultados de los ensayos de mutación de FS muestran que la mutación *gyrI* en la cepa FC40 produce un dramático aumento en la frecuencia de mutación. El aumento es de alrededor de 80 a 100 veces del día 3 al 5 de incubación. Estos niveles de aumento ya se habían observado en estudios de mutación de FS en cepas mutantes en *recG* y en *mutL* (Foster *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997). RecG es una proteína involucrada en la migración del entrecruzamiento del DNA en la recombinación homóloga mientras que la proteína MutL forma parte del sistema de reparación de apareamiento erróneo de bases MMR. También una mutación en *recD* (RecD es la endonucleasa del sistema de recombinación homóloga RecBCD), incrementa 5 veces la frecuencia de mutación de FS (Foster y Rosche, 1999b). En el primer caso se propone que el aumento en la frecuencia de mutación se debe a un aumento en los niveles de Pol IV (2-5 veces) (Layton y Foster, 2003). Por lo tanto se presenta un aumento en el número de errores en la síntesis del DNA, principalmente de tipo "frameshift". En el caso de la mutante *mutL* aún no es claro el mecanismo por el que se altera la frecuencia de mutación, ya que sólo se sabe que esta proteína coordina la unión de MutS (encargada de reconocer el apareamiento erróneo) y MutH (endonucleasa), aunque se sugiere que participa en algún paso sensible a la regulación de este sistema (Harris *et al.*, 1997). En el caso de la mutante en *recD*, se debe a un aumento en el número de copias del plásmido F'.

El aumento en la frecuencia de mutación provocado por el alelo mutante *gyrl* disminuye al nivel de la cepa silvestre cuando se restaura el alelo silvestre. Este resultado demuestra que *gyrl* participa en la generación de mutaciones de fase estacionaria, funcionando como un posible antimutador en la cepa silvestre. Con la información que se tiene sobre la transcripción y traducción de *gyrl*, de la cantidad de girasa en FS, así como de girasa-Gyrl, se sugiere que en la mutante *gyrl-*, la girasa podría causar más cortes en el DNA al no estar protegida o inhibida por Gyrl. Es posible, como sugieren los resultados *in vitro* reportados por Chatterji y Nagaraja (2002) que Gyrl “secuestre” a la girasa antes de su unión al DNA. Esto se llevaría a cabo debido al mecanismo de acción de la girasa. La DNA girasa requiere de ATP para completar su ciclo de reacción después de cortar el DNA y para religarlo. En condiciones de FS es muy probable que la cantidad de ATP disponible en la célula no sea suficiente para que la enzima pueda completar su ciclo de reacción y por lo tanto realice el corte, pero no sea capaz de religarlo. El equilibrio dinámico de cortes en el DNA se ve afectado por estas condiciones y debido a que la cantidad de girasa es mayor en relación al metabolismo celular en FS, la probabilidad de que se generen cortes de el DNA aumenta. Sin embargo, los cortes pueden hacerse evidentes sólo si se sintetiza o transcribe al DNA, pues las DNA o RNA polimerasas pueden encontrar en su movimiento estos complejos de corte DNA girasa - DNA y provocar que la síntesis se aborte. Esto se sensa en la célula como daño al DNA y se induce la respuesta SOS y el corte de doble cadena debe ser reparado, o se provoca la muerte celular. El que la inhibición de la girasa por la proteína CcdB pueda provocar el corte de doble cadena en el DNA, ya ha sido propuesto anteriormente por S. Rosenberg (2001). Otro dato que apoya

el que la girasa pueda realizar los cortes de doble cadena es el que reportan Espeil y Bocard (1997). Ellos reportan que dentro de los elementos bacterianos de mosaico intercalados (BIMes), que están ampliamente distribuidos en el cromosoma de *E. coli* y las secuencias que los componen (REP secuencias extragénicas palindrómicas repetidas). tienen sitios de alta afinidad por girasa. En presencia de ácido oxolínico se inhibe a la subunidad GyrA, que estabiliza el complejo de corte de girasa en ese sitio, especialmente cuando las secuencias REP se encuentran en sentido divergente.

Cabe mencionar que un análisis realizado por Kofoid *et al.*, (2003) mostró que existe una gran cantidad de secuencias REP a largo de la región *lac* del plásmido F' y tal vez esto permite un mayor número de cortes en esta región por la DNA girasa en FS.

Los resultados muestran que en la cepa JR4792, en la que el alelo *lacIZ33* se localiza en el cromosoma, el número total de revertantes Lac+ al día 5 es similar al de la cepa silvestre GM4792. Lo encontrado coincide con datos de Foster y Trimarchi (1995a) que reportan una disminución en la frecuencia de reversión de 100 veces cuando el alelo *lacIZ33* se encuentra codificado en el cromosoma de una cepa silvestre. También se ha reportado que la frecuencia de reversión de mutaciones en genes codificados en el cromosoma (que afectan motilidad o que intervienen en el metabolismo de fuentes de carbono no preferenciales, e incluso una mutación que inactiva al gen de resistencia a tetracilina por inserción de una mutación fuera de fase), es siempre menor a cuando el gen se encuentra en un episoma (Torkelson *et al.*, 1997; Rosche *et al.*, 1999; Bull *et al.*, 2000). Esto se

observa aún cuando se presenta una mutación en un gen como *mutL*, que provoca un aumento de 100 veces en la frecuencia de mutación. Sin embargo, en una cepa mutante *recG*, que es hiperrecombinogénica, si se observa un incremento en la frecuencia de reversión en genes cromosómicos, aunque no tan alto como cuando se trata de genes del plásmido. Se sugiere que cuando el gen monitor de mutación se encuentra en el plásmido, los eventos primarios que generan las mutaciones de FS (cortes de doble cadena) ocurren con mayor frecuencia. Esto se debe a que las proteínas Tral y TraY pueden generar un corte en el origen de transferencia *oriT*, y cuando la maquinaria de replicación o transcripción encuentran el corte, la horquilla se colapsa, lo que genera una estructura equivalente a un corte de doble cadena (Figura 3). Por otro lado, para que la recombinación tenga lugar se requiere de una secuencia homóloga, que como ya se mencionó en la introducción, la presencia de ésta en el cromosoma es menos frecuente. Además, la probabilidad de que el corte que se genere sea en una región cercana a *lac*, es aún menor. Aunque el mecanismo por el que se generan las mutaciones tanto en el plásmido como en el cromosoma es el mismo, las frecuencias son distintas, siendo los eventos cromosomales siempre menores; es por esto que no se observa un efecto ni aún cuando la mutación en un gen provoque un incremento de 100 veces en la frecuencia de mutación cuando el monitor está en el cromosoma, a menos que la cepa sea hiperrecombinogénica. Esto sugeriría que la mutación en *gyrI* no hace a la cepa FC40 hiperrecombinogénica, aunque para poder afirmar lo anterior se deben hacer ensayos en los que se evalúe la capacidad recombinogénica de la cepa.

Por otra parte, se observó que el aumento en la frecuencia de mutación presente en la mutante *gyrf*, no se registró en la doble mutante *recA⁻ gyrf*. Este resultado concuerda con los datos de Cairns y Foster (1991) y de Bull *et al.* (2001), ya que cuando se muta el gene *recA*, cualquier tipo de mutación adicional en la cepa no permite un aumento en la frecuencia de mutación, indicando que se trata de eventos que dependen de esta proteína y de recombinación homóloga. Esto se ha observado independientemente del tipo de mutación que se esté probando, ya sean genes que intervienen en hacer cortes en el DNA, proteínas de recombinación, proteínas de SOS, etc. Inclusive en el caso de la mutación en *recG*, una doble mutante *recA recG* no es capaz de aumentar la frecuencia de mutación. Por lo tanto se puede afirmar que la vía por la que están ocurriendo las mutaciones en la cepa *gyrf* depende de recombinación homóloga.

En el presente trabajo se encontró que algunas células forman filamentos. Una vez observado esto, se obtuvo un factor de corrección de 1.2 (1.2% de las células observadas presentaron filamentación) para realizar un ajuste en las cuentas viables. Sin embargo, al realizar los cálculos de ajuste se observó que el número de veces que se incrementa la frecuencia de mutación en FS no se modifica significativamente, por lo que se ignoró dicho factor de corrección. Esto concuerda con lo reportado por Nakanishi *et al.* (1998), cuando se expresa la cadena antisentido de *gyrf* (simulando una mutante *gyrf*) o se sobreexpresa *gyrf*, en donde algunas células forman filamentos. La presencia de estos filamentos hace pensar que tal vez la respuesta SOS en algunas de las células *gyrf* está más inducida que en la cepa silvestre, debido a que SulA podría estar inhibiendo la división celular. Se ha demostrado que en condiciones de FS cuando las células

se incuban en medios en los que se aumenta la concentración de AMP_c, se induce la respuesta SOS y la filamentación celular (Janion *et al.*, 2002). Sin embargo, el grado de filamentación no necesariamente refleja una inducción de la respuesta SOS (Mc Cool *et al.*, 2004). En una población bacteriana que filamta como consecuencia de la respuesta SOS, la intensidad de esta respuesta no es igual en todas las células. Esto ocasiona que sólo las células con una respuesta fuerte filamenten. Queda por explorar, por lo tanto, si existe una mayor expresión de SOS y entonces de Pol IV.

Debido a que existe una controversia en cuanto al porcentaje de revertantes Lac⁺ que se generan en FS por una mutación puntual o por amplificación de la región Lac, se procedió a observar el fenotipo de las colonias Lac⁺. Algunos autores consideran a la amplificación como una respuesta alternativa a la mutación de FS y concluyen que la mayoría de las revertantes Lac⁺ provienen de mutaciones puntuales que corrigen la mutación fuera de fase (Hastings *et al.*, 2004). En cambio Roth y Andersson (2004) sugieren que el origen de todas las revertantes es a partir de eventos de amplificación.

En el modelo de hipermutación (Rosenberg, 2001) se considera a los eventos de amplificación como una estrategia alternativa a la corrección de la mutación fuera de fase que tienen las células de FS para sobrevivir a estas condiciones de estrés. Esta respuesta tiene un mecanismo distinto, requiere de DNA PolI, pero no de DNA Pol IV, ni de la respuesta SOS (Hastings *et al.*, 2004). La amplificación permite a las células crecer gracias a que tienen más copias del alelo *lacIZ33* y por lo tanto más actividad residual de β-galactosidasa, pero la amplificación es

inestable y una vez que el DNA se replica la amplificación se puede perder, o también al existir más copias de *lac*, aumentar la posibilidad de después de varias generaciones ocurra la corrección de la mutación fuera de fase. De acuerdo al modelo de amplificación, este evento es esencial como un paso previo para la generación de la mutación puntual. Así las colonias en un principio están formadas por células Lac⁺ inestables con la posibilidad de generar una colonia de mayor tamaño Lac⁺ estable cuando se genere la mutación puntual. Cuando la colonia crece, las células que la componen son una mezcla de células Lac⁺ inestables con *lacIZ33* amplificado y células Lac⁺ inestables que corrigieron la mutación fuera de fase, por esta razón se tienen colonias con sectores (Roth y Andersson, 2004), pero tiempo después las células Lac⁺ estables predominarán en la colonia. Es por esto que se deben observar colonias pequeñas al microscopio para determinar el origen de las revertantes Lac⁺.

Al analizar a las células integrantes de una colonia volviéndolas a crecer en un medio que permite distinguir entre las células Lac⁺ (fenotipo azul), capaces de metabolizar lactosa de las Lac⁻ (fenotipo blanco), se observa una población mezclada, ya que algunas células que perdieron la amplificación ya no son capaces de metabolizar a la lactosa. Debido a esta mezcla es que se observan en la colonia sectores blancos y azules.

El análisis de los resultados muestra que la mayor parte de las colonias muestreadas en la cepa silvestre y en la mutante *gyrI* presentan un fenotipo azul, es decir son mutantes puntuales; y una proporción baja presenta el fenotipo de sectores. El porcentaje de colonias Lac⁺ por amplificación no difiere significativamente entre las cepas silvestre y la mutante *gyrI*, sugiriendo que las

colonias Lac⁺ se deben a mutación puntual y no a eventos de amplificación. Estos resultados coinciden con lo que reportan Hastings *et al.* (2000) y Foster *et al.* (1995), quienes calculan que alrededor de un 2% de las colonias Lac⁺ son causadas por una amplificación en *lac* al día 5 de incubación.

Finalmente, una vez observado el comportamiento de la mutación en *gyrf* en la condiciones de fase estacionaria, se quiso probar si también afectaba la generación de mutaciones en fase de crecimiento exponencial. Los datos muestran que independientemente del tipo de mutación analizada, no se observa una diferencia significativa entre las tasas de mutación de la cepa silvestre y su mutante *gyrf*. Esto sugiere que *gyrf* no interviene en la generación de mutaciones de fase exponencial de crecimiento y por lo tanto no es un antimutador generalizado. Esto es similar a lo encontrado para la polimerasa IV, la cual tampoco interviene en la generación de mutaciones en fase exponencial de crecimiento (McKenzie *et al.*, 2001), lo cual hace a ambas proteínas específicas de FS. Por esta razón resulta aún más intrigante el conocer el mecanismo de acción de la proteína Gyrf y cómo es que ésta interviene en el modelo de generación de mutación de FS.

Gyrf es una proteína con un papel dual, tanto inhibitorio de la actividad de superenrollamiento de girasa como protector de daño al DNA (Chatterji y Nagaraja, 2001). El gen *gyrf* está regulado por varios factores, actúa en condiciones en las que la célula puede sufrir más alteraciones y cuando hay daño al DNA. Esto puede tener implicaciones biológicas importantes, pues las topoisomerasas de Tipo II también existen en eucariontes y tal vez exista alguna

proteína con una función similar que en condiciones de estrés proteja a la célula de una mutación que podría resultar deletérea. Aunque también, como proponen P. Foster y S. Rosenberg, en ciertos sectores de la población puede resultar favorable una mutación en este gene pues se aumentaría la probabilidad de generar mutantes que sobrevivan en FS.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir lo siguiente:

- ✓ La mutación *gyrI*⁻ aumenta la frecuencia de mutación de FS de 80 a 100 veces.
- ✓ La ubicación del alelo *lacIZ33* en el plásmido F' es necesaria para observar el aumento en la frecuencia de mutación de FS en la cepa *gyrI*⁻.
- ✓ Las funciones de RecA son necesarias para el aumento en la frecuencia de mutación de FS en la cepa *gyrI*⁻.
- ✓ El mecanismo por el que se generan los mutantes Lac⁺ en la cepa *gyrI*⁻ es principalmente por una mutación puntual y no por eventos de amplificación de *lac*.
- ✓ El alelo *gyrI*⁻ no interviene en la generación de mutantes en la fase exponencial de crecimiento

Las conclusiones anteriores sugieren que la proteína Gyrl no actúa como un antimutador generalizado sino más bien como un protector de mutación en condiciones de FS

PERSPECTIVAS

- ✓ Se planea determinar a través de los ensayos de mutación de fase estacionaria si el sistema de recombinación RecBCD participa en la generación de las mutantes en la cepa *gyrl⁻*.
- ✓ También se probará si con una mutación en *lexA* (que no permite la inducción del sistema SOS), se reduce la frecuencia de mutación en *gyrl⁻*.
- ✓ Evaluar si existe una diferencia en la expresión de la respuesta SOS y si las células que expresan más esta respuesta son aquellas en las que se observa un aumento en la frecuencia de mutación de FS. Esto mediante una mutante en *sulA*. Además de evaluar si Pol IV así como la filamentación celular están relacionadas a este fenómeno.
- ✓ Estudiar si la cepa *gyrl⁻* es hiperrecombinogénica; para descartar esta posibilidad como la que favorece el incremento en la frecuencia de mutación de FS.
- ✓ Evaluar si en condiciones de FE, *gyrl* es un antimutador también en genes que se encuentran en el plásmido.
- ✓ Además se estudiará si el efecto observado se debe a una interacción directa entre Gyrl y DNA girasa; esto se verificará por co-inmunoprecipitación para determinar si Gyrl en estas condiciones se une únicamente a la girasa o a otras proteínas. Una vez conocido esto, determinar el mecanismo por el que Gyrl protege de mutaciones de FS.
- ✓ Confirmar la presencia del transposón en la mutante *gyrl⁻* y por otro lado si el mismo comportamiento observado en esta mutante es similar en otro tipo de mutante en *gyrl*.

REFERENCIAS

- Akerlund, T., Nordstrom, K. y Bernander, R. (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **177**, 6791-6797.
- Anderson, R.P. y Roth, J.R. (1981) Spontaneous tandem duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA cistrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 3113-3117.
- Assai, T., Bates, D.B. y Kogoma, T. (1994) DNA replication triggered by double-strand breaks in *E. coli*; Dependence on homologous recombination functions. *Cell.*, **78**, 1051-1061.
- Baranowska, H., Policinska Z. y Jachumczyk, W.J. (1995) Effects of the CDC2 gene on adaptive mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **28**, 521-525.
- Baquero, M.R., Bouzon, M., Varea, J. y Moreno, F. (1995) *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol. Microbiol.*, **18**, 301-311.
- Bernard, P., Kezdy, K.E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M.L., *et al* (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP- dependent cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.*, **234**, 534-541.
- Bjedov, I., Tenailon O., Gérard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F. y Matic, I. (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science.*, **300**, 1404-1409.
- Boe, L. (1990) Mechanism for induction of adaptive mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **4**, 597-601.
- Bonner, C.A., Hays, S., Mc. Entee, K. y Goodman, M.F. (1990) DNA polymerase II is encoded by the DNA damage-inducible *dinA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 7663-7667.
- Brake, A.J., Fowler, A.V., Zabin, I., Kania, J. y Müller-Hill, B. (1978) β - Galactosidase chimeras: primary structure of a *lac* repressor- β -galactosidase protein. *Escherichia coli.*, **75**, 4824-4827.
- Bridges, B.A. (1994) Starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: a spontaneous lesion hypothesis for strains for "directed" mutation. *Mutat. Res.*, **307**, 149-156.
- Brown, P.O., Peebles, C.L. y Cozarelli, N.R. (1979) A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 6110-6114.
- Bull, H.J., McKenzie, G.J., Hastings, P.J. y Rosenberg, S.M. (2000a) Evidence that stationary-phase hypermutation in the *E. coli* chromosome is promoted by recombination. *Genetics.*, **254**, 1427-1437.
- Bull, McKenzie, G.J., Hastings, P.J. y Rosenberg, S.M. (2000b) The contribution of transiently hypermutable cells to mutation in stationary-phase to mutation in stationary phase. *Genetics.*, **156**, 925-926.
- Bull, H.J., Lombardo, M.-J. y Rosenberg, S.M. (2001) Stationary-phase mutation in the bacterial chromosome: Recombination protein and DNA polymerase IV dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 8334-8341.

- Cairns, J., Overbaugh, J., y Miller, S. (1988) The origin of mutants. *Nature.*, **335**, 142-145.
- Cairns, J. y Foster, P.L. (1991) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.*, **154**, 1427-1437.
- Calos, M.P. y Miller, J.H. (1981) Genetic and sequence analysis of frameshift mutations induced by ICR-91. *J. Mol. Biol.*, **153**, 39-66.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369-413.
- Carter, J.R., Patel, D.R. y Porter, R.D. (1992) The role of *oriT* in *tra*-dependent enhanced recombination between mini F-*lac-oriT* and lambda *plac5*. *Genet. Res.*, **59**, 157-165.
- Chater, K.F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 685-713.
- Chatterji, M., Unniraman, S.S., Maxwell, A. y Nagaraja, V. (2000) The additional 165 amino acids in the B protein of *Escherichia coli* DNA gyrase have an important role in DNA binding. *J. Biol. Chem.*, **175**, 22888-22894.
- Chatterji, M. y Nagaraja, V. (2002) GyrI: a counter defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Reports.*, **3**, 261-267.
- Chatterji, M., Senupta, S., y Nagaraja, V. (2003) Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch. Microbiol.* **180**, 229-346.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown. P.O. y Hanawalt, P.C. (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics.*, **158**, 41-64.
- Couturier, M., Bahassi el-M. y Van Melderen, L. (1998) Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends. Microbiol.*, **6**, 269-275.
- Cox, M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: Questions. *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 53-82.
- Dimpfl, J. y Echols, H. (1988) Duplication mutation as an SOS response in *Escherichia coli*: Enhanced duplication formation by a constitutively activated RecA. *Genetics.*, **123**, 255-260.
- Drlica, K. y Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 377-392.
- Espeil, O. y Boccard, F. (1997) In vivo cleavage of *Escherichia coli* BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site. *Mol. Microbiol.*, **26**, 767-777.
- Finkel, S.E. y Kolter, R. (1999) Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA.*, **96**, 4023-4027.
- Foster, P.L. (1993) Adaptive mutation: The uses of adversity. *Annu Rev. Microbiol.*, **47**, 467-504.
- Foster, P.L. (1994) Population dynamics of a Lac⁻ strain of *Escherichia coli* during selection for lactose utilization. *Genetics.*, **138**, 253-261.
- Foster, P.L. y Trimarchi, J.M. (1994) Adaptive reversion a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs, *Science.*, **265**, 407-409.

- Foster, P.L. y Trimarchi, J.M. (1995a) Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 5487-5490.
- Foster, P.L. y Trimarchi, J.M. (1995b) Conjugation is not required for adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **177**, 6670-6671.
- Foster, P.L. Gudmundsson, G., Trimarchi, J.M., Cai, H. y Goodman. M.F. (1995) Proofreading-defective DNA polimerase II increases adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 5487-5490.
- Foster, P.L., Trimarchi, J.M. y Mauer, R.A. (1996) Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.*, **142**, 25-37.
- Foster, P.L. (1997) Nonadaptive mutations occur in the F' episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**, 1550-1554.
- Foster, P.L., Gudmundsson, G., Trimarchi, J.M., Cai, H., Goodman, M.F. (1995) Proofreading-defective DNA polymerase II increases adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 7951-7955.
- Foster, P.L. (1999a) Mechanisms of Stationary Phase Mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu. Rev. Genet.*, **3**, 57-88
- Foster, P.L. (1999b) Are adaptive mutations due to a decline in mismatch repair?. The evidence is lacking. *Mutat. Res.*, **436**, 179-184.
- Foster, P.L. y Rosche, W.A. (1999a) Mechanism of mutation in nondividing cells; insights from the study of adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Ann. NY Acad. Sci.*, **870**, 133-145.
- Foster, P.L. y Rosche, W.A. (1999b) Increased episomal replication accounts for the high rate of adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.*, **152**, 15-30.
- Foster, P.L. (2000) Adaptive mutation: implications for evolution. *BioEssays.*, **22**, 1067-1074.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. y Siede, W. (1995) DNA repair and Mutagenesis. Washington, D.C; Am. Soc Microbiol.
- Frost, L.S. y Manchak, J. (1998) F- phenocopies: characterization of expression of the F transfer region in stationary phase. *Microbiology.*, **144**, 2579-2587.
- Galintski, T. y Roth, J.R. (1995) Evidence that F plasmid transfer replication underlies apparent adaptive mutation. *Science.*, **268**, 421-423.
- Galintski, T. y Roth, J.R. (1996) A search for a general phenomenon of adaptive mutability. *Genetics.*, **143**, 645-659.
- Giaver, H.M., Styrvold, O.B., Kaasen, I. *et al.*, (1988), Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2841-2849.
- Gómez-Eichelman, M.C. y Camacho-Carranza, R. (1995) El superenrollamiento del DNA y topoisomerasas en *Escherichia coli*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, **37**, 291-304.
- Goodman, M.F. (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 17-50.

Hall, B.G. (1988) Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. Mutations involving an inserting sequence. *Genetics.*, **120**, 887-897.

Hall, B.G. (1990) Spontaneous point mutation that occur more often when they are advantageous than when they are neutral. *Genetics.*, **126**. 5-16.

Hall, B.G. (1999) Spectra of spontaneous growth dependent and adaptive mutations at *ebgR*. *J. Bacteriol.*, **181**, 1149-1155.

Hall, B.G., Betts, P.W. y Wootton, J.C. (1989) DNA sequence analysis of artificially evolved *ebg* enzyme and *ebg* repressor genes. *Genetics.*, **123**, 635-648.

Harris, R.S., Longrich, S., y Rosenberg, S.M. (1994) Recombination in adaptive mutation. *Science.*, **264**, 258-260.

Harris, R.S. Ross, K.J., y Rosenberg, S.M. (1996) Opposing roles of the Holliday junction processing systems of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics.*, **124**, 681-691.

Harris, R.S., Feng, G., Ross, K.J., Sidhu, R., Thulin, C., Longrich, S., Szigety, S.K., Winkler, M.E. y Rosenberg, S.M. (1997) Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. *Genes Dev.*, **11**, 2426-2437.

Harris, R.S, Feng G., Ross, K.J., Sidhu, R., Thulin, C., Longrich, S., Szigety, S.K., Winkler, M.E. y Rosenberg, S.M. (1999) Mismatch repair is diminished during stationary-phase mutation. *Mutat.Res.*, **437**, 51-60.

Hastings, P.J., Bull, H.J., Klump, J.R., y Rosenberg, S. (2000) Adaptive amplification an inducible chromosomal instability mechanism. *Cell.*, **103**, 723-731.

Hastings, P.J., Slack, A., Petrosino, J.F. y Rosenberg, S. (2004) Adaptive amplification: and point mutation are independent mechanisms: Evidence for various stress-inducible mutation mechanisms. *Plos Biology.*, **2**, 1-14.

Hendrickson, H., Schlectha, E.S., Bergthorsson, U., Andersson, D.I., y Roth, J.R. (2002) Amplification-mutagenesis: evidence that directed adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.*, **99**, 2164 -2169.

Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase, gene regulation in *E. coli*. *Cell.*, **72**, 165-168.

Hengge-Aronis, R. (1996) Regulation of gene expression during entry into stationary phase, pp. 1497-1512 in *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.L. Low et al. ASM Press, Washington, DC.

Hengge-Aronis, R.,(2002) The general stress response of *Escherichia coli*, in: G. Storz, R. Hengge-Aronis (Eds), *Bacterial Stress Responses*, American Society of Microbiology, Washington, DC, 2000, pp.161-178.

Hiom, K.J. y Sedgwick, S.G. (1992) Alleviation of *EcoK* DNA restriction in *Escherichia coli* and involvement of *umuDC* activity, *Mol. Gen. Genet.*, **231**, 265-275.

Huisman, G.W., Siegele, A., Zambrano, M.M. y Kolter, R. (1996) Morfological and physiological changes during stationary phase, 1672-1682. in *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.L. Low et al. ASM Press, Washington, DC.

- Ishihama, A. (1997) Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 582-588.
- Janbon, G. Sherman, F. y Riustchenko, E. (1999) Appearance and properties of L-sorbose-utilizing mutants of *Candida albicans* obtained on a selective plate. *Genetics.*, **153**, 653-664.
- Janion, C. Sikora, A., Nowosielska, A. y Grzesiuk, E. (2002) Induction of the SOS Response in starved *Escherichia coli*. *Env. Mol. Mut.*, **40**, 129-133.
- Jenkins, D.E., Schultz, J.E. y Matin, A. (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3910-3914.
- Kaasen, I., Flkenberg, P., Styrvold, B., *et al.*, (1992) Molecular cloning and physiological map of the *otsAB* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: Evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J. Bacteriol.*, **174**, 889-898.
- Karu, A.E. y Belk, E.D. (1982) Induction of *E. coli* recA protein via recBC and alternate pathways: quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Mol. Gen. Genet.*, **185**, 275-282.
- Kasak, L. Horak, R. y Kivisar, M. (1997) Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc Natl Acad Sci. USA.*, **94**, 3134-3149.
- Kim, S.K., Kaiser, D., Kuspa, A. (1992) Control of cell density and pattern by intercellular signaling in *Myxococcus* development. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 117-139.
- Kim, S.-R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. y Ohmori, H. (1997) Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an SOS gene product (DinB/P) enhances frameshift mutations in the absence of any exogenous agents that damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 13792-13797.
- Kim, S.R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P. y Nohmi, T. (2001) Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA Pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics.*, **266**, 207-215.
- Kofoed, E., Bergthorsson, U., Slechta, E.S., y Roth, J.R. (2003) Formation of an F' plasmid by recombination between imperfectly repeated chromosomal Rep sequences: a close look at an old friend (F'₁₂₈ *pro lac*). *J. Bacteriol.*, **185**, 660-663.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. y Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 749-95.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A., Lauder, S.D. y Rehrauer, W.M. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Trends. Biochem. Sci.*, **25**, 156-165.
- Kuzminov, A. (1995) Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **16**, 373-384.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . *Acad. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 751-813.
- Layton, J.C. y Foster, P.L. (2003) Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **50**, 549-561.
- Liu, J. (1994) Microcin B17: postranslational modifications and their biological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 4618-4620.

- Leddy, M.B., Phipps, D.W., Ridgway, H.F. (1995) Catabolite-mediated mutations in alternate toluene degradative pathways in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **177**, 4713-4720.
- Lewis, R.J., Tsai, F.T.F. y Wigley, D.F. (1996) Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *BioEssays*, **18**, 661-671.
- Little, J.W. y Mount, D.W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, **29**, 11-22.
- Lloyd, R.G. y Buckman, C. (1991) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J. Bacteriol.*, **173**, 1004-1011.
- Lombardo, M.-J. y Rosenberg, S.M. (1999) Hypermutation in stationary-phase *E. coli*: tales from the *lac* operon. *J. Genet.*, **78**, 13-21.
- Lombardo, M.-J., Aponoyi, I. y Rosenberg, S.M. (2004) General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Genetics*, **166**, 669-680.
- Marini, A., Matmati, N. y Morpurgo G. (1999) Starvation in yeast increase non-adaptive mutation. *Curr. Genet.*, **35**, 77-81.
- Matic, I., Rayssiguier, C. y Radman, M. (1995) Interspecies gene exchange in bacteria: The role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell*, **80**, 507-515.
- Matic, I., Taddei, F., y Radman, M. (2004) Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress. *Res. Microbiol.*, **155**, 337-341.
- Matin, A. (1991) The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 3-10.
- Maxwell, A. (1993) The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**, 681-686.
- Maxwell, A. (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends. Microbiol.*, **5**, 102-109.
- McCool, J.D., Long, E., Petrosino, J.F., Sandler, H.A., Rosenberg, S.M. y Sandler, S.J. (2004) Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol. Microbiol.*, **53**, 1343-1357.
- McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L. y Rosenberg, S.M. (2000) The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 6646-6651.
- McKenzie, G.J., y Rosenberg, S.M. (2001) Adaptive mutations, mutator DNA polymerases and genetic strategies of pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 586-594
- McKenzie, G.J., Magner, D.B., Lee, P.L. y Rosenberg, S.M. (2003) The *dinB* operon and spontaneous mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **185**, 3972 - 3977.
- Michel, B. (2000) Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends. Biochem. Sci.*, **25**, 173-178.
- Michel, B., Flores, M.-J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M. y Bidnenko, V. (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 8181-8188.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Nakanishi, A., Oshida, T., Matsushita, T., Imajoh-Ohmi, S. y Ohnuki, T. (1998) Identification of DNA-gyrase inhibitor (Gyrl) in *Escherichia coli*. *J. Mol. Chem.*, **273**, 1933-1938.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Numa, S., Chang, A.C., Cohen, S.N., Nunberg, J., Schimke., R.T. (1978) Construction of bacterial plasmids that contain the nucleotide sequence for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 6021-6025.
- Napolitano, R., Janel-Bintz, R., Wagner, J. y Fuchs, R.P. (2000) All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J.*, **19**, 6259-6265.
- Nyström, T. (2004) Stationary - phase physiology. *Annu.Rev. Microbiol.*, **58**, 161-181.
- Oh, T.J., Jung, I.L. y Kim, I.G. (2001) The *Escherichia coli* SOS gene *sbmC* is regulated by HNS and RpoS during the SOS induction and stationary growth phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 1052-1058.
- Pérez-Capilla, T., Baquero, M.R., Gómez-Gomez, J.M., Ionel, A., Martín, S. y Blázquez, J. (2005) SOS- Independent induction of *dinB* transcription by β -lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **187**, 1515-1518.
- Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A. y Vázquez, D. (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.
- Powell, S.C. y Wartell, R.M. (2001) Different characteristics distinguish early versus late arising adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, **473**, 219-228.
- Preiss, J. (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 419-458.
- Radicella, J.P., Park, P.U. y Fox, M.S. (1995) Adaptive mutation in *Escherichia coli*: a role for conjugation. *Science.*, **268**, 418-420.
- Ramírez-Santos., J., Contreras-Ferrat, G., y Gómez-Eichelmann, M.C (2005) La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Lat. Microbiol.*, En prensa.
- Reece, R.J. y Maxwell, A. (1991) DNA gyrase: structure and function. *Crt. Rev. Biochem.Mol. Biol.*, **26**, 335-375.
- Reyes-Domínguez, Y., Contreras-Ferrat, G., Ramírez-Santos, J. y Gómez-Eichelmann, M.C. (2003) Plasmid DNA Supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J.Bacteriol.*, **185**, 1097-1100.
- Rinken, R. y Wackernagel, W. (1992) Inhibition of the RecBCD-dependent activation of Chi recombinational hot spots in SOS-induced cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **174**, 1172-1178.
- Rodríguez, C., Tompkin, J., Hazel, J. y Foster, P.L. (2002) Induction of a DNA nickase in the presence of its target site stimulates adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 5599-5608.
- Romanowski, M.J., Gibney, S.A. y Burley, S.K. (2002) Crystal structure of the *Escherichia coli* SbmC protein that protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17, *Proteins.*, **47**, 403-407.
- Rosche, W.A. y Foster, P.L. (1999) The role of transient hypermutation in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 6862-6867.

- Rosche, W.A. y Foster P.L. (2000) Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods.*, **20**, 4-17.
- Rosenberg, S.M., Longerich, S., Gee, P. y Harris, S. (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science.*, **265**, 405-407.
- Rosenberg, S.M., Harris, S. y Torkelson, J. (1995) Molecular handles on adaptive mutation. *Mol. Microbiol.*, **18**, 185-189.
- Rosenberg, S.M., Harris, S., Longerich, S. y Galloway, A.M. (1996) Recombination-dependent mutation in non-dividing cells. *Mutat. Res.*, **350**, 69-76.
- Rosenberg, S.M. (1997) Mutation for survival. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **7**, 829-834.
- Rosenberg, S.M., Thulin, C., y Harris, R.S. (1998) Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and nature. *Genetics.*, **148**, 1559-1566.
- Rosenberg, S.M. (2001) Evolving Responsively: adaptive mutation. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 50-515.
- Roth, J.R. y Andersson, D.I. (2004) Amplification-mutagenesis-how growth under selection contributes to the origin of genetic diversity and explains the phenomenon of adaptive mutation. *Res Microbiol.*, **155**, 342-351.
- San Millan, J.L., Hernández-Chico, C., Pereda, P. y Moreno, F. (1985) Cloning and Mapping of the genetic determinants for Microcin B17 production and immunity. *J. Bacteriol.*, **163**, 275-281.
- Sambrook, J., Fritsch, C. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlechta, E.S., Liu, J., Anderson, D.I. y Roth, J.R. (2002) Evidence that selected amplification of a bacterial lac frameshift allele stimulates Lac (+) reversion (adaptive mutation) with or without general hypermutability. *Genetics.*, **161**, 945-956.
- Schlechta, E. S., K.L. Bunny, E., Kugelberg, E., Kofoed, D.I., Andersson y Roth, J.R. (2003) Adaptive mutation: general mutagenesis is not a programmed response to stress, but results from rare co-amplification of *dinB* with *lac*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 12847-12852.
- Slater, J.H., Weightman, A.J. y Hall B.G. (1985) Dehalogenase genes of *Pseudomonas putida* PP3 on chromosomally located transposable elements. *Mol. Biol. Evol.*, **2**, 557-567.
- Storchova, Z. y Vondreis, V. (1999) Starvation-associated mutagenesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is affected by Ras2/camp signaling pathway. *Mutat. Res.*, **431**, 59-67.
- Taddei, F., Matic, I., Radman, M. (1995) cAMP- dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 11736-11740.
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujitak, N., Ishihama, A. y Takahashi H. (1993) Heterogeneity of the Principal σ Factor in *Escherichia coli*: The *rpoS* Gene Product, σ^{38} , is a Second Principal σ Factor of RNA Polymerase in Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 3511-3515.
- Tang, M., Schen, X., Frank, E.G., O'Donnel, M., Woodgate, R. y Goodman, M.F. (1999) UmuD' (2)C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 8919-8924.
- Tang, M. Pham, P., Schen, X., Taylor, J.S., O'Donnel, M., Woodgate, R. y Goodman, M.F. (2000) Roles of *E. coli* DNA polymerase IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. *Nature.*, **404**, 1014-1018.

Tingey, A.P. y Maxwell, A. (1996) Probing the role of the ATP-operated clamp in the strand-passage reaction of DNA gyrase. *Nucleic. Acids. Res.*, **24**, 4868-4873.

Tompkins, J.D., Nelson, J.E., Hazel, J.C., Leugers, S.L., Stumpf, J.D. y Foster, P.L. (2003). Error-prone polymerase, DNA polymerase IV, is responsible for transient hypermutation during adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **185**, 3469-3472.

Torkelson, J., Harris, R.S., Lombardo, M.-J., Nagendran, J., Thulin, C. y Rosenberg, S.M. (1997) Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *EMBO. J.*, **16**, 3301-3311.

Tlsty, D.T., Albertini, A.M. y Miller, J.H. (1984) Gene amplification in the *lac* region of *E. coli*. *Cell.*, **37**, 217-224.

Vizan, J.L., Hernández-Chico, C., Del Castillo, I. y Moreno, F. (1991) The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO. J.*, **10**, 467-476.

Voogd, C.E., Van der Stel, J.J. y Jacobs, J.J.J.A.A. (1977) The mutagenic action of nitroimidazoles III. Tinidazole, Ipronidazole, panidazole and ornidazole. *Mutation Research.*, **48**, 155-182.

Wagner, J., Grüz, P., Kim, S.R., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R.P.P. y Nohmi, T. (1999) The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell.*, **4**, 281-286.

Wagner, J. y Nohmi, T. (2000) *Escherichia coli* DNA polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity. *J. Bacteriol.*, **182**, 4587-4595.

Walker, G.C. (1984) Mutagenesis an inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.

Walker, G.C. (1985) Inducible DNA repair systems. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 425-457.

Walker, G.C. (1996) The SOS response *Escherichia coli*, pp. 1400-1411 in *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, edited by F.C. Neidhardt, R. Curtiss, III, J.L. Ingrahan, E.C.C. Lin, K.L. Low *et al.*, ASM Press, Washington, DC.

Wensik, J., Gilden, N. y Witholt, B. (1982) Attachment of lipoprotein to the murein of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **122**, 587-590.

Yasuda, T., Morimatsu, K., Horii, T., Nagata, T. y Ohmori, H. (1998) Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease by DinI. *EMBO. J.*, **17**, 3207-3216.

Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F. y Finkel, S.E. (2002) SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 8737-8741.

Yorgey, P., Lee, J., Kordel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D. y Kolter R. (1994) Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 104519-104523.

ESTA TESIS NO SE
DE LA BIBLIOTECA