

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

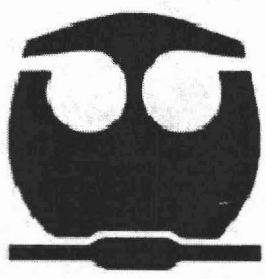
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EXPRESIÓN DEL SISTEMA DE MUERTE  
CELULAR PROGRAMADA *ccd* EN  
CÉLULAS DE *Escherichia coli* EN FASE  
ESTACIONARIA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)  
P R E S E N T A :

BIOL. MARISELA AGUIRRE RAMÍREZ

Tutor: DRA. MA. DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN



MÉXICO, D. F.

Octubre 2005

U: 350077



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# EXPRESIÓN DEL SISTEMA DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA *ccd* EN CÉLULAS DE *Escherichia coli* EN FASE ESTACIONARIA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Jesús Ramírez Santos en los experimentos de la construcción de las fusiones transcripcionales y de expresión.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT. Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	I. I. B., UNAM
Vocal	Dra. Herminia Loza Tavera	F. Q., UNAM
Secretario	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	F. Q., UNAM
Suplente	Dr. Luis Servín González	I. I. B., UNAM
Suplente	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	F. Q., UNAM

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

NOMBRE: Marisela Aguirre  
Ramírez

FECHA: 28- Octubre '05

FIRMA: [Firma]

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a varias personas que fueron fundamentales en la elaboración del presente trabajo:

A la Dra. Carmen Gómez por compartir sus conocimientos, por ayudarme a formar una actitud crítica y sólida, además de su paciencia, confianza en mí y gran apoyo en los momentos difíciles de mi carrera.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por ayudarme a concretar el proyecto con un amplio trabajo experimental, por sus comentarios enriquecedores, por su amistad y paciencia, y por ser un compañero inseparable de carrera.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Hermiania Loza y el Dr. Roberto Coria por su orientación y comentarios durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del Jurado, Dr. Sergio Sánchez, Dra. Herminia Loza, Dra. Amelia Farrés, Dr. Luis Servin y Dr. Francisco Plasencia, por sus valiosos comentarios para mejorar la calidad de este trabajo.

Al Sr. Miguel Páez porque su trabajo es siempre el inicio de nuestros experimentos, por su valiosa amistad por hacer siempre agradables los momentos de trabajo en el laboratorio y por todos los juegos de dados perdidos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Gabriel, Yazmid e Ivonne.

A mis padres (Oscar y Estela) por ser un gran apoyo moral e incondicional, además de darme ejemplos sólidos de trabajo y perseverancia.

A mi compañero de vida (Marco) por llevar siempre una esperanza el hombro, un apoyo constante, un amor eterno y un pilar invaluable de todos mis proyectos.

A mis hermanos (Alejandro, Miguel, Rebeca, Blanca, Sergio y Dolores) porque son un aliento en los momentos difíciles y buenos compañeros de camino. A mis cuñados y sobrinos por completar de manera especial mi vida.

A mis amigos recuperados de todas las batallas: Laura, José Luis, Ricardo, Paloma (Palomiux), Adriana (Bris), Tathali (Chat), Georgina (Gina), Diana y Elisa.

“El ojo del pintor es un sexto sentido. Por su medio se hace visible lo que no era”

“Yo soy absolutamente inconsciente cuando pinto. Usted acaba de ver un cuadro mío inconcluso. Empecé con una línea fina, estaba en ese estado y no sé qué contendrá cuando lo dé por acabado; no tengo la menor idea. Pinto casi automáticamente. Hago un pequeño croquis que amplío en el lienzo, pero la mayoría de las veces (como en esta ocasión) empiezo directamente con una mancha de color sobre la tela, con una línea y ese elemento, por analogía, me inspira a seguir con otras formas, con otras líneas, con otras manchas...Y así se forma el cuadro. Por lo tanto me presento ante la tela sin saber que va a ocurrir, como si me pasase por el vacío. Mi tela es como el paseo por una calle desconocida.”

Eugenio F. Granell

## CONTENIDO

Carátula.....	1
Reconocimientos .....	2
Agradecimientos .....	3
Índice .....	4
Resumen .....	5
Introducción	
Muerte celular post-segregacional en bacterias .....	6
Tipos de sistemas antídoto/toxina .....	7
El sistema de muerte celular <i>ccd</i> .....	11
Efecto de <i>ccd</i> sobre la célula .....	12
El sistema de reparación SOS .....	15
Antecedentes .....	17
Hipótesis .....	18
Objetivos .....	18
Materiales y Métodos	
Cepas bacterianas, plásmidos y fagos .....	19
Construcción de fusiones transcripcionales cromosomales .....	20
Obtención, titulación y transducción de fagos recombinantes .....	22
Titulación y transducción con P1vir .....	24
Conjugación del plásmido pOX38Km <sup>R</sup> .....	25
Transformaciones .....	25
Purificación de plásmidos .....	26
Separación de moléculas de DNA por electroforesis .....	27
Reacción de amplificación de cadena de DNA (PCR) .....	27
Restricción y clonación de moléculas de DNA .....	28
Cuantificación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa .....	29
Visualización de las proteínas CcdA y CcdB por ensayos de "Western-blot" .....	30
Resultados	
Regulación de la transcripción del sistema <i>ccd</i> en bacterias en fase de crecimiento exponencial y estacionario .....	32
Regulación de la transcripción del sistema <i>ccd</i> durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrientes .....	35
Determinación de la cantidad relativa de CcdA y CcdB durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario .....	37
Efecto del gene <i>rpoS</i> en la regulación de la transcripción del sistema <i>ccd</i> durante la fase estacionaria .....	39
Efecto del superenrollamiento en la regulación de la transcripción del sistema <i>ccd</i> .....	41
Inducción del sistema SOS durante la fase estacionaria .....	42
Discusión .....	44
Conclusiones .....	46
Referencias .....	47
Apéndice .....	54
Anexo .....	56

## RESUMEN

Los plásmidos F de las Enterobacterias contienen al sistema *ccd*, el cual codifica dos proteínas que previenen la generación de células sin plásmido. La proteína tóxica CcdB inhibe a la enzima girasa y CcdA funciona como antídoto. En la fase exponencial de crecimiento, CcdA se degrada más rápido que CcdB. En las células que pierden el plásmido F, CcdB inhibe a la girasa, lo que produce daño en el DNA, la inducción del sistema de reparación SOS y muerte celular. Las células que sobreviven a la acción de CcdB pueden presentar mutaciones. El comportamiento del sistema *ccd* en la fase estacionaria se desconoce. Una hipótesis es que en esta fase y en otras condiciones de estrés nutricional, un aumento en la relación de CcdB sobre CcdA puede causar daño en el DNA y aumentar la mutagénesis.

Los objetivos del presente trabajo son estudiar la expresión del sistema *ccd* durante la fase estacionaria y en la recuperación del crecimiento celular por adición de nutrientes.

Los estudios de expresión del sistema *ccd* se hicieron utilizando fusiones transcripcionales (*ccd-lacZ*) en el cromosoma de *Escherichia coli*. La transcripción del sistema *ccd* aumenta durante el crecimiento celular y la fase estacionaria temprana. Dicho aumento es menor en presencia de concentraciones altas de las proteínas represoras. El comportamiento de la actividad transcripcional del sistema *ccd* durante la fase estacionaria no se afecta por el pH del medio. La cantidad de las proteínas CcdA y CcdB correlaciona con el aumento en la transcripción del operón, las cuales están presentes durante periodos prolongados de fase estacionaria y en mayor cantidad con respecto a la fase de crecimiento exponencial. La expresión del sistema *ccd*, en ausencia de las proteínas represoras, es parcialmente dependiente de regulador global de fase estacionaria sigma S. Los resultados indican que el cambio en la topología del DNA no afecta la transcripción del sistema *ccd*.

## INTRODUCCIÓN

### Muerte celular post-segregacional en bacterias.

La muerte celular post-segregacional se ha descrito como un mecanismo para la estabilidad y/o conservación de los plásmidos dentro de una población bacteriana. Sin embargo, la muerte celular puede ser mediada por otros elementos genéticos que incluso se localizan en los cromosomas bacterianos. Esto implica el mantenimiento de dichos elementos genéticos posiblemente como un principio de simbiosis o adición génica y, por lo tanto, de evolución genética. En general, la muerte celular programada está determinada por sistemas genéticos compuestos de dos genes denominados sistemas de adicción, sistemas antídoto/toxina, o sistemas "killer" (Gerdes y col., 2005; Kobayashi, 2004). Éstos comparten características funcionales, ya que uno de los genes codifica una molécula tóxica y el otro una antídoto. El ataque de la toxina sobre su blanco dentro de la célula es inhibido por el antídoto. Por lo que, si se pierde el par de genes u ocurre algo que afecte el balance entre los dos productos génicos, el antídoto se vuelve inefectivo y la toxina puede actuar sobre su blanco (Kobayashi, 2004). Para los fines del presente trabajo, en esta introducción nos referiremos principalmente a las características de los sistemas de muerte celular post-segregacional codificados en plásmidos y, particularmente, al sistema *ccd* del plásmido F.

La estabilidad de los plásmidos de bajo número de copias dentro de las células depende principalmente de un mecanismo activo de partición; sin embargo, existen dos procesos más que juegan un papel importante: la resolución de los multímeros de DNA del plásmido que son generados por eventos de recombinación o replicación y un mecanismo de muerte post-segregacional de aquellas células que pierden el plásmido (Helinski, 2004). El proceso de muerte celular post-segregacional (figura 1) está regulado por sistemas que funcionan a través de moléculas tóxicas estables y moléculas antídoto poco estables, que previenen el efecto tóxico de las primeras (Jensen y col., 1995).

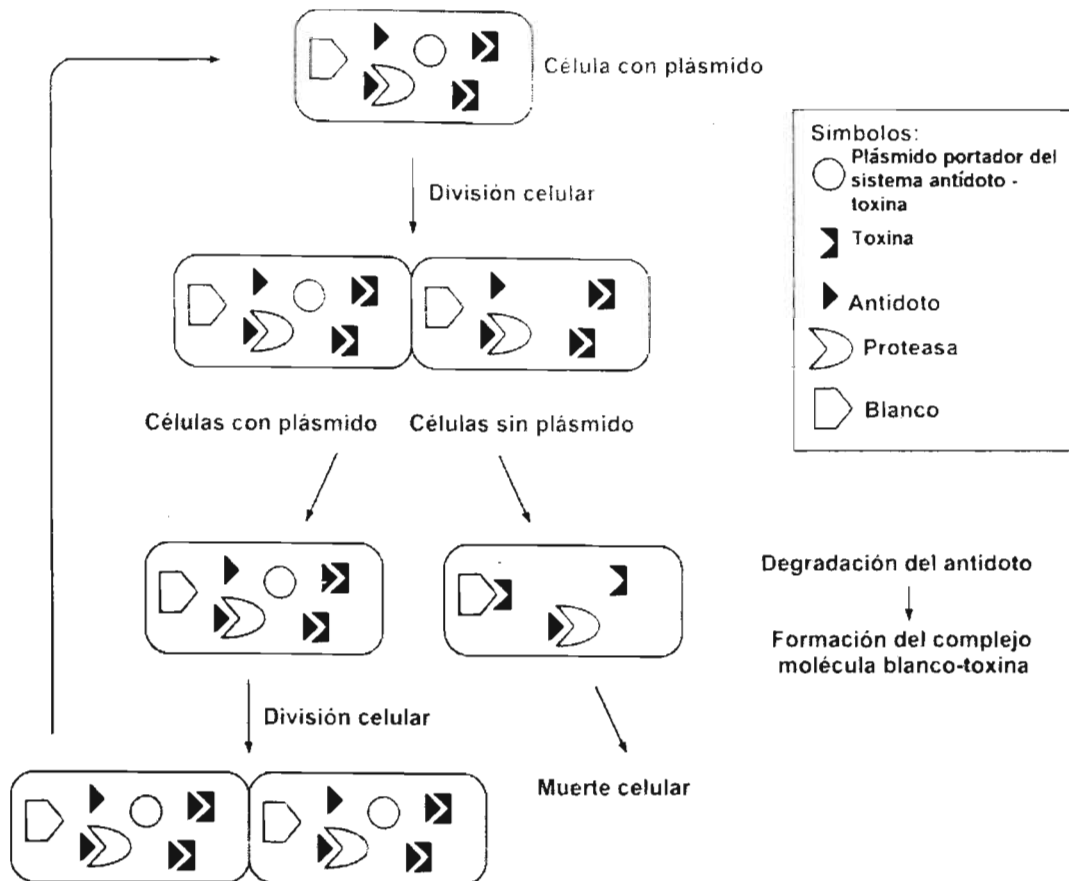


Figura 1. Modelo del mecanismo de la muerte celular post-segregacional codificado en plásmidos. Modificado de Couturier y col., 1998.

### Tipos de sistemas antídoto/toxina.

Los sistemas antídoto/toxina se pueden clasificar en tres formas dependiendo del mecanismo de inhibición del antídoto sobre la toxina: interactuando directamente con la toxina, protegiendo al blanco celular de la toxina o inhibiendo la síntesis de la toxina (Kobayashi, 2004).

El primero es el sistema proteína/proteína clásico, donde el antídoto es una proteína que interactúa directamente con la proteína tóxica e inhibe su acción. Cuando se detiene la síntesis del antídoto y la toxina debido a la pérdida de los genes, los niveles del antídoto bajan más rápidamente que los de la toxina debido a la acción de una proteasa específica y la toxina puede actuar. Dentro de este grupo, entre otros,



encontramos a los sistemas *ccd* del plásmido F, *pem/parD* de los plásmidos R100 y R1, *parDE* de los plásmidos RK2 y RP4, *phd/doc* del fago P1 (tabla 1), *chpA* o *mazEF* y *relBE* del cromosoma de *Escherichia coli* (tabla 2) (Jensen y col., 1995; Kobayashi, 2004). La secuencia de los genes que codifican la proteína antídoto de estos sistemas presentan un porcentaje elevado de identidad, lo cual sugiere la existencia de un gene ancestral (Gerdes, 2000).

El segundo tipo es el sistema de modificación-restricción, donde la toxina es una enzima de restricción que reconoce secuencias específicas en el cromosoma, mientras que el antídoto es una enzima que metila al DNA de la secuencia específica reconocida por la toxina. La pérdida de los genes seguida de la división celular eventualmente diluye los niveles del antídoto y los sitios de reconocimiento de la toxina quedan expuestos. Algunos genes representativos de este sistema son: *paeR7I* de *Pseudomonas aeruginosa* codificado en un plásmido (tabla 1) y *dcm-vsr* de *E. coli* codificado en el cromosoma (tabla 2) (Kobayashi, 2004).

El tercer tipo es el sistema regulado por un RNA antisentido, donde el antídoto es un RNA antisentido que bloquea la expresión del RNAm del gene de la toxina. Sin embargo, si los genes se pierden, debido a la actividad de las RNAsas el RNA antisentido decae más rápidamente que el RNAm de la toxina, permitiendo así su expresión (Kobayashi, 2004). Los genes *hok/sok* presentes en los plásmidos R1 (tabla 1) o en el cromosoma de *E. coli* (tabla 2) son representativos de este tercer tipo (Gerdes y col., 1997; Kobayashi, 2004).

Se han encontrado sistemas de muerte celular homólogos en organismos filogenéticamente alejados, lo cual sugiere que se han adquirido por transferencia horizontal. En el caso del sistema *ccd* los módulos *pem/parD* y *mazEF* presentan secuencias de baja similitud (Ruiz-Echavarría y col., 1995; Kadama y col., 2003); sin embargo, la estructura de las proteínas tóxicas (Kid, MazF y CcdB) es semejante (Loris y col., 1999; Hargreaves y col., 2002; Kadama y col., 2003). Además, se han encontrado operones homólogos a *ccd* en el cromosoma de *E. coli* O157:H7 y en el superintegrón de *Vibrio fischeri* (Kobayashi, 2004).

Tabla 1. Sistemas de muerte en plásmidos <sup>a</sup>

Mecanismo	Locus	Bacteria	Toxina	Blanco	Antitoxina	Proteasa o RNAsa del antídoto
Sistemas de interacción proteína/proteína	<i>ccd (lyn o let)</i> en F	<i>Escherichia coli</i>	CcdB (LetD)	GyrA (DNA girasa)	CcdA (LetA)	Lon
	<i>pem/parD</i> en R100 y R1	<i>E. coli</i>	PemK (Kid)	DnaB (dependiente de la replicación)	PemI (Kis)	Lon
	<i>parDE</i> en RK2 y RP4	Amplia distribución en bacterias gram negativas	ParE	DNA girasa	ParD	
	<i>phd/doc</i> en P1	<i>E. coli</i>	Doc	Sistema MazEF	Phd	ClpXP
	<i>axe-txe</i> en pRUM	<i>Enterococcus faecium</i>	Tex (homólogo a Doc)		Axe (homólogo a Phd)	
	<i>relBE</i> (homólogo) en p307	<i>E. coli</i>	RelE	RNAm en el ribosoma	RelB	Lon
	<i>pasABC</i> en pTF-FC2	<i>Thiobacillus ferroxidans</i>	PasB (homólogo de RelE)		PasA (homólogo de RelB).	Lon
	<i>mvp</i> (stb) en pMYSH6000, plásmido grande de virulencia	<i>Shigella flexneri</i>	MvpT		MvpA	
<i>hig</i> en Rts1	Amplia distribución en distintos hospederos	HigB		HigA		
<i>segB</i> en pSM19035	<i>Streptococcus pyogenes</i> , amplia distribución en bacterias gram positivas	Zeta (fosfotransferasa con ATP/GTP)		Epsilon (inhibidor de la unión de ATP/GTP)		
Sistemas de modificación - restricción	<i>paeR7I</i> en pMG7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>PaeR7I</i>	5' CTCGAG del cromosoma	M. <i>PaeR7I</i>	
	<i>ecoRI</i> en RTF-1	<i>E. coli</i>	<i>EcoRI</i>	5' GAATTC del cromosoma	M. <i>EcoRI</i>	
	<i>ecoRII</i> en RTF-2 y N-3	<i>E. coli</i>	<i>EcoRII</i>	5' CCWGC del cromosoma	M. <i>EcoRII</i>	
	<i>ecoRV</i> en pLG13	<i>E. coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' GATATC del cromosoma	M. <i>EcoRV</i>	
	<i>ssoll</i> en P4	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Ssoll</i>	5' CCNGG del cromosoma	M. <i>Ssoll</i>	
	<i>pvull</i> en pPvu1	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pvull</i>	5' CAGCTG del cromosoma	M. <i>Pvull</i>	
	<i>bsp61</i> en pXH13	Especie de <i>Bacillus</i> (cepa RFL6)	<i>Bsp61</i>	5' GCNGC del cromosoma	M. <i>Bsp61</i>	
Sistemas regulados por un RNA antisentido	<i>srnB</i> en F	<i>E. coli</i>	<i>SrnB'</i>	membrana	<i>SrnC</i> -RNA	RNAsa III
	<i>hok/sok</i>	<i>E. coli</i>	<i>HoK</i>	membrana	<i>Sok</i> -RNA	
	<i>pnd</i> en R483	<i>E. coli</i>	<i>PndA</i>	membrana	<i>PndB</i> -RNA	
	<i>par</i> en pAD1	<i>Enterococcus faecales</i>	<i>Fst</i>	membrana	<i>RNAlI</i>	

<sup>a</sup> Solo se enlistaron aquellos sistemas que se ha demostrado tienen alguna actividad. Modificado de Kobayashi, 2004.

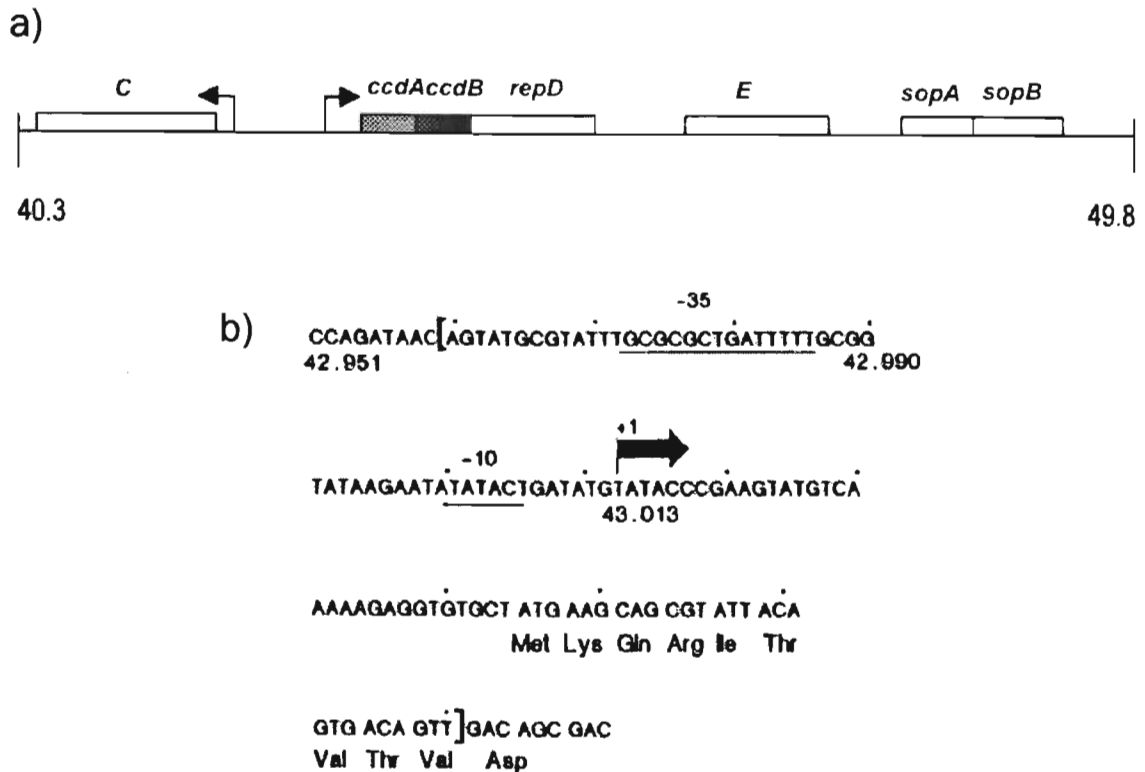
Tabla 2. Sistemas de muerte en el cromosoma <sup>a</sup>

Mecanismos	Locus (homólogos en plásmidos)	Bacteria	Toxina	Blanco	Antitoxina	Proteasa o RNAsa del antídoto	Comentario
Sistemas de interacción proteína /proteína	<i>chpA</i> o <i>mazEF</i> ( <i>pem/parD</i> )	<i>E. coli</i>	ChpAK (MazF)	RNAm	ChpAI (MazE)	ClpA	En condiciones de ayuno
	<i>chpB</i> ( <i>pem/parD</i> )	<i>E. coli</i>	ChpBK	RNAm	ChpBI		En condiciones de ayuno
	<i>relBE</i> ( <i>relBE</i> )	<i>E. coli</i>	RelE	RNAm en el ribosoma	RelB	Lon	En condiciones de ayuno
	Entericidina	<i>E. coli</i>	Entericidina B lipoproteína	Membrana	Entericidina A lipoproteína		En fase estacionaria
	<i>yefM-yoeB</i> ( <i>axe-txe, phd-doc</i> )	<i>E. coli</i>	YoeB		YefM		
	<i>spolIS</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	SpolISA	Cubierta celular	SpolIB		Durante la esporulación
Sistemas de modificación - restricción	<i>haell</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	Haell	5' RCGCY	M.Haell		
	<i>dcm-vsr</i> ( <i>ecoRII</i> )	<i>E. coli</i>	No tiene	5' CCW(A/T)GG	Dcm		Dcm protege al genoma contra ataques por el sistema de modificación-restricción de <i>EcoRII</i> posteriores a algún disturbio. Vsr previene la mutaciones en el blanco
Sistemas regulados por un RNA antisentido	<i>hokA-hokE</i> ( <i>hok</i> )	<i>E. coli</i>	Hok			RNA antisentido	
	Secuencias largas repetidas directas o LDR	<i>E. coli</i>	LdrD			RNA antisentido	

<sup>a</sup> Solo se enlistaron aquellos sistemas que se ha demostrado tienen alguna actividad. Modificado de Kobayashi, 2004.

**El sistema de muerte celular *ccd*.**

El sistema *ccd* (coupled cell division, por sus siglas en inglés) forma parte del operón *ccdABrepD* (Miki y col. 1984a); donde se codifican la proteína antídoto CcdA (H o LetA), la proteína tóxica CcdB (G o LetD) (Miki y col., 1984b) y la resolvasa específica (ResD) (figura 2a) (de Feyter y col., 1989). Las proteínas CcdA y CcdB son de bajo peso molecular (8.7 kDa y 11.7 kDa, 72 y 101 aminoácidos respectivamente) (Bex y col., 1983). ResD es una tirosina recombinasa de 268 aminoácidos que forma parte del sistema de resolución ResD/rfs del plásmido F. El sitio de reconocimiento de *resD* se localiza por arriba del operón *ccd*, en un segmento de DNA que se traslapa con el origen de replicación (*oriV1*) del plásmido F (Hallet y col., 2004). Inicialmente se involucró a ResD para la resolución de cointegrados de F (O'Connor y col., 1986); sin embargo, se encontró que esta proteína puede separar concatenados de plásmidos (Lane y col., 1986).



**Figura 2.** a) Esquema de la región 40.3-49.8 del plásmido F. b) Secuencia de protección del complejo represor CcdA:CcdB sobre la región promotora del sistema *ccd*. Modificado de Tam y Kline, 1989.

El operón *ccdABrepD* se autorregula a través de un complejo represor formado por las proteínas CcdA y CcdB, el cual se une a la región del operador de 120 pb que sobrelapa el inicio del marco de lectura del gen *ccdA* (figura 2b) (de Feyter y col., 1989; Tam y Kline, 1989a y b; Salmon y col., 1994; Dao-Thi y col., 2002). En solución CcdA y CcdB pueden presentar distintas formas estequiométricas, siendo la más estable la CcdA<sub>2</sub>CcdB<sub>4</sub>. La proteína CcdA se puede unir sola a la región promotora; sin embargo, la presencia de CcdB aumenta su afinidad y especificidad por el DNA. La relación estequiométrica de CcdA y CcdB cuando se unen al DNA es de 1:1 y forman un complejo de varios multímeros que se unen en espiral alrededor de la región promotora (figura 2b) (Dao-Thi y col., 2002).

#### **Efecto de *ccd* sobre la célula.**

Los primeros estudios del grupo de Higara identificaron la presencia de dos genes en el plásmido F, *ccdA* y *ccdB*, que aseguraban la presencia del plásmido en *Escherichia coli* a través de un mecanismo no dependiente del origen de replicación (Ogura e Higara, 1983). Este grupo demostró que el mecanismo para la estabilidad del plásmido dentro de la población bacteriana estaba dado por el producto de *ccdB*, el cual provocaba la muerte de aquellas células que perdieran el plásmido (Jaffe y col., 1985). Las proteínas GroES juegan un papel al acoplar la división del plásmido F y la división de la célula huésped (Miki y col., 1988).

Las células que pierden el plásmido se filantan y disminuyen importantemente su viabilidad (Ogura e Higara, 1983; Jensen y col., 1995). Sin embargo, existen células que sobreviven, principalmente si la pérdida del plásmido se presenta durante la fase de crecimiento exponencial (Jaffé y col., 1985; Van Melderen y col., 1994) o en la etapa de recuperación celular después de una fase estacionaria (Sommer y col., 1985). La supervivencia de estas células posiblemente se debe a que en estas condiciones de crecimiento activo aumenta la masa celular y, con ello, la dilución de la toxina.

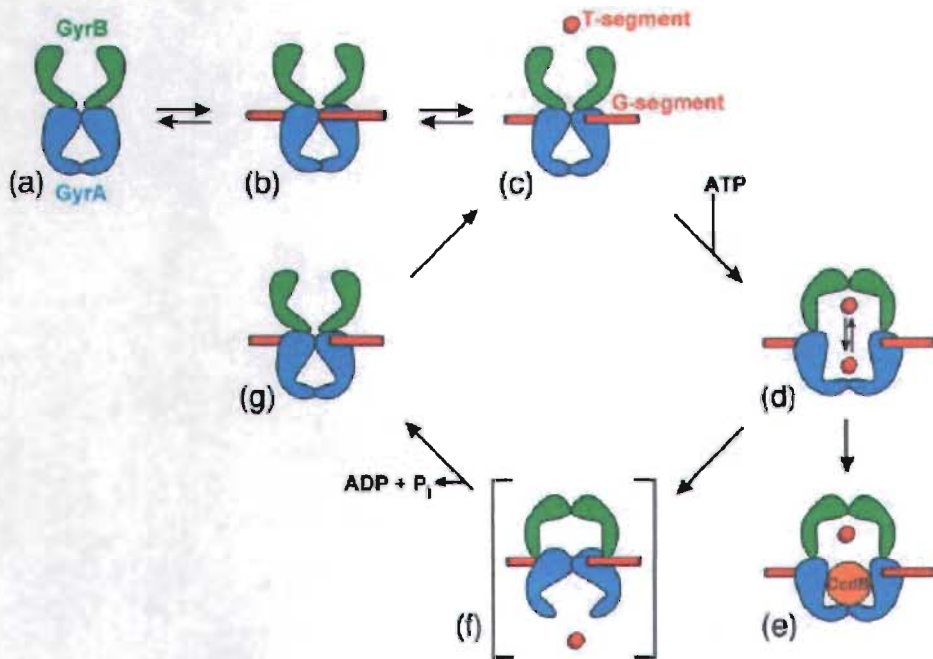
El grupo de Couturier propuso por primera vez que CcdB intoxica a la célula por su interacción con el complejo de la DNA girasa de *E. coli* (Bernard y Couturier, 1992).

Miki y colaboradores (1992) identificaron a la subunidad A de la girasa como la molécula blanco de la proteína CcdB. El efecto inhibitorio de CcdB sobre GyrA puede ser revertido por la fuerte interacción de la toxina con CcdA (Maki y col., 1992; Bernard y col., 1993). Asimismo, se demostró que mutaciones en el gene *gyrA* vuelven a las células resistentes a CcdB (Bernard y col., 1993; Miki y col., 1992). La inhibición de girasa por CcdB provoca cortes de doble cadena en el DNA, la inducción del sistema SOS y finalmente la muerte celular (Karoui y col., 1983).

La DNA Girasa es una endonucleasa que introduce supervueltas negativas al DNA, de manera dependiente de magnesio y ATP. Esta enzima es un heteroligómero constituido por dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB); con un peso molecular de 97 y 94 kDa, respectivamente (Champoux, 2001). La GyrA es una endonucleasa que produce cortes de doble cadena en el DNA. La GyrB es una ATPasa que aumenta su actividad en presencia de GyrA e induce la translocación de las cadenas de DNA previa a su unión (Reece y Maxwell, 1991; Kampranis y col., 1999). GyrA es sensible a las quinolonas, como el ácido nalidíxico (Hawkey, 2003), mientras que GyrB se inhibe en presencia de las cumarinas, como la novobiocina (Maxwell, 1993).

El ácido nalidíxico provoca la unión covalente de la GyrA al DNA (Hawkey, 2003) formando una barrera que colapsa las horquillas de replicación y transcripción (Willmott y col., 1994). CcdB estabiliza el complejo abierto del DNA y la girasa de manera semejante a las quinolonas lo que induce cortes de doble cadena en el DNA (Bernard y col., 1993; Dao-Thi y col., 2005). Sin embargo, existen diferencias en los mecanismos de inhibición de ambos: en el caso de CcdB es necesaria la presencia de ATP para unirse al complejo de DNA-girasa (figura 3) (Bernard y col. 1993). CcdB interactúa con la conformación abierta de la subunidad GyrA (figura 3c). CcdB puede interrumpir el ciclo de catálisis si se une a la girasa cuando la subunidad GyrA corta la doble cadena de DNA y se encuentra unida covalentemente a él (figura 3e). En este último caso, el segmento T de DNA no podrá atravesar la apertura del segmento G debido a que CcdB bloquea dicho canal; además, de que el segmento G no podrá ser ligado de nuevo por GyrA (Dao-Thi y col., 2005). El complejo girasa:DNA:CcdB forma

una barrera que bloquea las horquillas de replicación y transcripción (Bernard y col. 1993; Critchlow y col., 1997) y solo es reversible por la acción de CcdA. Cuando CcdB se une a la girasa en ausencia de DNA, la enzima se inhibe debido a que los dos residuos catálíticos de tirosina se encuentran muy apartados para poder realizar el corte de un segmento G.



**Figura 3.** Modelo del mecanismo de inhibición de CcdB sobre la Girasa. La subunidad GyrA se muestra en azul, GyrB en verde, el DNA en rojo y CcdB en naranja. **a)** La Girasa está en estado de reposo en ausencia de DNA y las dos subunidades de GyrB están abiertas. **b)** El primer segmento de DNA (segmento G) se puede unir de manera reversible al estado de reposo de la enzima. **c)** Se forma el complejo de corte, donde el segmento G es digerido por GyrA y ambos extremos permanecen unidos covalentemente a los residuos de tirosina (Tyr 22). El segundo segmento de DNA (segmento T) puede pasar a través de GyrB. **d)** Posterior a la unión de ATP, las subunidades de GyrB se cierran. Este cambio conformacional permite que el segmento T atraviese la apertura del segmento G, lo que provoca la introducción de dos vueltas supernegativas en el DNA. **e)** CcdB puede unirse a Girasa cuando ésta se encuentra en la conformación anterior a la translocación del segmento T. **f-g)** Posterior o durante la liberación del segmento T, ocurre la hidrólisis de ATP y la enzima recupera su estado relajado. En éste punto es posible que se inicie un nuevo ciclo o que el segmento G sea religado y que la enzima se disocie por completo del DNA. Tomado de Dao-Thi y col., 2005

La antitoxina CcdA evita la inhibición de la girasa por CcdB, uniéndose a esta última (Bernard y Couturier, 1992; Maki y col., 1996; Bernard y col., 1994; Maki y col., 1994). La vida media de las proteínas CcdA y CcdB es diferente y dependiente de la proteasa Lon; sin embargo, la degradación de CcdA puede retardarse si se encuentra acoplada con CcdB (Van Melderen y col., 1994).

Existen otros inhibidores proteicos de la girasa que comparten características con las de la toxina CcdB y las quinolonas. Uno de ellos, la microcina B17 (MccB17) en presencia de ATP es capaz de estabilizar el complejo de corte de girasa y DNA, interactuando con la subunidad GyrB. La MccB17 inhibe el crecimiento, la replicación del DNA e induce la respuesta SOS, por la producción de cortes de doble cadena sobre el DNA (Heddle y col., 2001). Asimismo, la toxina ParE del plásmido RK2 inhibe la actividad de la girasa de *E. coli* ya que favorece la linearización de plásmidos superenrollados en presencia de la girasa. Esto sugiere que estabiliza los complejos de corte DNA-Girasa de manera semejante a CcdB (Jiang y col., 2002).

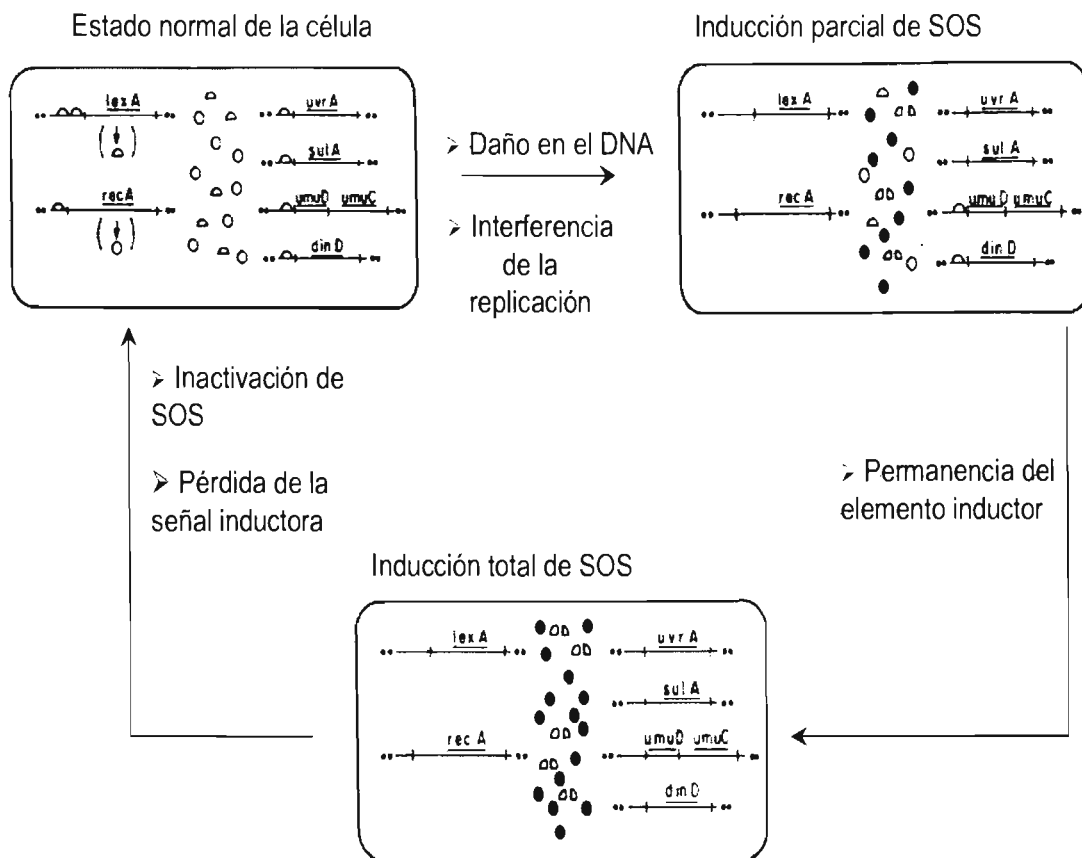
### **El sistema de reparación SOS.**

El sistema SOS se activa por el daño que producen ciertos agentes sobre el DNA al interrumpir el proceso de replicación. La inducción de SOS comienza con la activación de la proteína RecA (RecA\*) (figura 4); la cual interactúa con LexA (represor común de los genes involucrados en la respuesta SOS) (Walker y col., 2000). RecA\* forma un complejo con LexA para favorecer su autodegradación, con lo cual se elimina su actividad represora (Linn, 1996). La activación de RecA se da cuando se une a cadenas sencillas de DNA presentes durante el daño (Craig y Roberts, 1980).

Los primeros reportes sobre la inducción de la respuesta SOS se llevaron a cabo en células portadoras del plásmido F y expuestas a luz UV, donde se promovía la activación de un profago (Bailone y col., 1984). Esta inducción indirecta de SOS era iniciada por el locus *ccd* dentro del plásmido en aquellas células que lo perdían durante la división (Sommer y col., 1985). En ausencia de CcdA, el complejo de CcdB y GyrA unido al DNA impide la continuación del proceso de replicación, lo que genera la formación de cadenas sencillas de DNA y la inducción de SOS (Karoui y col., 1983;



Sommer y col., 1985; Jaffé y col., 1985; Hishida y col., 2004). La inducción de SOS por el efecto tóxico de CcdB es más intensa cuando las células se acercan a la fase estacionaria y prevalece a lo largo de varias generaciones (Sommer y col., 1985). Además, la inducción de SOS produce un incremento en el número de mutaciones, ya que los mecanismos de reparación de SOS son menos fieles que los que operan normalmente (Linn, 1996). Por lo cual, se ha sugerido que el sistema *ccd* podría participar en la generación de variabilidad genética (Couturier y col., 1998).



**Figura 4.** Modelo de inducción del sistema SOS. En un estado celular normal la proteína LexA ( $\Delta$ ) reprime la expresión de los genes de la respuesta SOS (*uvrA*, *sulA*, *umuD*, *umuC*, *dinD*) y la proteína RecA ( $\circ$ ) se encuentra inactiva. Cuando la células sufren daño en el DNA, RecA se activa ( $\bullet$ ) ya que reconoce la formación de cadenas sencillas de DNA e induce la autoproteólisis de LexA ( $\Delta\Delta$ ). Modificado de Linn, 1996.

## ANTECEDENTES

El conocimiento de la regulación de la expresión y la función del sistema *ccd* se debe al estudio de las células principalmente en la fase de crecimiento exponencial o bien en células al inicio de la fase estacionaria (de Feyter y col., 1989; Tam y Kline, 1989a y 1989b; Salmon y col., 1994; Van Melderen y col., 1994). De estos estudios se deduce que una de las funciones de las proteínas CcdA y CcdB es disminuir el número de células sin plásmido en una población de bacterias (Jaffe y col., 1985). Dicha función se debe a la diferencia en la vida media entre la proteína tóxica y la antídoto. Sin embargo, es posible que esta diferencia se manifieste en condiciones de estrés celular; por ejemplo, el estrés nutricional durante la fase estacionaria.

Recientemente se inició el estudio intensivo de la fisiología de *E. coli* en la fase estacionaria, así como de los sistemas de regulación que se activan a la entrada o la salida de las células a esta fase. Se sabe que en la fase estacionaria disminuye la transcripción de un gran número de genes y que, contrariamente, se incrementa la de un conjunto específico de genes de estrés. Además, se presenta una importante degradación de proteínas y cambios en la vida media de éstas y de los mRNAs (Kolter y col., 1993; Hengge-Aronis, 2000; Weichart y col., 2003). Asimismo, las células dejan de dividirse; por lo que podría esperarse que no hubiera células sin plásmidos en esta fase. Sin embargo, si los genes *ccd* no se transcribieran durante la fase estacionaria, se generaría una condición similar al de la pérdida del plásmido, donde CcdA se degradaría más rápidamente permitiendo el efecto tóxico de CcdB sobre girasa y con ello la inducción de daño al DNA. Durante la recuperación del crecimiento celular por adición de nutrientes, podría inducirse el sistema de reparación SOS, dando como resultado la generación de células con mutaciones.

## HIPÓTESIS

El sistema de muerte celular programada *ccd* presente el plásmido F contribuye a generar diversidad genética en poblaciones bacterianas bajo estrés nutricional (fase estacionaria).

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y regulación del sistema *ccd* bajo estrés por limitación de nutrientes.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la regulación de la transcripción del sistema *ccd* por las proteínas CcdA y CcdB en la fase exponencial, la fase estacionaria y durante la recuperación del crecimiento celular por la adición de nutrientes.
- Determinar la posible inducción de la respuesta SOS por la acción de CcdB sobre girasa.
- Determinar la concentración relativa de las proteínas CcdA y CcdB durante la fase estacionaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y fagos

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli*, los plásmidos y los fagos utilizados en el presente trabajo se encuentran enlistados en la tabla 3. Los experimentos que se reportan en este trabajo se llevaron a cabo a partir de cultivos celulares crecidos en los medios LB o LB-MOPS en un baño con agua a 37 °C bajo agitación constante (180 rpm).

Tabla 3. Material biológico utilizado en el presente trabajo.

	Genotipo y características relevantes	Referencias
<i>Cepas</i>		
MC4100	<i>F</i> : <i>araD139 Δ(arg-F-lac) U169 rpsL150 relA1 fibB5301 deoC1 pstF25 rbsR</i>	Bachmann, 1972
C600	<i>thr-1 thi-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44</i>	Appleyard, 1954
MC4100 $\Phi(ccd-lacZ)$	MC4100 con la fusión transcripcional $\Phi(ccd-lacZ)$ integrada al cromosoma	Este trabajo
MC4100 <i>rpoS</i>	MC4100 <i>rpoS359::Tn10</i>	Este trabajo
MC4100 <i>rpoS</i> $\Phi(ccd-lacZ)$	MC4100 <i>rpoS359::Tn10</i> con la fusión transcripcional $\Phi(ccd-lacZ)$ integrada al cromosoma	Este trabajo
ZK920	<i>rpoS359::Tn10</i>	Bohannon y col., 1991
<i>Plásmidos</i>		
pOX38Km <sup>R</sup>	Derivado del pOX38 (recircularización del fragmento <i>HindIII</i> de F sin las secuencias de inserción conocidas, excepto un fragmento IS3), Km <sup>R</sup>	Chandler y Galas, 1983
pKT279	Derivado de pBR322, Tc <sup>R</sup> , vector de clonación	Talmadge y Gilbert, 1980
pULB2707	Fragmento de la kilobase 42.91 a la 43.6 de la secuencia del plásmido mini-F clonado en el pKT279	Van Melder y col., 1994
pRS415	Derivado de pBR322, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>S</sup> , vector de clonación	Simons y col., 1987
pMS01	Derivado de pBR322, Tc <sup>S</sup> , Ap <sup>R</sup>	León y col., 1988
<i>Fagos</i>		
$\lambda$ RS45	<i>imm21 ind+</i> , la mitad del extremo 5' terminal de <i>bla</i> ( <i>bla'</i> ) y la tercera parte distal de <i>lacZ</i> ( <i>del-lacZ<sub>sc</sub></i> )	Maurer y col., 1980
P1vir ( <i>rpoS</i> )	<i>rpoS359::Tn10</i> , Tc <sup>R</sup>	Donación Membrillo-Herández

Construcción de fusiones transcripcionales cromosomales.

Las fusiones transcripcionales se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo de Simons y colaboradores (1987).

Fusión transcripcional  $\Phi(ccd-lacZ)$  (figura 5).

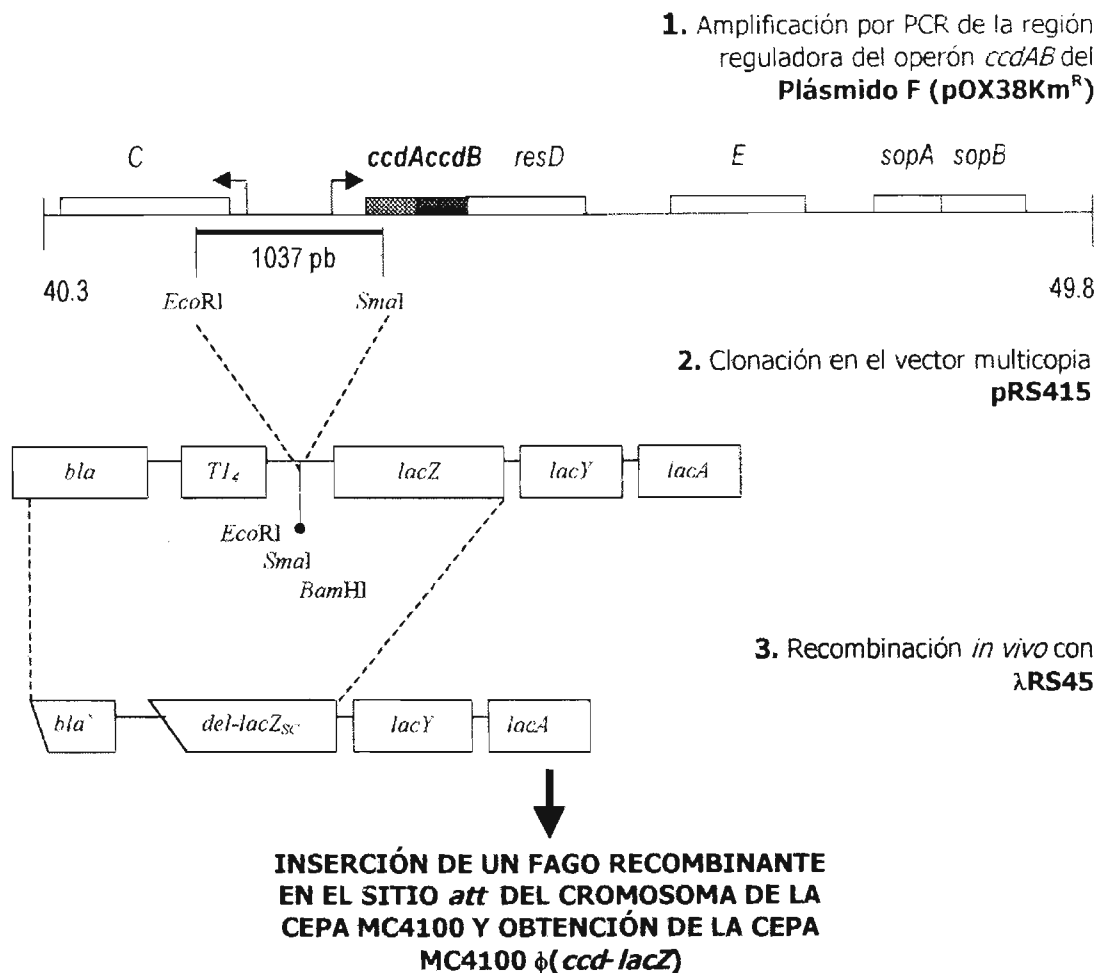


Figura 5. Esquema de construcción de la fusión transcripcional  $\Phi(ccd-lacZ)$ .

El fragmento amplificado de *ccd* se purificó, se digirió con las enzimas *EcoRI* y *SmaI* y se clonó corriente arriba del operón *lacZYA* presente en el vector pRS415. Se aislaron varias colonias transformantes MC4100/pRS45 $\Phi(ccd-lacZ)$ . Estas colonias, azules y resistentes a ampicilina, se cultivaron en medio LB hasta alcanzar un valor de 0.4 de DO<sub>550</sub>. Posteriormente, se tomaron muestras para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de cada cepa. Los plásmidos de las cepas con menor actividad se purificaron por el método de lisis alcalina y se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *SmaI*.

Se eligió una cepa donde el producto de digestión de su plásmido correspondiera al tamaño del fragmento *ccd*. El plásmido con el fragmento *ccd* clonado se purificó por columnas de QIAGEN y se mandó secuenciar en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 310, utilizando los oligos *ccd1* y oligo Z (tabla 4). La secuencia resultó idéntica a la del fragmento *ccd*.

Las clonas seleccionadas se infectaron con el fago  $\lambda$ RS45 y se obtuvieron fagos recombinantes que adquirieron el fragmento *ccd*. La cepa Lac<sup>-</sup> MC4100 se infectó con los fagos recombinantes para obtener colonias lisogénicas con una copia de la fusión  $\lambda$ RS45  $\Phi$ (*ccd-lacZ*) en el sitio *attB* del cromosoma bacteriano.

Fusión transcripcional  $\Phi$ (*sfiA-lacZ*) (figura 6).

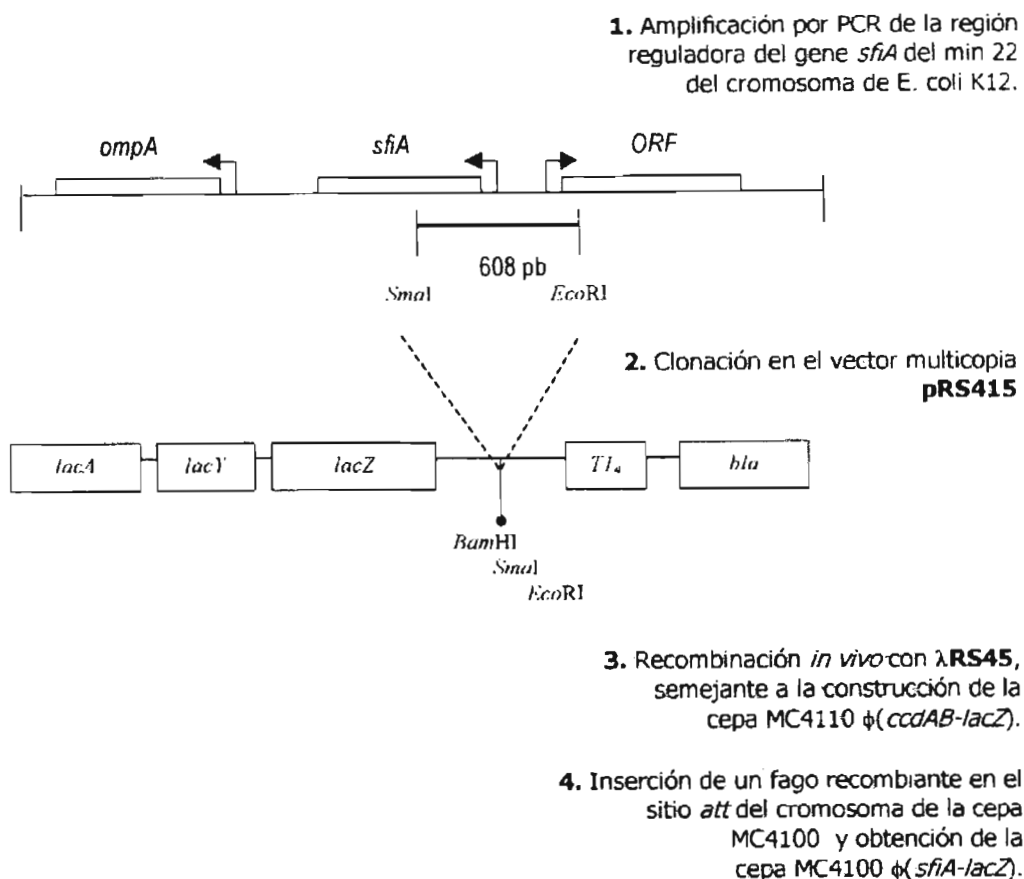


Figura 6. Esquema de construcción de la fusión transcripcional  $\Phi$ (*sfiA-lacZ*).

El protocolo de construcción de la fusión  $\Phi(sfiA-lacZ)$  es semejante al de  $\Phi(ccd-lacZ)$ . En este caso, se amplificó un fragmento de 608 pb de la región reguladora del gene cromosomal *sfiA*, el cual se clonó en el vector pRS415. Se seleccionaron varias colonias transformantes (colonias azules resistentes a ampicilina); éstas se cultivaron en LB aeróbicamente a 37 °C hasta alcanzar 0.4 unidades de  $DO_{550}$  y se incubaron por 30 min con ácido nalidíxico (inductor de la respuesta SOS) 400  $\mu\text{g/ml}$ , para determinar el grado de inducción de la fusión.

Se amplificó el fragmento *sfiA* del plásmido pRS415 $\Phi(sfiA-lacZ)$ , se purificó por columna y se mandó secuenciar con los oligos *sfiA1* y oligoZ (tabla 4). La secuencia resultó ser idéntica a la del gene *sfiA*. La clona con el plásmido pRS415 $\Phi(sfiA-lacZ)$  donde se verificó la secuencia de la región promotora de *sfiA*, se infectó con el fago  $\lambda\text{RS45}$  para obtener fagos recombinantes. Estos fagos se utilizaron para infectar una cepa Lac<sup>-</sup> para obtener colonias lisogénicas con una copia de la fusión  $\lambda\text{RS45}\Phi(sfiA-lacZ)$  en el sitio *attB* del cromosoma bacteriano.

#### **Obtención, titulación y transducción de fagos recombinantes.**

##### Titulación del fago $\lambda\text{RS45}$ .

Se hicieron mezclas de 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo de una noche (ON) concentrado 10X de la cepa MC4100 en varios tubo con 3 ml de TB agar suave y 10  $\mu\text{l}$  de distintas diluciones del fago ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ) y se vaciaron en cajas de  $\lambda$ . Éstas se incubaron a 37 °C y, al día siguiente se contó el número de las placas formadas por el fago con las distintas diluciones.

##### Obtención de fagos recombinantes $\lambda\text{RS45}\Phi(ccd-lacZ)$ o $\lambda\text{RS45}\Phi(sfiA-lacZ)$ .

10 ml de LB con  $\text{MgSO}_4$  10 mM se inocularon con la cepa MC4100 con el plásmido pRS415 $\Phi(ccd-lacZ)$  o pRS415 $\Phi(sfiA-lacZ)$  y se incubó ON aeróbicamente a 37 °C. El cultivo anterior fue concentrado 4 veces en  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Por cada 50  $\mu\text{l}$  del cultivo se agregaron 0, 5 y 10  $\mu\text{l}$  de  $\lambda\text{RS45}$  y cada mezcla se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Mas tarde, se adicionaron 2 ml de LB con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y se incubaron de 4 a 6 horas aeróbicamente a 37 °C. A los tubos que presentaron lisis se les agregó 100  $\mu\text{l}$

de cloroformo, se agitaron fuertemente y centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se repitió el paso anterior. La propagación del fago se repitió varias veces hasta obtener un título de  $10^{10}$  ufp/ml.

Los fagos propagados se diluyeron  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ , y  $10^{-8}$  y se agregaron 10  $\mu$ l de cada dilución a distintos tubos con 3 ml de TB agar suave fundido con 100  $\mu$ l de un cultivo concentrado de la cepa receptora (MC4100). Los tubos se vaciaron en cajas de  $\lambda$  con XGal, las cuales se incubaron invertidas en un ambiente húmedo a 37 °C ON. Los fagos recombinantes generaron placas de color azul.

#### Propagación de fagos recombinantes.

Con una pipeta Pasteur estéril se aisló una placa azul de los fagos recombinantes y se diluyó en 50  $\mu$ l de células concentradas en  $MgSO_4$  10 mM de la cepa MC4100. Los fagos se dejaron adsorber por 5 min, se agregaron 2 ml de LB con  $MgSO_4$  y se incubaron a 37 °C hasta observar lisis celular. El lisado se limpió dos veces con 100  $\mu$ l de cloroformo, centrifugando a 10,000 rpm y rescatando cada vez el sobrenadante. Se mezclaron 10  $\mu$ l de distintas diluciones del fago ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) con 50  $\mu$ l de células concentradas de las diferentes cepas en 3 ml de TB agar y se vaciaron en cajas de  $\lambda$  con XGal. Las cajas se incubaron a 37 °C ON. El procedimiento se repitió varias veces hasta obtener un título de  $\sim 8 \times 10^8$  ufp/ml.

#### Transducción de fagos $\lambda$ RS45 $\Phi$ (*ccd-lacZ*) o $\lambda$ RS45 $\Phi$ (*sfiA-lacZ*).

Para la adsorción de los fagos, a 100  $\mu$ l de células concentradas de la cepa MC4100 (descrito anteriormente) se agregaron distintos volúmenes de los fagos propagados (10, 20 y 30  $\mu$ l) y se dejaron a temperatura ambiente por 12 min. Más tarde, se agregó 1 ml de L-broth y se concentraron las células a 10,000 rpm por 2 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 1 ml de L-broth y se hicieron diluciones de las células ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) de las cuales se crecieron 100  $\mu$ l de cada una en cajas de LB con XGal. Las cajas se incubaron a 37 °C ON. Posteriormente, se propagaron varias veces las colonias azules en cajas de LB con XGal, hasta observar colonias lisógenicas estables.



Para determinar que la cepas MC4100 contuviera una copia del profago recombinante se realizaron ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las colonias lisogénicas y se seleccionaron aquéllas con menor actividad. Se hicieron amplificaciones a partir de colonias aisladas de las cepas con las fusiones y se observó que los productos de amplificación fueran del mismo tamaño que los fragmentos *ccd* y *sfiA* respectivamente.

### Titulación y transducción con P1vir.

#### Titulación del fago P1vir.

Se centrifugaron 10 ml de un cultivo de la cepa MC4100 de fase exponencial (0.4 DO<sub>550</sub>, ~ 10<sup>9</sup> células/ml) a 4,000 g y se resuspendió en 1 ml de triptona 1 %. Se mezclaron 100  $\mu$ l de células con una solución de CaCl<sub>2</sub> 15 mM y MgSO<sub>4</sub> 30 mM y se incubó de 2 a 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron mezclas con 100  $\mu$ l de distintas diluciones del fago (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup>); las cuales, se incubaron sin agitación a 37 °C por 20 min. Cada mezcla se agregó a tubos de agar LC fundido (45 °C) y se vació en cajas de LC. Nuevamente, se cuantificaron las placas formadas en cada dilución.

#### Transducción del alelo (*rpoS359::Tn10*) a través del fago P1vir.

La transducción con P1vir se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Silhavy y colaboradores (1984). 500  $\mu$ l de un cultivo concentrado (10<sup>9</sup> células/ml) de la cepa MC4100  $\Phi$ (*ccd-lacZ*) en triptona 1 % se mezclaron con 500  $\mu$ l de una solución de CaCl<sub>2</sub> 15 mM y MgSO<sub>4</sub> 30 mM e incubaron de 2 a 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 500  $\mu$ l del fago (5x10<sup>7</sup> ufp/ml, previamente propagado en la cepa ZK920 (*rpoS359::Tn10*)) y se incubó sin agitación a 37 °C por 20 min. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y la pastilla resultante se resuspendió en 1.5 ml de medio LB y se volvió a centrifugar. Finalmente, las células se concentraron en 200  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se sembraron por espatulado en el medio selectivo correspondiente.

## Conjugación del plásmido pOX38Km<sup>R</sup>.

Cultivos la cepa donadora (C600 /pOX38Km<sup>R</sup>) y de las receptoras (MC4100, MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$ , MC4100  $rpoS^- \Phi(ccd-lacZ)$ , o MC4100 $\Phi(sfiA-lacZ)$ ) se incubaron en medio LB ON a 37 °C. Al día siguiente, con los ON de la cepas receptoras se crecieron cultivos de 10 ml del medio LB hasta alcanzar 0.4 unidades de DO<sub>550</sub> a 37 °C. Mas tarde se agregaron a cada cultivo 0.01 vol del ON de la cepa donadora y las mezclas se incubaron por 2 horas sin agitación a 37 °C. 100  $\mu$ l de cada mezcla fueron sembrados por espatulado en cajas con el medio de selección correspondiente a la cepa receptora y la resistencia del plásmido conjugado y se incubaron a 37 °C toda la noche. Las concentraciones de antibiótico empleadas se indican en el apéndice del presente trabajo.

## Transformaciones.

### Transformación química.

La transformación de la cepa MC4100 con la fusión  $\Phi(ccd-lacZ)$  o  $\Phi(sfiA-lacZ)$  con los plásmidos pKT279, pULB2707 se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Chung y colaboradores (1989). 10 ml de medio LB se inocularon con 50  $\mu$ l de un cultivo ON de la cepa a transformar y se incubó aeróbicamente a 37 °C hasta alcanzar 0.4 unidades de DO<sub>550</sub>. Se mezclaron volúmenes iguales del cultivo y el medio TSS 2X frío. Por cada 100  $\mu$ l de mezcla se agregaron de 50 a 100 ng de los plásmidos correspondientes y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, se les dio un choque de calor a 43 °C por 5 min y se regresaron al hielo 5 min más. A cada tubo se adicionaron 900  $\mu$ l de medio LB e incubaron por 1.5 horas a 37 °C. Se sembraron por espatulado 100  $\mu$ l de cada mezcla en el medio de selección correspondiente.

### Electroporación.

A 40  $\mu$ l de células competentes se les agregó 2 a 4  $\mu$ l del producto de ligación y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.5 cm. Las celdas se colocaron una cámara TransPorator Plus BTX y se trataron con 1.35 V por 4 milisegundos. Posteriormente, se les agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C por 1 hora. Finalmente, las células se concentraron en 10 veces y se sembraron por

espatulado en el medio de selección correspondiente. Las células electrocompetentes se prepararon de acuerdo al protocolo de Millar y Nickoloff (1995) con el fin de obtener  $\sim 2-4 \times 10^{10}$  células/ml.

#### Purificación de plásmidos.

Los plásmidos pRS415, pRS415 $\Phi$ (*ccd-lacZ*), pRS415 $\Phi$ (*sfiA-lacZ*), pKT279, pULB2707 y pMS01 se purificaron por el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Para ello, 1.5 ml de un cultivo ON se centrifugó 1 min a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se repitió la operación. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de Solución I con RNAsa e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló el contenido invirtiendo los tubos con 200  $\mu$ l de la Solución II y se colocó a 4°C por 5 min. Se adicionaron 150  $\mu$ l de la Solución III, se mezcló y centrifugó a 4°C 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se mezcló con volúmenes iguales de fenol/cloroformo, los cuales se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min. La fase superior se transfirió a otro tubo con 2 vol de etanol absoluto y se dejó precipitando un mínimo de 2 horas a -20°C. Los tubos con el DNA precipitado se centrifugaron en frío a 10,000 rpm 5 min, la pastilla se lavó con etanol 70 % y se volvió a centrifugar. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua.

El plásmido pOX38Km<sup>R</sup> se purificó de acuerdo al protocolo del "plasmid midi-prep" de QIAGEN; con el cual se obtuvo un rendimiento de 100  $\mu$ g/ml de DNA.

#### Obtención del patrón de distribución de los topoisómeros de un plásmido.

La purificación del plásmido pMOS1 se hizo por el método de lisis alcalina modificado (Sambrook y col., 1989). El cultivo de la cepa MC4100 $\Phi$ (*ccd-lacZ*)/pMOS1 se transfirió a tubos de 30 ml con 18 g de LB congelado y triturado. Las células se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga Jouan modelo MR18.12 (rotor angulado 8x35 ml). La pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l de solución I con RNAsa y se transfirió a un tubo Eppendorf, se agitó suavemente y se incubó en agua-hielo durante 10 min. Posteriormente, se adicionaron 400  $\mu$ l de solución II, y se

mezcló invirtiendo el tubo 4 veces y se incubó 10 min más en agua-hielo. Se adicionaron 300 µl de solución III y se agitó el tubo invertido por 10 seg en el vortex e incubó 10 min en agua-hielo. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron 650 µl de isopropanol e incubó toda la noche a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C y la pastilla se secó a 42 °C por 2 horas. La pastilla se resuspendió en agua y azul de bromofenol 0.4 %.

Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0.1 % en amortiguador TBE 1X con cloroquina 12 µg/ml; el amperaje utilizado fue de 25 volts durante 22 horas. El tamaño del gel fue de 9x15 cm. Antes de colocar las muestras en el gel, éstas se centrifugaron por 30 seg a 10,000 rpm y solamente se empleó el sobrenadante. Posterior a la electroforesis, el gel se lavó con agua destilada con agitación suave durante 4 horas cambiando el agua cada hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio (2.5 µg/ml) y se fotografió con una cámara KODAK TRI-X-PAN con filtro rojo utilizando un transiluminador de luz UV de onda corta.

#### **Separación de moléculas de DNA por electroforesis.**

La presencia de moléculas de DNA se determinó en geles de agarosa al 1 % en TBE 1X, corridos a 75 V. Las muestras contenían azul de bromofenol al 0.04 %. Para determinar el peso molecular se utilizó el marcador de un Kb de Invitrogen y los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2.5 µg/ml).

#### **Reacción de amplificación de cadena de DNA (PCR).**

##### Fragmento *ccd*.

La amplificación de la región reguladora del operón *ccdABrepD* de 1037 pb se realizó utilizando el plásmido pOX38Km<sup>R</sup> y los oligos *ccd1* y *ccd2* (tabla 4) que contienen en sus extremos 5' los sitios *EcoRI* y *SmaI*, respectivamente. La reacción se corrió en un termociclador Perkin Elmer modelo 9600 con el programa de 2 min a 94 °C (temperatura de desnaturalización); 30 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 61 °C (temperatura de alineamiento), 1 min a 68 °C (temperatura de extensión); y un ciclo de

10 min a 68°C (temperatura de extensión final). El fragmento amplificado de *ccd* se purificó por columna QIAquick de QIAGEN para productos de PCR.

#### Fragmento *sfiA*.

Se amplificó un fragmento de 608pb de la región reguladora del gene cromosomal *sfiA* de acuerdo al protocolo propuesto por Life Technologies, utilizando los oligos *sfiA1* y *sfiA2* (tabla 4) con las secuencias de reconocimiento de las enzimas *EcoRI* y *SmaI* en su extremos 5', respectivamente. Para ello se mezclaron en agua el amortiguador de amplificación GIBCO para Pfx 1X, nucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0.3 mM, oligo *sfiA1* 10 pmol/μl, oligo *sfiA2* 10pmol/μl, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, DNA cromosómico de la cepa MC4100 de 10 pg a 200 ng, DNA polimerasa Pfx 1-2.5U (las concentraciones de los reactivos son finales). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer modelo 9600, en el cual se corrió un programa de 5 min a 95°C (temperatura de desnaturalización); 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 59°C (temperatura de alineamiento), 1 min a 72°C (temperatura de extensión); y un ciclo de 10 min a 72°C (temperatura de extensión final). El fragmento amplificado de *sfiA* se purificó por columna QIAquick de QIAGEN para productos de PCR.

**Tabla 4.** Lista de oligos para la construcción de las fusiones transcripcionales.

<i>Oligos</i>	<i>Secuencia</i>
Ccd1	5' AGTGAATTCCAGCAGCGTGTCC 3' <sup>a</sup>
Ccd2	5' AGACCCCGGGCTTCATTCTGC 3' <sup>b</sup>
<i>sfiA1</i>	5' CCACCCGGGGCAAGGGGAGAGCTGGCTAATCTGC 3' <sup>b</sup>
<i>sfiA2</i>	5' CTGGAATTCAATGATCGGTATTCAATTGTGCCC 3' <sup>a</sup>
oligoZ	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG 3'

<sup>(a)</sup> Las letras en negrillas indican el sitio de corte de la enzima *EcoRI*.

<sup>(b)</sup> Las letras en negrillas indican el sitio de corte de la enzima *SmaI*.

### **Restricción y clonación de moléculas de DNA.**

#### Digestión con enzimas de restricción.

El DNA (productos de amplificación por PCR y plásmidos) se digirió con las enzimas *EcoRI* y *SmaI*, en una relación constante de una unidad de enzima por cada microgramo de DNA. Las enzimas se emplearon de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Life Technologies).

Las reacciones de corte se hicieron por separado y después de cada reacción, el DNA se limpió con volúmenes iguales de fenol/cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. A la fase orgánica se le agregaron 2 vol de etanol absoluto y NaCl 33 mM y se dejó precipitando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 2 vol de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar. La pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua.

#### Reacción de ligación.

La reacción de ligación se llevó a cabo con los fragmentos amplificados, *ccd* o *sfiA*, y el vector pRS415, previamente digeridos con las enzimas *EcoRI* y *SmaI*, y la enzima Ligasa de T4 (1 U/ $\mu\text{g}$  de DNA). Se empleó el protocolo recomendado por el proveedor (Life Technologies).

#### **Cuantificación de la actividad de $\beta$ -galactosidasa.**

La actividad de la enzima se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Miller (1992). Una alícuota (1 ml) de cultivo se incubó por 5 min con cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min. Las células se resuspendieron en 1 ml de NaCl 0.8 %, se centrifugaron nuevamente, se resuspendieron en 1 ml de amortiguador Z y se cuantificó la densidad óptica de cada tubo a  $\text{DO}_{600}$  en un espectrofotómetro BECKMAN modelo DU-65. Se hicieron diluciones de la suspensión anterior (25, 50 y 100  $\mu\text{l}$ ) en 1 ml final de amortiguador Z y se le agregó a cada dilución 10  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 5  $\mu\text{l}$  de SDS 0.1 %. Los tubos se agitaron por 5 min en el vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se les agregó 200  $\mu\text{l}$  de ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galtopiranosido, 4 mg/ml), se agitaron y se comenzó a tomar el tiempo hasta que la solución se tornó amarillenta. La reacción se detuvo con 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Se determinó la densidad óptica del contenido de los tubos a  $\text{DO}_{420}$  y  $\text{DO}_{550}$ . Para calcular la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por densidad celular, se utilizó la ecuación de Miller:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000[DO_{420} - (DO_{550} \times 1.75)]}{l \times v \times DO_{600}}$$

t = tiempo de la reacción (min).

v = volumen de la dilución celular (ml).

Los cultivos bacterianos que se incubaron por periodos prolongados se hidrataron cada 24 horas con 0.01 vol de agua estéril.

### Visualización de las proteínas CcdA y CcdB por ensayo de "Western-blot".

#### Precipitación de proteínas.

Una muestra de cultivo de diferentes cepas ( $\sim 2 \times 10^8$  células/ml) se mezcló con el inhibidor de proteasas PMSF 50  $\mu$ M y ácido tricloroacético 5 % final y se incubó en hielo por 20 min. La mezcla se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con Tris 25 mM pH 8.0 - etanol (1:1) y se volvió a centrifugar. La muestra se secó y resuspendió en 40  $\mu$ l de amortiguador Laemmli de corrida con 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### Ensayo de Western blot.

Los extractos de proteínas se corrieron en geles desnaturizantes de glicina-poliacrilamida ("glycine-SDS-PAGE"). Las muestras se hirvieron durante 3 min antes de cargarlas en el gel.

Los geles se prepararon de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). El gel separador se preparó con acrilamida 16.5 %, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1 % y se polimerizó con persulfato de amonio 10 mM y TEMED 0.025 %. El gel concentrador contenía acrilamida 3 %, Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 0.1 % y se polimerizó de manera semejante al gel separador. Los geles se corrieron en una cámara para electroforesis verticales PROTEAN II Cell (BioRad) con amortiguador Laemmli a 70 V para el gel concentrador y 140 V para el separador o en una cámara MINI PROTEAN III Cell (BioRad). Se hicieron geles de referencias para determinar que la cantidad de proteína cargada en las distintas condiciones fuera la misma.

La parte inferior de los geles se electro-transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher-Schuell) en una cámara de transferencia MINI TRANSBLOT Cell (BioRad) con amortiguador de transferencia a 100 V (250-350 mAmp) durante 1 hora ó 30 V (69 mAmps) toda la noche.

Las proteínas CcdA y CcdB se detectaron con ayuda de anticuerpos policlonales de conejo (donación generosa de Martine Couturier). Las membranas se incubaron en una solución de leche descremada (Svelty) con PBS-Tween 20 0.1 % una hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 3 veces por 5 min con PBS-Tween 20 0.1 %. Posteriormente, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo primario anti-CcdA (1/1000, durante 1.5 horas a temperatura ambiente) o anti-CcdB (1/200, toda la noche a 4 °C) diluidos en PBS-Tween 20 0.1 %. Se lavaron 6 veces cada 5 min con PBS-Tween 0.1 % y se incubaron durante 20 ó 45 min respectivamente en presencia del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo limpio\* (1/1500, ZYMED) diluido en PBS-Tween 20 0.1 %. Las membranas se lavaron 2 veces 5 min con PBS-Tween 20 0.1 % y 3 veces 5 min con PBS. Las membranas se trataron con un Kit ECL™ (RPN 2209) de Amersham quimioluminisciente y se expusieron a diferentes tiempos a películas de rayos X (X-Omat 8x10", Kodak); las cuales se revelaron según las recomendaciones del proveedor.

\* El anticuerpo diluido se incubó dos veces en presencia de una membrana con proteínas de la cepa MC4100 durante 45 min a temperatura ambiente.



## RESULTADOS

Regulación de la transcripción del sistema *ccd* en bacterias en fase de crecimiento exponencial y estacionario.

El sistema de muerte celular *ccd* se ha estudiado principalmente durante la fase de crecimiento exponencial (FE) (de Feyter y col., 1989; Tam y Kline, 1989a y 1989b; Salmon y col., 1994); sin embargo, se desconoce su actividad en células que no están dividiéndose activamente. Se sabe que durante la fase estacionaria de crecimiento (FS) de *E. coli* la transcripción y traducción de muchos genes disminuyen importantemente y se incrementan las de genes específicos de dicho estrés nutricional (Hengge-Aronis, 2002). Por lo cual, es necesario conocer si este operón se transcribe y, sobre todo, si las proteínas CcdA y CcdB se encuentran presentes en las células bajo éstas condiciones. En una primera etapa se determinó el nivel de expresión de *ccd* a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa MC4100 con la fusión transcripcional  $\Phi(ccd-lacZ)$  en medio LB o en LB-MOPS. El pH en cultivos de FS en medio LB-MOPS permanece neutro (7.0-7.3); mientras que en los cultivos en LB aumenta hasta 8.6 durante la FS tardía. En el primer caso las células están únicamente bajo estrés nutricional; mientras que en el segundo están bajo estrés nutricional y de pH alcalino. Es probable que la alcalinización de los cultivos en LB se deba a la secreción de compuestos aminados al medio de crecimiento (Lazar y col., 1998).

Las figuras 5a y 5b muestran que la actividad de la enzima reportera  $\beta$ -galactosidasa, en ausencia de las proteínas reguladoras CcdA y CcdB, aumentó progresivamente conforme las células se acercan a la FS. A las 9 horas de crecimiento, aproximadamente 3 horas de FS, la actividad de la enzima reportera fue 8.5 (LB-MOPS) ó 9 veces (LB) más alta que la observada a la mitad de la FE (mid-log) (450 a 550 unidades Miller). Después de este incremento, la actividad de la enzima en bacterias en FS de 1-3 días disminuyó, pero se mantuvo aproximadamente 4.5 (LB-MOPS) ó 6 (LB) veces más alta que en las bacterias en mid-log. Al día 5 de FS se observó un incremento reproducible en la actividad de la enzima en bacterias de cultivos en LB-MOPS o LB.

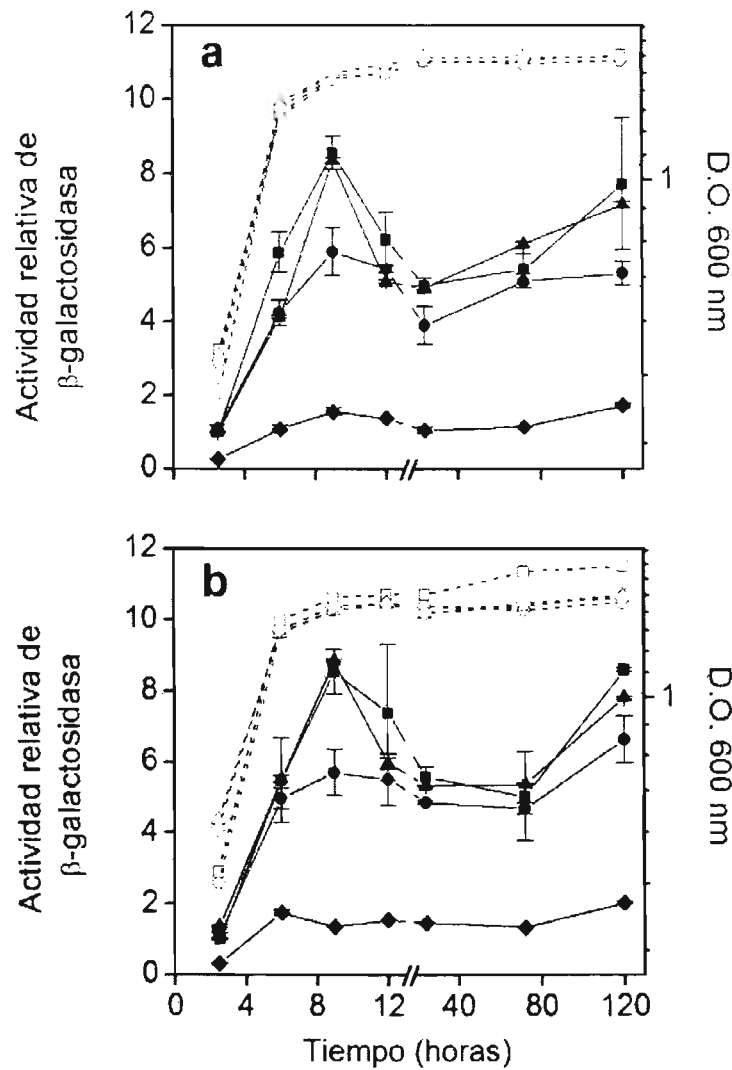


Figura 5. Actividad transcripcional del sistema *ccd* a lo largo de la curva de crecimiento. Las cepas crecieron en a) LB o b) LB-MOPS. Los símbolos abiertos representan el crecimiento celular en D.O. 600 nm de  $\lambda$ . Los símbolos cerrados representan la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en unidades Miller relativas, donde una unidad relativa corresponde a 450-550 unidades Miller de células en mid-log. (■) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  (0 copias del operón *ccdAB*); (●) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pOX38Km$  (una copia del operón *ccdAB*); (▲) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pKT279$  (vector con 0 copias del operón *ccdAB*); (◆) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pUL2707$ (15-20 copias del operón *ccdAB*). Los resultados son el promedio de al menos 3 experimentos donde la desviación estándar no fue mayor a 20 %.

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  con el plásmido pOX38-Km (1 copia del operón *ccd*) fue menor que la actividad mostrada en esta cepa sin el plásmido (figura 5a y 5b). A las 3 horas de FS (9 h de crecimiento), la actividad de la enzima, al igual que en la cepa sin plásmido, alcanzó su nivel máximo. En este caso la actividad de la enzima fue aproximadamente 6 veces mayor que la mostrada en mid-log. Después la actividad bajó, pero se mantuvo a niveles superiores que en las bacterias en FE y volvió a aumentar al día 5. Los resultados fueron similares en las bacterias de cultivos en LB-MOPS o LB. Es importante señalar que los resultados obtenidos durante la fase estacionaria tardía deben tomarse con reserva, ya que se desconoce la estabilidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en estas condiciones y, por lo tanto, podrían no reflejar los niveles reales de transcripción.

Adicionalmente, se determinó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en presencia de un plásmido multicopia con y sin el operón *ccd*. Esta actividad fue aproximadamente 10 veces menor en la cepa MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pULB2707$  que en la cepa con el plásmido vector MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pKT279$  o en la cepa sin plásmido (450 a 550 unidades Miller). Lo anterior implica que la presencia de una concentración alta de las proteínas CcdA y CcdB reprime de manera importante la transcripción del operón *ccd*. Sin embargo, la actividad de la enzima fue también mayor en las bacterias en FS que en mid-log. Nuevamente, en este caso no se observaron diferencias significativas entre las bacterias de cultivos en LB-MOPS o LB.

Estos resultados sugieren que la actividad transcripcional del operón *ccd* en ausencia de las proteínas CcdA y CcdB aumenta a lo largo de la curva de crecimiento y alcanza un máximo en la FS temprana. Posteriormente, se observa una disminución en el nivel de transcripción del operón *ccd* y un incremento reproducible a los 5 días de FS. Sin embargo, durante la FS este nivel se mantiene significativamente más elevado que en las bacterias en mid-log. La presencia de CcdA y CcdB cuando están codificadas por una copia del operón *ccd* (plásmido pOX38-Km) inducen una disminución en la transcripción del operón; sin embargo, el patrón de transcripción a lo largo de la curva de crecimiento es similar al que presentan las bacterias sin las

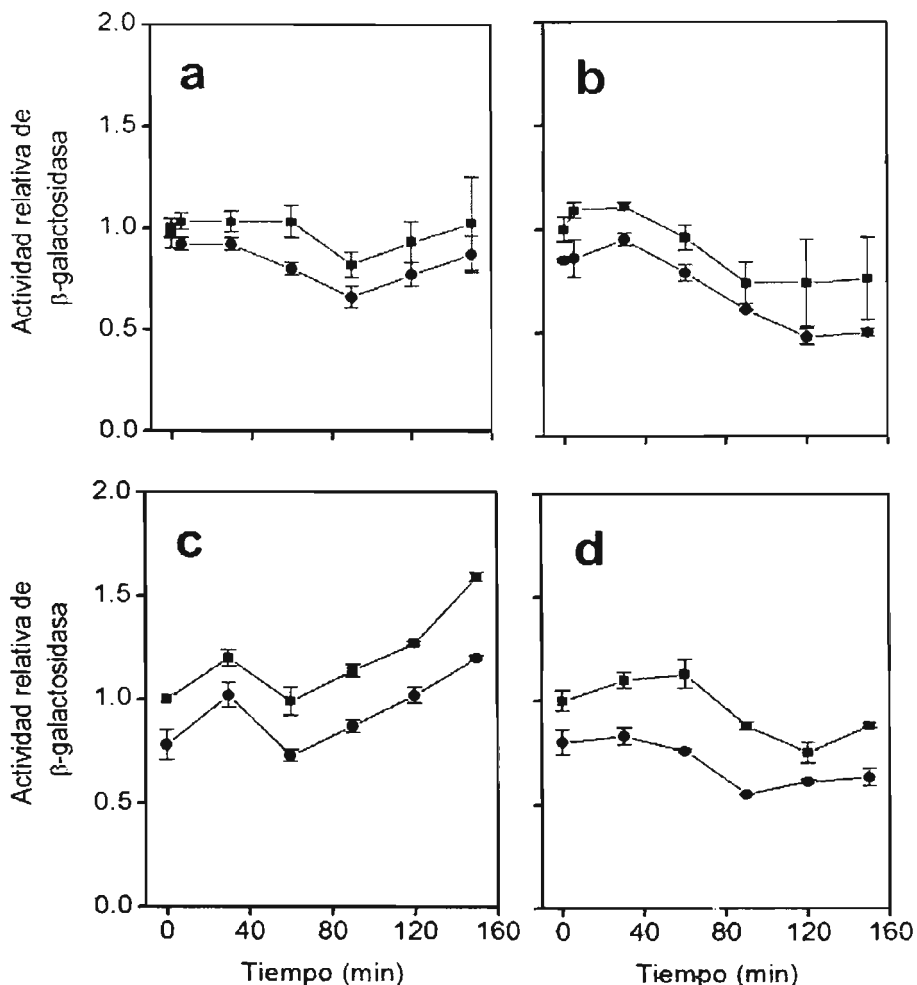
proteínas Ccd. Esto sugiere que si bien la cantidad de proteína que se sintetiza a partir de una copia del operón *ccd* induce una disminución en la transcripción del operón, esta cantidad no es suficiente para reprimir la transcripción del operón *ccd* a niveles más bajos o iguales a los que se observan en bacterias en mid-log. Sin embargo, la cantidad de estas proteínas en bacterias con un número alto de copias del operón sí reprime de forma importante la transcripción. Los eventos de inducción y regulación de la transcripción no son afectados por el cambio de pH en el medio de cultivo.

#### **Regulación de la transcripción del sistema *ccd* durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrimentos.**

La FS es una respuesta a la limitación de nutrimentos y la consecuente disminución del metabolismo bacteriano (Hengge-Aronis, 2000). Aunque en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la FS, todavía se desconocen muchos aspectos de la fisiología de las células en esta fase y en particular del sistema *ccdAB*. Por ejemplo, no se sabe si en las células en FS la vida media de CcdA es menor que la de CcdB, como está reportado para la FE. Por otra parte, se sabe que CcdB requiere que girasa esté unida al DNA en presencia de ATP para poder inhibir su actividad (Bernard y col., 1993) y en las bacterias en FS la concentración de ATP es baja. El blanco de CcdB, la enzima girasa, se encuentra presente en las células de FS y recupera su actividad rápidamente en respuesta al aumento en la poza de ATP al añadirse nutrimentos (Reyes-Dominguez y col., 2003). Por lo tanto, es posible que el efecto tóxico de CcdB sobre girasa pudiera darse durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrimentos; por lo cual, se decidió evaluar la expresión del operón *ccd* bajo estas condiciones.

Cuando se añadieron nutrimentos a los cultivos de 120 h en FS, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa disminuyó aproximadamente 5 veces con respecto a la observada a los 5 días de FS (5000 unidades Miller) y se mantuvo constante por más de 150 minutos de incubación. El resultado fue similar para los cultivos en LB-MOPS o LB (figura 6a y 6b). Sin embargo, en los cultivos de 24 h de incubación, sí se observó un ligero aumento en la actividad de la enzima después de 90 minutos de recuperación (figura 6c). La actividad transcripcional de la cepa MC4100 $\Phi$ (*ccd-lacZ*) con el plásmido

pOX38-Km en las distintas condiciones, resultó ser menor en comparación de la cepa sin el plásmido (figura 6a, b, c, y d).



**Figura 6.** Actividad transcripcional del sistema *ccd* durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrientes. Los símbolos representan unidades Miller relativas, donde una unidad relativa corresponde a 1000-1200 unidades Miller de células a tiempo 0. Las cepas (■) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  y (●) MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)/pOX38Km$  se diluyeron 1:10 en medio LB-MOPS (a) y LB (b) después de 120 h o en LB-MOPS después de 24 h (c) de incubación. Las células que crecieron en LB-MOPS por 120 h se lavaron previamente a la dilución (d) (ver material y métodos). Los resultados son el promedio de al menos 3 experimentos donde la desviación estándar no fue mayor al 10 %.

Para determinar si el(os) producto(s) metabólico(s) de la FS pudiera(n) reprimir la transcripción de la fusión  $\Phi(ccd-lacZ)$ , se eliminó el sobrenadante de las células de 120 horas de incubación y se les agregó medio nuevo. El resultado muestra que la actividad de la enzima bajo estas condiciones es similar al observado en el cultivo normal (figura 6d).

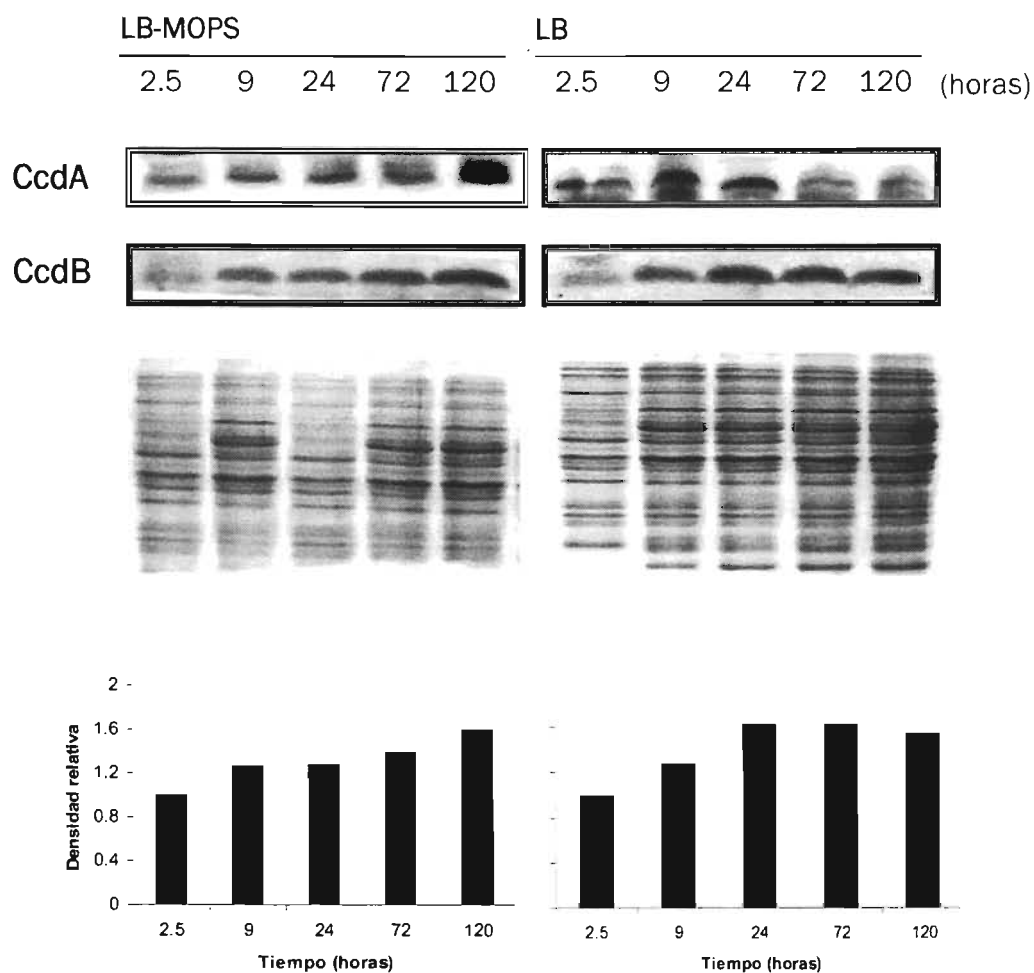
Los datos anteriores sugieren que la actividad transcripcional del operón *ccdAB* se mantiene baja aún después de 150 minutos de la adición de nutrientes a los cultivos de FS tardía (120 h). En el caso de cultivos de 24 h de crecimiento en LB-MOPS, se observó un moderado incremento en esta actividad 90 min después de añadirse nutrientes al cultivo. Asimismo, la expresión de la fusión  $\Phi(ccd-lacZ)$  es independiente de los cambios de pH y de moléculas disueltas en el medio de cultivo de 120 horas de incubación. El efecto represor de las proteínas CcdA-CcdB sobre la transcripción de la fusión  $\Phi(ccd-lacZ)$  estuvo presente en las condiciones experimentales de recuperación del crecimiento analizadas en este trabajo.

#### **Determinación de la cantidad relativa de CcdA y CcdB durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario.**

El sistema proteico de muerte celular *ccd* ha sido estudiado extensivamente en células que pierden el plásmido F durante el crecimiento (Bernard y Couturier, 1993; Bex y col., 1993; Van Melderen y col., 1994; Maki y col., 1996). Se sabe que al inicio de la FS las células sufren un alto recambio de proteínas (Hengge-Aronis, 2002). Es posible que en esta fase, donde hay poca división celular y una pérdida baja del plásmido F (datos no mostrados), el efecto tóxico de CcdB pueda darse debido a un decremento en la expresión de las proteínas Ccd. Por lo tanto, para los fines del presente trabajo resultó importante demostrar la presencia y la relación que guardan las proteínas CcdA y CcdB durante un estrés por limitación de nutrientes.

A través de un ensayo de "Western blot" se determinó la presencia de las proteínas Ccd en la mid-log de la curva de crecimiento y durante la FS. En un medio amortiguado (LB-MOPS) no fue posible determinar con claridad la expresión de la proteína CcdA de acuerdo al protocolo descrito en los Materiales y Métodos debido a

que el anticuerpo reconocía, además de CcdA, otra proteína de un peso molecular semejante. Sin embargo, en una reciente publicación a través de ensayos de inmunoprecipitación se lograron determinar dichas variaciones (Aguirre-Ramírez y col., 2005). La identificación de CcdA a partir de los extractos de medio LB fue un poco mas clara.



**Figura 7.** Expresión de las proteínas CcdA y CcdB durante un estrés nutricional prolongado. Los extractos protéicos de la cepa MC4100/pOX38Km se separaron en geles desnaturizantes de poliácridamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para el ensayo de Western-blot. Para CcdB se obtuvieron resultados semejantes en al menos tres experimentos independientes. Se usaron como controles los extractos de cepa MC4100/pUL2707 sobreproductora de CcdA y CcdB. Se muestra un experimento representativo.

En medio LB los niveles de la proteína CcdA aumentan conforme las células alcanzan la FS (figura 7), y dicho aumento se mantiene constante hasta las 24 h de crecimiento. Sin embargo, después de 72 h de crecimiento la cantidad de CcdA disminuyó a niveles muy semejantes a los observados durante la mid-log. Un comportamiento semejante fue observado en medio LB-MOPS (Aguirre-Ramírez y col., 2005). Asimismo, la proteína CcdB aumentó al inicio de la FS en células cultivadas en ambos medios. En este caso la cantidad de CcdB se mantuvo constante y por encima de lo observado en la mid log; aún después de cinco días de crecimiento tanto en medio LB-MOPS como en LB.

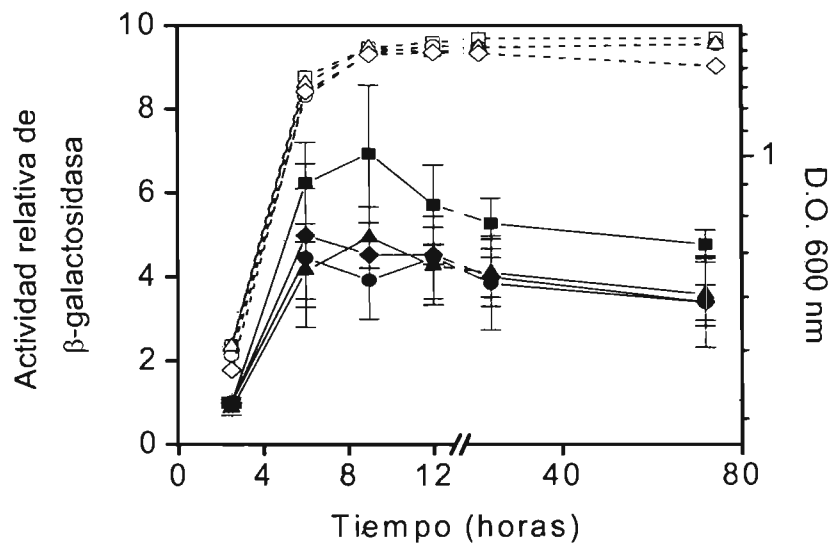
Los datos obtenidos sugieren un aumento en la cantidad de las proteínas Ccd en células bajo un estrés nutricional. Se ha propuesto que un aumento en el nivel transcripcional del operón *ccd* es esperado cuando hay una mayor cantidad de CcdB con respecto a CcdA (Afif y col., 2001). Por lo tanto, la clara disminución de la proteína CcdA a los tres días de crecimiento, podría estar relacionada con el aumento en la actividad transcripcional del operón *ccd* observada a los cinco días de FS (figura 5).

#### **Efecto del gene *rpoS* en la regulación de la transcripción del sistema *ccd* durante la fase estacionaria.**

La expresión de aproximadamente 100 genes necesaria para la supervivencia de la célula durante el estrés nutricional es dependiente del factor  $\sigma^s$  (Hengge-Aronis, 2002; Weber y col., 2005). El análisis de la región -10 del promotor *ccd* sugiere una posible regulación por dicho factor. Se sabe que durante la FE de crecimiento el principal regulador de la expresión de *ccd* es  $\sigma^{70}$ ; sin embargo, la secuencia propuesta para la región -10 del promotor (ATATACT) podría ser también reconocida por el factor  $\sigma^s$ . A pesar de que en la secuencia -10 consenso (CTACACT) del factor  $\sigma^s$  la C inicial es altamente conservada, se sabe de al menos tres promotores de genes fuertemente dependientes de  $\sigma^s$  que presentan una A en dicha posición (Lee y Gralla, 2001). Por lo tanto, en el presente trabajo decidimos evaluar el papel de  $\sigma^s$  en la expresión del operón *ccd*.



Los experimentos se realizaron únicamente en medio LB-MOPS, donde la viabilidad de la mutante *rpoS* es similar a la cepa silvestre (Lazar y col., 1998). En LB la cepa mutante presenta una menor viabilidad que la silvestre a tiempos prolongados de fase estacionaria (datos no mostrados). En la figura 8 se observa que la actividad transcripcional de la  $\Phi(ccd-lacZ)$  en ausencia del plásmido pOX38Km en la cepa *rpoS::Tn10* es menor que en la cepa silvestre. Sin embargo, la expresión de la fusión varía de manera semejante a la cepa silvestre; es decir, la transcripción aumenta al inicio de la FS y posteriormente disminuye a niveles por encima de los observados durante la mid-log. La presencia del plásmido pOX38Km no modificó la expresión de la fusión  $\Phi(ccdAB-lacZ)$  en la mutante *rpoS*, contrario a la disminución observada en la cepa silvestre.

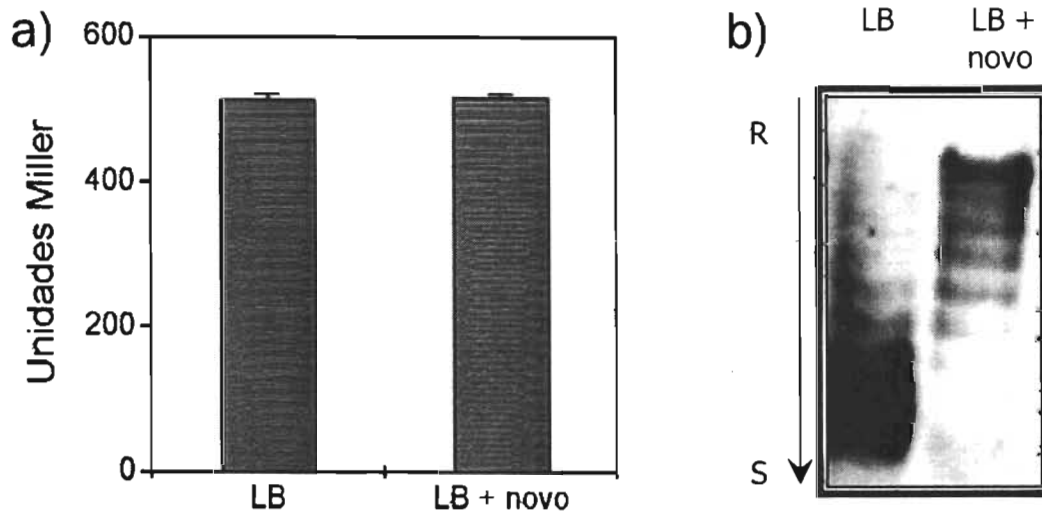


**Figura 8.** Efecto de una mutante *rpoS* sobre la transcripción del sistema *ccd* a lo largo de la curva de crecimiento. Las cepas MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  y la cepa MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  *rpoS::Tn10* se cultivaron en medio LB-MOPS. Los símbolos abiertos representan el crecimiento celular en D.O. 600 nm de  $\lambda$ . Los símbolos cerrados muestran las unidades Miller relativas donde una unidad corresponde a 450-550 unidades Miller de células en mid-log. (■) cepa silvestre; (●) cepa silvestre /pOX38 (una copia del operón *ccdAB*); (▲) cepa *rpoS*; (◆) cepa *rpoS* /pOX38 (una copia del operón *ccdAB*). Los resultados son el promedio de al menos 3 experimentos donde la desviación estándar no fue mayor a 20 %.

Los resultados indican que en ausencia de las proteínas reguladoras CcdA-CcdB,  $\sigma^S$  puede contribuir de manera parcial en el nivel de expresión del operón *ccd* y en ausencia de dicho complejo represor la transcripción del operón depende principalmente de  $\sigma^{70}$ .

#### Efecto del superenrollamiento en la regulación de la transcripción del sistema *ccd*.

En la naturaleza se conocen genes cuya expresión es regulada por el grado de superenrollamiento del DNA. Asimismo, durante la fase estacionaria el nucleóide se encuentra más relajado (Travers y Muskhelishvili, 2005). Para evaluar si el aumento en la expresión de los genes *ccdAB* se debe a cambios del superenrollamiento del DNA, la cepa MC4100 con la fusión  $\Phi(ccd-lacZ)$  se transformó con el plásmido pMS01 y se determinaron la actividad de  $\beta$ -galactosidasa y la distribución de topoisómeros en presencia de novobiocina, inhibidor de la subunidad  $\beta$  de la girasa. Sin embargo, no se observó una modificación de la expresión del sistema *ccd* (figura 9a) a pesar de los cambios en el superenrollamiento inducidos por la novobiocina (figura 9b).

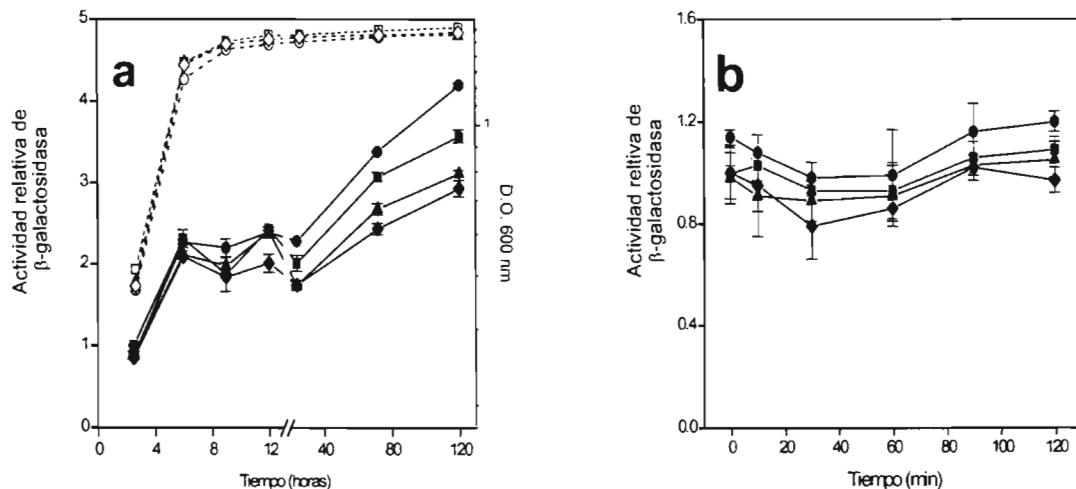


**Figura 9.** Efecto del superenrollamiento sobre la transcripción del sistema *ccd*. La cepa MC4100  $\Phi(ccd-lacZ)$  con el plásmido multicopia reportero pMS01 creció aeróbicamente a 37 °C en medio LB hasta 0.4 DO<sub>550</sub>, se agregó al cultivo novobiocina 600  $\mu$ g/ml y se continuó la incubación por 10 min. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa (a) y la distribución de topoisómeros (b) se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos en materiales y métodos. R= plásmidos relajados. S= plásmidos superenrollados. Experimento representativo.

Los resultados sugieren que bajo las condiciones estudiadas el superenrollamiento no afecta la regulación de la expresión del operón *ccd*.

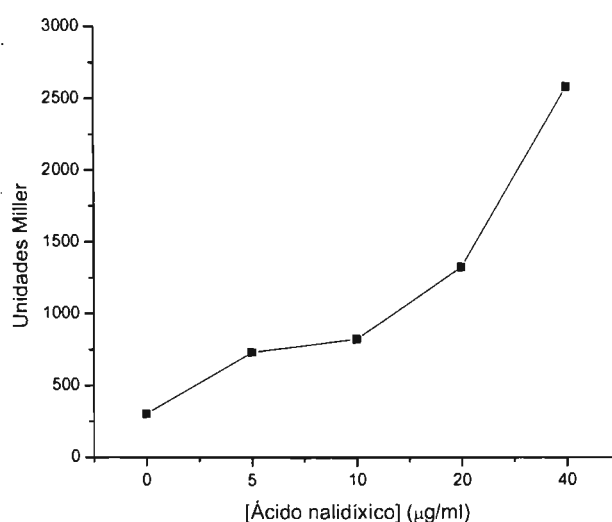
#### Inducción del sistema SOS durante la fase estacionaria.

Se sabe que la inhibición por CcdB de la actividad de endonucleasa de la subunidad A de la girasa, genera cortes de doble cadena que inducen la respuesta SOS (Sommer y col., 1985). Por lo cual, en el presente trabajo se construyó una fusión transcripcional del promotor del gene *sfiA*; el cual pertenece a uno de los primeros genes que se expresan durante la respuesta jerárquica del sistema SOS y se evaluó su expresión en presencia de los plásmidos que contiene al sistema *ccd*.



**Figura 10.** Efecto del sistema *ccd* en la inducción de SOS. La actividad de β-galactosidasa se cuantificó a lo largo de la curva de crecimiento (a) y durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrientes (b). Las cepas se cultivaron en medio LB-MOPS. Los símbolos abiertos representan el crecimiento celular en D.O. 600 nm de λ. Los símbolos cerrados representan la actividad de β-galactosidasa en unidades Miller relativas, donde una unidad relativa corresponde a 450-550 unidades Miller de células en mid-log. (■) MC4100 Φ(*sfiA-lacZ*) (0 copias del operón *ccdAB*); (●) MC4100 Φ(*sfiA-lacZ*)/pOX38Km (una copia del operón *ccdAB*); (▲) MC4100 Φ(*sfiA-lacZ*)/pKT279 (vector con 0 copias del operón *ccdAB*); (◆) MC4100 Φ(*sfiA-lacZ*)/pUL2707(15-20 copias del operón *ccdAB*). Los resultados son el promedio de al menos 3 experimentos donde la desviación estándar no fue mayor al 10 %.

Los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa efectuados con la cepa MC4100  $\Phi$ (*sfiA-lacZ*), transformada con los plásmidos pOX30-Km y pULB2707 no mostraron ningún cambio significativo sobre la expresión del gene *sfiA* con respecto a la cepa sin plásmido (figura 10a). Estos datos se obtuvieron al cultivar las cepas tanto en medio LB-MOPS como en LB. Asimismo, durante la recuperación del crecimiento en ambos medios de cultivo no se observó ningún cambio en presencia de los plásmidos que contienen al operón *ccdAB* (figura 10b). Sin embargo, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa MC4100  $\Phi$ (*sfiA-lacZ*) aumentó después de 30 min de incubación en presencia de distintas concentraciones de ácido nalidíxico (figura 11).



**Figura 11.** Activación de la expresión del gene *sfiA* en presencia de ácido nalidíxico. La cepa MC4100  $\Phi$ (*sfiA-lacZ*) se creció en medio LB-MOPS y la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se cuantificó 30 min después de agregar al cultivo distintas concentraciones del antibiótico.

Estos últimos datos indican que el sistema *ccd* no induce la respuesta SOS en células en crecimiento activo, durante la fase estacionaria o durante la recuperación del crecimiento por adición de nutrientes.

## DISCUSIÓN

Se ha propuesto que los sistemas de antídoto-toxina pudieran tener funciones adicionales a la de la estabilidad de los plásmidos dentro de la célula (Gerdes, 2000; Pandey y Gerdes, 2005). La conservación de dichos sistemas, tanto en plásmidos como en cromosomas bacterianos, sugiere una función biológica para la muerte celular que puede inducir y por lo tanto, se le ha relacionado con mecanismos de adición génica y evolución (Kobayashi, 2004). Sin embargo, el hecho de que no todas las células en las que se activa la toxina mueren, y que al menos el sistema cromosomal MazEF (Gerdes y col., 2005) y el plásmidico *ccd* (este trabajo) aumentan su expresión en condiciones de estrés nutricional, muestra que estos sistemas pueden tener otras funciones. Por ejemplo, se ha propuesto que estos sistemas favorecen un estado bacteriostático de supervivencia celular durante el estrés nutricional al contribuir a la disminución de la síntesis de macromoléculas en las células en ayuno (Gerdes, 2000).

Los resultados del presente trabajo sugieren que el sistema *ccd* pudiera tener la función bacteriostática, debido a que la actividad transcripcional del promotor aumenta a lo largo de la curva de crecimiento y durante la entrada a la fase estacionaria, al igual que las cantidades de proteínas CcdA y CcdB se mantienen altas en condiciones prolongadas de estrés nutricional, en comparación a la fase exponencial de crecimiento. La presencia de las proteínas Ccd en esta fase abre la posibilidad de que en condiciones fisiológicas de las células en ayuno, la toxina CcdB pueda actuar. Se sabe que la relación estequiométrica entre CcdA y CcdB modula la unión del complejo represor al promotor; es decir el tetrámero CcdA<sub>2</sub>-CcdB<sub>2</sub> es capaz de pegarse al operador, mientras que el hexámero CcdA<sub>2</sub>-CcdB<sub>4</sub> no se une. Además, un exceso de CcdB desestabiliza la unión del tetrámero al operador. (Afif y col, 2001).

Lo anterior explica el aumento en la transcripción del sistema *ccd* al inicio y en periodos prolongados de la fase estacionaria; donde ambas proteínas se encuentran presentes y CcdB parece ser más abundante. Sin embargo, se requieren experimentos más cuantitativos para determinar la relación de CcdA/CcdB en las células bajo estrés.

Asimismo, la proteasa Lon aumenta su actividad en condiciones de estrés nutricional (Gottesman, 1996) por lo que es posible, que en células con plásmido, se dieran cambios en la relación de las proteínas CcdA y CcdB. Por lo tanto, el sistema *ccd* podría activarse por dos vías, al aumentar su transcripción en estados estacionarios de crecimiento y por la actividad de la proteasa Lon sobre la antitoxina (CcdA) durante esta fase (Gerdes y col., 2005).

Adicionalmente, demostramos que la transcripción de *ccd*, al menos bajo condiciones en las cuales el complejo represor CcdA-CcdB no está presente, es parcialmente dependiente de  $\sigma^S$ ; el principal factor transcripcional que regula la mayoría de la expresión de los genes de fase estacionaria (Hengge-Aronis, 2002). Es posible que CcdB, al interactuar con GyrA, pudiera contribuir a disminuir la tasa de replicación en bacterias bajo estrés; ya que se ha demostrado que la cantidad de girasa no disminuye durante la fase estacionaria (Reyes-Domínguez y col., 2003).

Asimismo, se ha propuesto que el sistema *ccd* podría jugar un papel en la generación de variabilidad genética en la fracción de células que no heredan el plásmido F (Couturier y col., 1998). Esta variabilidad se observaría en aquellas células que en crecimiento activo pierden el plásmido durante la división celular y no mueren por el daño en el DNA generado por la inhibición de CcdB sobre girasa. La reparación de este daño se da durante la respuesta SOS, la cual es frecuentemente mutagénica. Las células en las que la reparación no es rápida y eficiente, mueren, mientras que la fracción de células que sobrevive muestra diversidad genética. Las células que no se dividen activamente y que conservan el plásmido, pueden también generar diversidad genética.

En el presente trabajo caracterizamos la expresión y regulación del sistema *ccd* en condiciones de limitación de nutrimentos. Sin embargo, no logramos determinar su posible papel en la generación de diversidad genética propuesto en la hipótesis. En un trabajo posterior (anexo) realizado en el laboratorio de la Dra. Carmen Gómez, se llevaron a cabo experimentos de “mutación adaptativa” (Cairns y Foster, 1991). Este tipo de mutaciones se presentan en células que no se dividen activamente bajo

condiciones no letales de selección y están dadas principalmente por mecanismos de reparación por recombinación de cortes de doble cadena de DNA (Foster, 2004). Los resultados mostraron que el efecto mutagénico es aparente únicamente cuando se sobreexpresa el sistema *ccd* y bajo condiciones de ayuno prolongado (Aguirre-Ramírez y col., 2005).

## CONCLUSIONES

- La transcripción del sistema *ccd* aumenta durante el crecimiento celular y la fase estacionaria temprana. Dicho aumento es menor en presencia de concentraciones altas de las proteínas represoras.
- El comportamiento de la actividad transcripcional del sistema *ccd* durante la fase estacionaria no se afecta por el pH del medio.
- A tiempos largos de la fase estacionaria se observa una ligera disminución de la transcripción del sistema *ccd*. Sin embargo, después de 5 días de fase estacionaria, los niveles de transcripción del operón se mantienen altos con respecto a la fase exponencial.
- Durante la recuperación del crecimiento no se presentan cambios significativos en los niveles de transcripción del sistema *ccd* durante la recuperación de crecimiento por adición de nutrimentos.
- Las proteínas CcdA y CcdB se encuentran presentes durante periodos prolongados de fase estacionaria y en mayor cantidad con respecto a la fase de crecimiento exponencial.
- La expresión del sistema *ccd*, en ausencia de las proteínas represoras, es parcialmente dependiente de regulador global de fase estacionaria  $\sigma^S$ .
- La expresión del sistema *ccd* no se ve afectada por los cambios de superenrollamiento del DNA.
- El sistema *ccd* no induce la respuesta SOS bajo las condiciones estudiadas.

condiciones no letales de selección y están dadas principalmente por mecanismos de reparación por recombinación de cortes de doble cadena de DNA (Foster, 2004). Los resultados mostraron que el efecto mutagénico es aparente únicamente cuando se sobreexpresa el sistema *ccd* y bajo condiciones de ayuno prolongado (Aguirre-Ramírez y col., 2005).

## CONCLUSIONES

- La transcripción del sistema *ccd* aumenta durante el crecimiento celular y la fase estacionaria temprana. Dicho aumento es menor en presencia de concentraciones altas de las proteínas represoras.
- El comportamiento de la actividad transcripcional del sistema *ccd* durante la fase estacionaria no se afecta por el pH del medio.
- A tiempos largos de la fase estacionaria se observa una ligera disminución de la transcripción del sistema *ccd*. Sin embargo, después de 5 días de fase estacionaria, los niveles de transcripción del operón se mantienen altos con respecto a la fase exponencial.
- Durante la recuperación del crecimiento no se presentan cambios significativos en los niveles de transcripción del sistema *ccd* durante la recuperación de crecimiento por adición de nutrimentos.
- Las proteínas CcdA y CcdB se encuentran presentes durante periodos prolongados de fase estacionaria y en mayor cantidad con respecto a la fase de crecimiento exponencial.
- La expresión del sistema *ccd*, en ausencia de las proteínas represoras, es parcialmente dependiente de regulador global de fase estacionaria  $\sigma^S$ .
- La expresión del sistema *ccd* no se ve afectada por los cambios de superenrollamiento del DNA.
- El sistema *ccd* no induce la respuesta SOS bajo las condiciones estudiadas.



## REFERENCIAS

- Afif, H.; Allali, N.; Couturier, M. y Van Melderen, L. (2001) The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the *ccd* poison-antidote system. *Mol. Microbiol.* 41:73-82
- Aguirre-Ramírez, M.; Ramírez-Santos, J. y Gómez-Eichelmann, M.C. (2005) Expression of the F plasmid *ccd* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli* cells under nutritional stress. *Can. J. Microbiol.* (artículo en prensa).
- Appleyard, R.K. (1954) Segregation of new lysogenic type during growth of the doubly lysogenic strain derived from *E. coli* K-12. *Genet.* 39:440-452.
- Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 36:525-557.
- Bahassi, E.M.; Salmon, M.A.; Van Melderen, L.; Bernard P. y Couturier M. (1995) F plasmid CcdB killer protein: *ccdB* gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain regulatory functions. *Mol. Microbiol.* 15:1031-1037.
- Bailone, A.; Brandenburger, A.; Levine, A.; Pierre, M.; Dutreix, M. y Devoret, R. (1984) Indirect SOS induction is promoted by UV-damaged mini-F and requires the mini-F *lynA* locus. *J. Mol. Biol.* 179:367-390.
- Bernard, P. y Couturier, M. (1992) Cell killing by F plasmid CcdB protein involves in poisoning of DNA-topoisomerase II complex. *J. Mol. Biol.* 226:735-745.
- Bernard, P.; Kezdy, K.E.; Van Melderen, L.; Steyaert, J.; Wyns, L.; Pato, M.L.; Higgins, P.N. y Couturier, M. (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* 234:534-541.
- Bernard, P.; Gabant, P.; Bahassi, E.M. y Couturier, M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* 148:71-74.
- Bex, F.; Karoui, H.; Rokeach, L.; Dreze, P.; Garcia, L. y Couturier, M. (1983) Mini-F encoded proteins: identification of a new 10.5 kilodalton species. *EMBO. J.* 2:1853-61.
- Bohannon, D.E.; Connell, N.; Keener, J.; Tormo, A.; Espinosa-Urgel, M.; Zambrano, M.M. y Kolter, R. (1991) Stationary-phase-inducible "Gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of  $\sigma^{70}$ . *J. Bacteriol.* 173: 4482-4492.
- Cairns, J. y Foster, P.L. (1992) Adaptive reversión of frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genet.* 128: 695-701.

- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: Structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70:369-413.
- Chandler, M. y Galas, D.J. (1983) Cointegrate formation mediated by Tn9: Activity of IS1 is modulated by external DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 170:61-91.
- Chung, C.T.; Suzanne, L.N. y Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2172-2175.
- Couturier, M.; Bahassi, E.M. y Van Melderen, L. (1998) Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends in Microbiol.* 6:269-275.
- Craig, N.L. y Roberts, J.W. (1980) *Escherichia coli* RecA protein-directed cleavage of phage lambda repressor requires polynucleotide. *Nature Lon.* 283:26-30.
- Critchlow, S.E.; O'Dea, M.H.; Howells, A.J.; Couturier, M.; Gellert, M. y Maxwell, A. (1997) The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription. *J. Mol. Biol.* 273:826-839.
- Dao-Thi, M-H.; Charlier, D.; Loris, R.; Maes, D.; Messens, J.; Wyns, L. y Backmann, J. (2002) Intricate interactions within the *ccd* plasmid addiction system. *J. Biol. Chem.* 277:3733-3742.
- Dao-Thi, M-H.; Van Melderen, L.; De Genst, E.; Afif, H.; Buts, L.; Wyns, L. y Loris, R. (2005) Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. *J. Mol. Biol.* 348: 1091-1102.
- de Feyter, R.; Wallace, C. y Lane, D. (1989) Autoregulation of the *ccd* operon in the F plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 218:481-486.
- Foster, P.L. (2004) Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:4846-4852.
- Gerdes, K. (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182:561-572.
- Gerdes, K.; Gulyaev, A.P.; Franch, T.; Pedersen, K. y Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu. Rev. Genet.* 31:1-31.
- Gerdes, K.; Christensen, S.K. y Løbner-Olesen, A. (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Rev. Microbiol.* 3:371-382.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30:465-506.

- Hallet, B.; Vanhooff, V. y Cornet, F. (2004) DNA Site-specific resolution systems. pp 158. In B. E. Funnell and G. J. Phillips. Plasmid Biology. ASM Press. Washington, DC USA.
- Halling, S.M.; Simons, R.W.; Way, J.C.; Walsh, R.B. y Kleckner, N. (1982) DNA sequence organization of IS10-right of Tn10 and comparison with IS10-left. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:2608-2612.
- Hargreaves, D.; Sanatos-Sierra, S.; Giraldo, R.; Sabariegos-Jareno, R.; de la Cueva-Mendez, G; Boelens, R.; Diaz-Orejas, R. y Rafferty, J.B. (2002) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. Structure (Cambridge) 10:1425-1433.
- Hargreaves, D.; Santos-Sierra, S.; Giraldo, R.; Sabariegos-Jareno, R.; de la Cueva-Mendez, G.; Boelens, R.; Diaz-Orejas, R. y Rafferty, J.B. (2002) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. Structure (Camb). 10:1425-33.
- Hawkey, P.M. (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response. J. Antimicrob. Chemth. 51:29-35.
- Heddle, J.G.; Blance, S.J.; Zamble, D.B.; Hollfelder, F.; Miller, D.A.; Wentzell, L.M.; Walsh, C.T. y Maxwell, A. (2001) The antibiotic Microcin B17 is a DNA Gyrase poison: Characterisation of the mode of inhibition. J. Mol. Biol. 307:1223-1234.
- Helinski, D. R. (2004) Introduction to plasmids: a selective view of their history, pp 13-21. In B. E. Funnell and G. J. Phillips. Plasmid Biology. ASM Press. Washington, DC USA.
- Hengge-Aronis, R. (2000) The general stress response in *Escherichia coli*. pp. 161-178. In Storz G and Hengge-Aronis R. Bacterial Stress Responses. ASM Press. Washington, D. C. USA.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:373-395.
- Hishida, T.; Han, Y.W.; Shibata, T.; Kubota, Y.; Ishino, Y.; Iwasaki, H., y Shinagawa, H. (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. Genes Dev. 18:1886-1897.
- Jaffé, A.; Ogura, T. y Higara, S. (1985) Effects of *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. J. Bacteriol. 163: 841-849.

Jensen, R. B.; Grohman, E.; Schwab, H.; Diaz-Orejas, R. y Gerdes, R. (1995) Comparison of *ccd* of F, *parDE* of RP4 and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol. Microbiol.* 17:211-220.

Jiang, Y.; Pogliano, J.; Helinski, D.R. y Konieczny, I. (2002) ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol.* 44:971-979.

Kadama, K.; Hanaoka, F. y Burley, S.K. (2003) Crystal structure of MazE/MazF complex. Molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol. Cell* 11:875-884.

Kampranis, S.C.; Bates, A.D. y Maxwell, A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8414-8419.

Karoui, H.; Bex, F.; Dreze, P. y Couturier, M. (1983) Ham22, a mini-F mutation which is lethal to host cell and promotes recA-dependent induction of lambdoid prophage. *EMBO J.* 2: 1863-1868.

Kobayashi, I. (2004) Genetics addiction: A principle of gene symbiosis in a genome. pp 105-. In B. E. Funnell and G. J. Phillips. *Plasmid Biology*. ASM Press. Washington, DC USA.

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

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227:680-685.

Lane, D.; de Feyter, R.; Kennedy, M.; Phua, S.H. y Semon, D. (1986) D protein of mini-F plasmid acts as a repressor of transcription and a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res.* 14:9713-9728.

Lazar, S.D.; Almirón, M.; Tormo, A. y Kolter, R. (1998) Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* 180:5704-5711.

Lee, S.J. y Gralla, J.D. (2001) Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* 276:30064-30071.

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

Linn, S. (1996) The DNase, topoisomerases and helicases of *Escherichia coli*. Vol.1 pp. 764-772. In Neighardt, F.C. *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press. Washington, D. C. USA.

- Loris, R.; Dao-Thi, M.H.; Bahassi, E.M.; Van Melderen, L.; Poortmans, F.; Liddington, R.; Couturier, M. y Wyns, L. (1999) Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 285:1667-1677.
- Maki, S.; Takiguchi, S.; Miki, T. y Horiuchi, T. (1992) Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid protein. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *J. Biol. Chem.* 267:12244-12251.
- Maki, S.; Takiguchi, S.; Miki, T. y Horiuchi, T. (1996) Partner switching mechanisms is inactivation and rejuvenation of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins LetD (CcdB) y LetA (CcdA). *J.Mol.Biol.* 256:473-482.
- Maurer, J.H.; Meyer, B.J. y Ptashen, M. (1980) Gene regulation at the right operator ( $O_R$ ) of bacteriophage lambda, I.  $O_{R3}$  and autogenous negative control by repressor. *J. Mol. Biol.* 139:147-161.
- Maxwell, A. (1993) The interaction between coumarin and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 9:681-686.
- Miki, T., Orita, T.; Furuno, M. y Horiuchi, T. (1988) Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 201:327-338.
- Miki, T.; Yoshioka, K. y Horiuchi, T. (1984a) Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli* I. The 42.84-43.6 F segment couples cell division of the host bacteria with replication of plasmid. *J. Mol. Biol.* 174:605-25.
- Miki, T.; Park, J.A.; Nagaos, K.; Murayama, N. y Horiuchi, T. (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*: Mutants of DNA Gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition. *J. Mol. Biol.* 225:39-52.
- Miki, T.; Chang, Z.T. y T., Horiuchi (1984b) Control of the cell division by sex factor F in *Escherichia coli* II. Identification of genes for inhibitor protein and trigger protein on the 42.84-43.6 F segment. *J. Mol. Biol.* 174:627-646.
- Miller, E.M. y Nickdoff, J.A (1995) *Escherichia coli* electrotransformation. pp. 105. In Nickdoff, J.A. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 47. Humana Press. Totowa, N.J. USA.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. pp. 43-80.
- O'Connor, M.; Kilbane, J.J. y Malamy, M. H. (1986) Site specific and illegitimate recombination in the *oriV1* region of the F factor. *J. Mol. Biol.* 189:85-102.

- Ogura, T. y Higara, S. (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4784-4788.
- Pandey, D.P. y Gerdes, K. (2005) Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acid Res.* 33:966-976.
- Reece, R.J. y Maxwell, A. (1991) DNA gyrase: Structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:335-75.
- Reyes-Domínguez, Y.; Contreras-Ferrat, G.; Ramírez-Santos, J.; Membrillo-Hernández, 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.
- Ruiz-Echavarría, M.J.; Torrontegui, G.; Gimenez-Gallego, G. y Díaz-Orejas, R. (1995) Structural and functional comparison between the stability systems ParD of plasmid R1 and Ccd of plasmid F. *Mol. Gen. Genet.* 225:355-362.
- Salmon, MA; Van Melderen, L.; Bernard, P. y Couturier M. (1994) The antidote and autoregulatory functions of the F plasmid CcdA protein: a genetic and biochemical survey. *Mol. Gen. Genet.* 244:530-8.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Silhavy, T.J.; Berman, M. y Enquist, L.. (1984) *Experiments with genes fusions.* Cold Spring Harbor. NY: Col Spring Harbor Laboratory.
- Simons, R.W.; Houman, F. y Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 53:85-96.
- Sommer, S.; Bailon, A. y Devoret, R. (1985) SOS induction by thermosensitive replication mutants of mini-F plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 198:456-464.
- Talmadge, K. y Gilbert, W. (1980) Construction of plasmid vectors with unique *Pst*I cloning sites in a signal sequence coding region. *Gene.* 12:235-241.
- Tam, J.E y Kline, B. (1989a) Control of *ccd* operon in plasmid F. *J. Bacteriol.* 171:2353-2360.
- Tam, J.E. y Kline, B.C. (1989b) The F plasmid *ccd* autorepressor is a complex of CcdA and CcdB proteins. *Mol. Gen. Genet.* 219:26-32.
- Travers, A. y G., Muskhelishvili (2005) DNA Supercoiling- A global transcriptional regulator for Enterobacterial growth? *Nature Rev. Microbiol.* 3:157-169.

- Van Melderen, L.; Bernard, P. y Couturier, M. (1994) Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol. Micro.* **11**: 1151-1157.
- Walker, G.C.; Smith, T.B. y Sutton, M.D. (2000) The SOS response to DNA damage. pp. 131-144 In Storz, G. y R., Hengge-Aronis. *Bacterial Stress Responses*. ASM Press. Washington, D. C. USA.
- Weber, H.; Polen, T.; Heuveling, J.; Wendisch, V.F. y Hengge, R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**:1591-1603.
- Weichart, D.; Querfurth, N.; Dreger, M. y Hengge-Aronis, R. (2003) Global role for ClpP-containing proteases in stationary phase adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**:115-125.
- Willmott, C.J.; Critchlow, S.E.; Eperon, I.C. y Maxwell, A. (1994) The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**:351-63.

## APÉNDICE

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 110°C y 15 libras de presión y durante 25 min. Una vez esterilizados los medios se agregaron los antibióticos o el XGal en las concentraciones correspondientes.

**LB o Luria-Bertani** (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, 1ml de NaOH 2.5 N por litro, timina 20 µg/ml, pH 7).

**LB-MOPS** (medio LB con ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico 40 mM).

**Cajas de LB** (medio Luria-Bertani suplementado con agar 20 g por litro).

**L-broth o Luria-broth** (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0.5 g por litro).

**TB-broth** (triptona 8 g, NaCl 5 g por litro, pH 7).

**TB agar** (TB-broth, agar 7 g por litro).

**Amortiguador de dilución de λ** (Tris 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5).

**Cajas de λ** (triptona 8 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, glucosa 2 g, agar 20 g por litro, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, FeCl<sub>3</sub> 0.04 mM).

**TSS 2X** (NaCl 1%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, PEG 8000 20%, DMSO 10%, MgCl<sub>2</sub> 50 mM).

**Tubos de agar LC** (LB 30 ml, NaCl 8 g, agar 7 g por litro, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dextrosa 0.02%)

**Cajas de LC** (cajas de LB, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dextrosa 0.02%)

### Soluciones

Todas las soluciones se filtraron por Millipore HA 0.45 µm.

**TBE 1X** (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM pH 8.3).

**Solución de RNAsa** (RNAsa 100 mg, acetato de sodio 0.1 M, 10 ml EDTA 33 µM pH 5.5, hervir la solución a 80°C por 5 min).

**Solución I** (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, lisozima 4 mg/ml).

**Solución II** (NaOH 0.2 N y SDS 1%).

**Solución III** (acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial 11.5% pH 5.6).



**Amortiguador Z** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM).

**Amortiguador Laemmli de corrida** (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0.01%).

**Amortiguador Laemmli** (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%).

**Amortiguador de transferencia** (glicina 192 mM, Tris base 25 mM, metanol 20%, pH 8.3).

**PBS** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro 7.25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.8 mM, NaCl 126 mM, pH 7.2).

**ΞΓαλ** 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en dimetil formamida.

#### *Antibióticos*

**Ampicilina** 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$

**Kanamicina** 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

**Tetraciclina** 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$

**Estreptomicina** 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$

**Carbenicilina** 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$

1 Expression of the F plasmid *ccd* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli* cells under  
2 nutritional stress

3

4 Marisela Aguirre-Ramírez <sup>a</sup>, Jesús Ramírez-Santos <sup>a</sup>, Laurence Van Melderen <sup>b</sup>, M.  
5 Carmen Gómez-Eichelmann <sup>a,\*</sup>

6 <sup>a</sup> *Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones*  
7 *Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, 04510 México,*  
8 *DF, México*

9 <sup>b</sup> *Laboratoire de Génétique des Procaryotes, Institut de Biologie et de Médecine*  
10 *Moléculaires, Université Libre de Bruxelles, 6041 Gosselies, Belgium*

11

12

13

14 \* Corresponding author

15 M. Carmen Gómez-Eichelmann

16 Departamento de Biología Molecular y Biotecnología

17 Universidad Nacional Autónoma de México

18 P.O. Box 70-228

19 04510 México D.F.

20 MEXICO

21 Tel.: +52 5 622-38-52

22 FAX: +52 5 622-38-55

23 Email: [cargom@servidor.unam.mx](mailto:cargom@servidor.unam.mx)

1 **Abstract:** The *ccd* system of F plasmid encodes for CcdB, a protein toxic to DNA-gyrase.  
2 and for CcdA, its antitoxin. The function attributed to this system is to contribute to  
3 plasmid stability by killing bacteria that lose the plasmid during cell division. However, the  
4 function of *ccd* in resting bacteria is not clear. Results presented show that *ccd* transcription  
5 increased as bacteria entered stationary phase and that the amount of the Ccd proteins was  
6 higher in bacteria under nutritional stress than in growing bacteria. Moreover, an increase  
7 in the frequency of Lac<sup>-</sup> "adaptive" mutations was observed in stationary-phase bacteria  
8 that over-expressed the Ccd proteins.

9  
10 **Keywords:** *ccd* system, nutritional stress, "adaptive" mutation

11  
12  
13 **Résumé:** Le système *ccd* du plasmide F codifie pour CcdB, une protéine toxique pour le  
14 ADN-gyrase, et pour CcdA son antitoxine. La fonction attribuée à ce système est de  
15 contribuer à la stabilité du plasmide en tuant la bactérie qui perd le plasmide pendant la  
16 division cellulaire. Cependant, la fonction de *ccd* dans des bactéries au repos n'est pas  
17 claire. Les résultats que nous présentons montrent que la transcription de *ccd* augmente  
18 lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire et que la quantité de protéines Ccd est  
19 plus importante dans les bactéries sous stress nutritionnel que dans les bactéries en  
20 croissance. De plus, un accroissement dans la fréquence de mutations de Lac<sup>-</sup> "adaptive" a  
21 été observé dans des bactéries en phase stationnaire qui surexpriment les protéines Ccd.

22  
23 **Mots clés:** système *ccd*, stress nutritionnel, mutation "adaptive".

24

## 1 Introduction

2

3 In *Escherichia coli*, postsegregational killing mediated by single-copy plasmids is  
4 generally due to genetic systems which consist of two genes organized in an auto-regulated  
5 operon. A fraction of the bacteria that did not inherit a plasmid during cell division is killed  
6 because the antitoxin molecule is degraded faster than the toxin (Hayes 2003). The F  
7 plasmid encodes the *ccd* system in which the antitoxic protein CcdA binds to protein CcdB  
8 inhibiting its toxic activity (Couturier et al. 1998). This system is located within the  
9 *ccdABresD* operon (Tam and Kline 1989). Upon plasmid loss, CcdA is degraded by the  
10 Lon ATP-dependent protease (Van Melderen et al. 1994) and CcdB binds to GyrA, either  
11 as a free subunit or as part of the enzyme DNA-gyrase (Bahassi et al. 1999; Bernard and  
12 Couturier 1992; Maki et al. 1992). Gyrase, an essential enzyme composed of two GyrA and  
13 two GyrB subunits, introduces negative supercoils into DNA molecules at the expense of  
14 ATP. The GyrA subunit cleaves, binds covalently to the 5' ends of DNA, and religates the  
15 DNA breaks, while the GyrB subunit has the ATPase activity (Reece and Maxwell 1991).  
16 The binding of CcdB to free GyrA subunits decreases the amount of active DNA-gyrase,  
17 causing a decrease in DNA supercoiling (Maki et al. 1992). The binding of CcdB to active  
18 DNA-gyrase traps this enzyme on the DNA and stabilizes the so-called "cleaved complex"  
19 in which the double-strand DNA is broken and covalently linked to the GyrA subunits  
20 (Bahassi et al. 1999). These DNA lesions lead to DNA and RNA polymerase blocking  
21 (Critchlow et al. 1997; Wentzell and Maxwell 2000), SOS induction, and, eventually, to  
22 cell death (Couturier et al. 1998).

23 The transcriptional level of genes *ccdAB* is auto-regulated by binding of a CcdA-CcdB  
24 complex to the operator-promoter region of the operon. CcdA binds to DNA, whereas the

1 presence of CcdB enhances CcdA affinity and specificity. This complex has multiple DNA-  
2 binding sites and spirals around the 120-pb promoter-operator region (Tam and Kline 1989;  
3 Afif et al. 2001; Dao-Thi et al. 2002). It has been proposed that the CcdA/CcdB ratio  
4 regulates the repression state of these genes. When the level of CcdA is higher or equal to  
5 that of CcdB, repression results; in contrast, de-repression occurs when CcdB is in excess  
6 of CcdA (Afif et al. 2001). The CcdB toxic effect could take place in F-containing cells, not  
7 only as a consequence of plasmid loss, but also upon a significant decrease in the  
8 expression of Ccd proteins. For example, a decrease in transcription or translation results in  
9 cell death due to the toxic effect of protein MazF, the toxic component of the chromosomal  
10 toxin-antitoxin system *mazEF* (Sat et al. 2001).

11 The purpose of this work was to study the expression of the *ccd* system under two  
12 stress conditions that decrease global transcription and translation: 1) stationary phase in  
13 rich liquid medium, 2) exposure of Lac<sup>-</sup> stationary-phase cells grown in liquid minimal  
14 medium containing glycerol to agar plates containing lactose as sole carbon source. The last  
15 condition is similar to that of a well-characterized assay used to study stationary-phase or  
16 “adaptive” mutations (Cairns and Foster 1991). These mutations are generated in non-  
17 actively dividing bacterial populations subjected to non-lethal selective pressure. The  
18 mutagenic processes that occur in these cells are different from those observed in growing  
19 cells. In *E. coli*, these mutations require the RecA-RecBCD pathway for DNA double-  
20 strand break repair via homologous recombination, the error-prone DNA polymerase pol IV  
21 encoded by *dinB*, and expression of some conjugational functions (Foster 2004; Rosenberg  
22 and Hastings 2004). The other SOS-induced error-prone polymerase pol V, encoded by  
23 *umuDC*, is not involved in the generation of these mutations (McKenzie et al. 1988). As  
24 mentioned above, CcdB-gyrase-DNA complexes produce DNA lesions that can induce the

1 SOS response. This bacterial response is a global response to DNA damage in which there  
2 is an increase in the expression of the *recA*, *recBCD* and *dinB* genes. among other genes.  
3 and as a consequence an increase in DNA repair and mutagenesis (Walker 1996). In this  
4 context. the effect of the *ccd* system on the generation of "adaptive" mutations was also  
5 evaluated.

6

## 7 **Materials and methods**

8

### 9 **Bacterial strains and plasmids**

10 The bacterial strains used in this study were MC4100  $\Delta(\textit{argF-lac})205 \textit{araD139}$   
11  $\textit{rpsL150 thiA1 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR}$  (Casadaban 1976), MC4100  $\textit{rpoS::Tn10}$ ,  
12 FC40  $\textit{ara} \Delta(\textit{lac proB})_{XIII} \textit{thi Rif}^R$  that bears an F' plasmid with the  $\Omega(\textit{lacI33-lacZ})$  fusion  
13 that generated a +1 frameshift mutation. and strain FC29, same as FC40 but  $\textit{Rif}^S$  and  
14 bearing the F' plasmid  $\Delta\Omega(\textit{lacI33-lacZ})$  (Cairns and Foster 1991). The pOX38-Km plasmid  
15 is a single-copy F-derivative plasmid containing the *ccd* system (Guyer et al. 1981). Other  
16 plasmids used were pKT279, a tetracycline-resistant high-copy pBR322-derivative vector,  
17 and pULB2707, a pKT279-derivative plasmid containing the *ccdAB* genes (Bahassi et al.  
18 1995).

19

### 20 **Media and growth conditions**

21 The rich medium used was Luria-Bertani (LB) (Miller 1992) with or without 40 mM  
22 MOPS (morpholinopropanesulfonic acid; pH 7.4). The minimal medium used was M9  
23 (Miller 1992) containing 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , thiamine, 0.001% gelatin, 0.1 or 0.01% glycerol or

1 0.2% lactose. The medium was supplemented with  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  tetracycline or kanamycin  
2 when required. Cultures were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with shaking (180 rpm). Optical density  
3 (OD) at 600 nm was used to monitor cell growth and identify the onset of the stationary  
4 phase. The stationary phase was defined as the point where the OD 600 nm units level off.

#### 6 **“Adaptive” mutation assays**

7 The “adaptive” mutation assays were performed as described (Cairns and Foster 1991). In  
8 brief, cells were grown to saturation at  $37^{\circ}\text{C}$  in 3 ml M9 minimal medium containing 0.1%  
9 glycerol. The culture was diluted to  $10^{-5}$  in M9 minimal medium containing 0.01%  
10 glycerol. One ml aliquots of this dilution were distributed in tubes and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$   
11 with shaking to saturation. Cultures to saturation in glycerol 0.1% have approximately  $10^9$   
12 cells/ml, while in glycerol 0.01% have approximately  $10^8$  cells/ml. Tube cultures in 0.01%  
13 glycerol were washed, re-suspended in 100  $\mu\text{l}$  of M9 medium, mixed with approximately  
14  $10^9$  FC29 scavenger cells and 2.5 ml of M9 soft agar with 0.2% lactose and poured on M9  
15 plates containing 0.2% lactose. The scavenger FC29 cells, which cannot revert to  $\text{Lac}^-$ ,  
16 were added to ensure fast exhaustion of traces of other nutrients present in the plates. The  
17 number of FC40 cells per plate was approximately  $1-3 \times 10^8$ . Plates were incubated at  
18  $37^{\circ}\text{C}$ , the number of  $\text{Lac}^-$  revertant colonies were counted each day and the  $\text{Rif}^{\text{R}}$  phenotype  
19 corresponding to the FC40 strain was determined in these revertants.

20

#### 21 **Construction of a strain carrying the chromosomal single-copy transcriptional fusion**

#### 22 **$\lambda\Phi(\text{ccd-lacZ})$**

1 The chromosomal single-copy transcriptional-fusion  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$  was constructed as  
2 described elsewhere (Simons et al. 1987). The regulatory region of the *ccdABresD* operon  
3 was PCR-amplified using primers 5'-AGTGAATTCAGCAGCGTGTCC (forward) and 5'-  
4 AGACCCCCGGGCTTCATTCTGC (reverse). the template DNA was the pOX38-Km  
5 plasmid. Sites for *EcoRI* and *SmaI* (underlined bases) were introduced into the forward and  
6 reverse primers, respectively. The 1037 bp amplified fragment comprised the complete  
7 promoter-operator region of the operon including 109 bp of the *ccdA* coding region. The  
8 fragment was digested with *EcoRI* and *SmaI*, and cloned into the pRS415 vector digested  
9 with the same enzymes. The transcriptional fusion  $\Phi(ccd-lacZ)$  was then transferred from  
10 the plasmid to the  $\lambda$ RS45 phage vector by *in vivo* recombination. Recombinant phages were  
11 used to infect the MC4100 strain and single lysogens carrying the gene fusion were  
12 isolated. The resulting strain MC4110  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$  was verified by PCR amplification and  
13 DNA sequencing.

14

#### 15 **Construction of plasmid F' $\Omega(lacI33-lacZ) \Delta(ccdABresD)1333::Cm$**

16 The *ccdABresD* deletion was first constructed in the pOX38-Km plasmid and then  
17 transferred by P1 transduction into the F'  $\Omega(lacI33-lacZ)$  plasmid in the FC40 strain. The  
18 pOX38-Km  $\Delta(ccdABresD)1333::Cm$  plasmid, in which the *ccdABresD* operon was  
19 replaced by the chloramphenicol-resistant ( $Cm^R$ ) cassette *cat*, was constructed as described  
20 (Datsenko and Wanner 2000; Lee et al. 2001; Yu et al. 2000). The pOX38-Km plasmid was  
21 transferred by conjugation to an MC4100-derivative strain carrying a defective  $\lambda$  prophage  
22 harboring the recombination genes *exo*, *bet*, and *gam* under the control of a temperature-  
23 sensitive  $\lambda$  CI-repressor (Yu et al. 2000). The primers used to construct the deletion were 5'



1 *CTGATATGTATACCCGAAGTATGTCAAAAAGAGGTGTGCTGTGTAGGCTGGAGCTG*  
2 *CTTC* (forward) and 5' *CCACTCAGTTCCACATTTCCATATAAAGGCCAAGGCATT*  
3 *TATTC* *CATATGAATATCCTCCTTAG* (reverse). Nucleotides in italics are homologous to  
4 the targeted sequences in the pOX38-Km plasmid, while those underlined are homologous  
5 to the *cat* cassette present in the pKD3 plasmid (Datsenko and Wanner 2000). Standard  
6 PCR conditions were used to amplify DNA fragments using pKD3 as template. Competent  
7 MC4110/pOX38-Km cells were directly electroporated with these fragments, and Cm<sup>R</sup>  
8 recombinants were selected. To verify the structure of the mutant, four PCR reactions were  
9 performed using oligonucleotides homologous to *cat* and to genes *repC* and *repE*, which  
10 flank the *ccdABresD* operon.

11

## 12 **$\beta$ -galactosidase assays**

13  $\beta$ -galactosidase activity was assayed in SDS-permeabilized cells using o-nitrophenyl- $\beta$ -  
14 D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. Enzyme units were calculated from readings at  
15 OD<sub>420</sub>, OD<sub>550</sub>, and OD<sub>600</sub> and expressed as Miller units as described elsewhere (Miller  
16 1992).

17

## 18 **CcdA and CcdB determination by Western blot analyses**

19 Protein samples used to identify these proteins were prepared from cells grown in LB  
20 or LB-MOPS or from stationary-phase bacteria grown in M9 medium with glycerol and  
21 then plated on M9 medium with lactose. Protein extracts of these bacteria were prepared  
22 from bacteria scraped out of the plates. Strain MC4100/pOX38-Km was used in  
23 experiments with bacteria grown in liquid LB or LB-MOPS medium, while strains FC29 or

1 FC29 containing the multi-copy plasmid pULB2707 were used in experiments with  
2 bacteria plated on M9 medium with lactose. These strains are not able to generate Lac<sup>-</sup>  
3 revertants that can interfere with the determination of the amount of the Ccd proteins.  
4 Proteins were separated by SDS-PAGE (Laemmli 1970) and transferred to a nitrocellulose  
5 filter. The amount of protein loaded on the gels was verified by cutting and staining the  
6 upper part of the gel with Coomassie blue. The lower section of the gel was electroblotted.  
7 The Ccd proteins were identified using polyclonal anti-Ccd antibodies. Horseradish  
8 peroxidase-conjugated anti-rabbit IgGAM was used as secondary antibody (Zymmed  
9 Laboratories, Inc. San Francisco, CA). Detection of the Ccd proteins was performed with  
10 the ECL Western blotting system (Amersham Biosciences, UK). In some of the  
11 experiments, Ccd proteins were immunoprecipitated prior to the Western blot.

12

13

## 14 **Results**

15

### 16 **Transcriptional level of the *ccd* system along the growth curve**

17 The *ccd* transcriptional level was studied in exponentially-growing and early  
18 stationary-phase bacteria using the MC4100 strain bearing the chromosomal transcriptional  
19 fusion  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$ . Experiments were performed with bacteria grown in LB or in LB-  
20 MOPS medium. The pH of cultures in LB-MOPS remained near neutrality (7.0-7.3). In  
21 contrast, the pH of cultures in LB increased to approximately 8.4-8.6 after 12 h of cell  
22 growth. Stationary-phase cultures in LB became alkaline probably due to cell release of  
23 excess amine-containing compounds (Lazar et al. 1998). Stationary-phase bacteria in LB-

1 MOPS are under nutritional stress, whereas those in LB are under both. nutritional and  
2 alkaline stress (Lazar et al. 1998). Viability of MC4100 cells in LB or LB-MOPS was  
3 similar under the experimental conditions used.

4 The transcriptional activity of the *ccd* promoter in strain MC4100  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$  in the  
5 absence of the Ccd proteins and therefore of autorepression, increased along the growth  
6 curve and when bacteria entered stationary phase, and presented a moderate decrease in  
7 early stationary-phase bacteria. The maximum increase reached approximately eight times  
8 the level observed in mid-log phase cells (Fig. 1). The presence of plasmid pOX38-Km and  
9 thus of the Ccd proteins in this strain, induced a decrease in the *ccd* transcriptional level  
10 mainly when bacteria enter stationary phase. In mid-log bacteria, with or without the  
11 plasmid, this level was similar. The  $\beta$ -galactosidase activity in MC4110  $\lambda\Phi(ccd-$   
12 *lacZ)/pOX38-Km  $\Delta(ccdABresD)1333::Cm(ccd^+)$  cells growing in LB or LB-MOPS was*  
13 higher than that of MC4110  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)/pOX38-Km(ccd^+)$  cells. After 9 h of growth,  
14 this activity was two-fold higher in the *ccd* than in the *ccd^+* cells (data not shown).

15 The changes observed in the *ccd* transcriptional level, in the absence or presence of  
16 Ccd proteins, showed that this level is higher in nutritionally stressed than in actively  
17 growing bacteria. The growth phase-dependent transcriptional pattern was similar in  
18 bacteria under nutritional (LB-MOPS) or nutritional plus alkaline stress (LB) (Fig. 1).  
19 Although no other genes besides *ccdAB* have being described to participate in *ccd*  
20 transcription (Tam and Kline 1989; Afif et al. 2001; Dao-Thi et al. 2002), results obtained  
21 with strain MC4110  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)/pOX38-Km ccd^+$  suggest the presence of a putative  
22 positive regulator of *ccd* transcription encoded by plasmid pOX38-Km. This regulator  
23 seems to be revealed in the absence of the CcdA-CcdB repressor complex.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

**Transcriptional level of the *ccd* system in an *rpoS* mutant strain along the growth curve**

Results presented above and the analyses of the -10 region of *ccd* suggest a possible role of  $\sigma^S$  in *ccd* transcription. This transcription factor, encoded by *rpoS*, increases as bacteria enter the stationary phase and regulates the expression of more than 100 genes needed to survive the nutritional stress (Hengge-Aronis 2000; Weber et al. 2005). The proposed -10 region of the *ccd*  $\sigma^{70}$  promoter, ATATACT, could also be recognized by the  $\sigma^S$  factor. The consensus sequence of the -10 region of  $\sigma^S$  is CTACACT. Although the first C is highly conserved, there are at least three *bona fide*  $\sigma^S$ -dependent promoters with an A in that position (Lee and Gralla 2001).

To explore this possibility,  $\beta$ -galactosidase activity was determined in exponentially-growing and early stationary-phase MC4100 and MC4100 *rpoS* ::Tn10 bacteria carrying the  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$  transcriptional fusion. Bacteria were grown in LB-MOPS to minimize the number of dead cells present in the *rpoS* stationary-phase cultures (Lazar et al. 1998). The number of cells/ml present in *wt* or *rpoS* early stationary-phase cultures, was similar. The transcriptional level of the *ccd* system in the absence of the Ccd proteins was lower in the *rpoS*::Tn10 than in the wild-type strain (Fig. 2). The presence of plasmid pOX38-Km in the wild-type strain induced a decrease in the level of transcription, while the presence of this plasmid in the *rpoS* mutant did not significantly affect this level (Fig. 2). These results suggest some role of  $\sigma^S$  in the regulation of the *ccd* system transcription in the absence of the Ccd proteins. This transcriptional factor could also access the *ccd* promoter under conditions of low cellular concentration of these proteins.

1  
2 **Amount of proteins CcdA and CcdB in bacteria during a prolonged stationary phase,**  
3 **and in stationary-phase bacteria exposed to a non-metabolized carbon source**

4 The amount of CcdA and CcdB proteins was determined by Western blot analyses. As  
5 shown in Figure 3A, CcdA production by the MC4100/pOX38-Km strain grown in LB or  
6 LB-MOPS increased when bacteria entered the stationary phase, decreased after 3 days of  
7 culture, and then rose again at day 5. On the other hand, CcdB protein in LB-grown  
8 bacteria showed a moderate increase when they enter the stationary phase, and then  
9 remained almost constant throughout the experiment. The amount of this protein in LB-  
10 MOPS grown bacteria increased as bacteria entered the stationary phase and continued  
11 increasing after 3 and 5 days in this phase. The amount of Ccd proteins along the growth  
12 curve in the MC4100 *rpoS* ::Tn10/pOX38-Km mutant, was similar to that of the wild-type  
13 strain (data not shown).

14 The amount of Ccd proteins was also determined in bacteria under the nutritional  
15 stress condition used in the assay to study “adaptive” mutations (Materials and methods).  
16 These determinations were performed in the FC29 strain with or without the multi-copy  
17 plasmid pULB2707. Protein extracts of strain FC29/pULB2707 (*ccdAB* in 10-15  
18 copies/cell) were diluted 1:10 before being separated by SDS-PAGE. As shown in Figure  
19 3B, CcdA and CcdB in strain FC29 were more abundant in bacteria 3 to 5 days after being  
20 plated than in mid-log bacteria or bacteria analyzed immediately after being plated. The  
21 amount of the CcdA protein in the 1:10 diluted extracts of strain FC29/pULB2707 was  
22 similar in growing and nutritionally stressed bacteria, while CcdB displayed a moderate  
23 reproducible decrease at day 5. Regarding the extract dilutions, the amount of Ccd proteins  
24 in this latter strain was more than 10 times that in strain FC29, which carries the *ccdAB*

1 genes in a single-copy plasmid. In summary, the amount of Ccd proteins in nutritionally  
2 stressed bacteria, although displayed variations, tended to be higher in these bacteria than in  
3 actively growing bacteria. We have no explanation for the reproducible decrease in the  
4 amount of protein CcdA in cells at day 3 of stationary phase in liquid medium or for the  
5 increase at day 5 (Fig. 3A). Is there some degradation of protein CcdA at day 3 and  
6 therefore a decrease in the repressor CcdA-CcdB complex of the *ccd* system and de-  
7 repression of transcription of the system at day 5? It is worth mentioning that the variations  
8 were observed in cells after a prolonged stress period. There is no information about the  
9 turn-over of the Ccd proteins, fine-tune equilibrium among the CcdA-CcdB, CcdA-CcdB-  
10 DNA, CcdB-GyrA, and CcdB-gyrase-DNA complexes or autoregulation of the *ccdAB*  
11 operon in stressed cells.

12

13 **Frequency of “adaptive” mutation in strains FC40, FC40 *ccd*<sup>-</sup> and FC40 *ccd*<sup>-</sup>**  
14 **carrying the *ccdAB* genes in a multi-copy plasmid pULB2707**

15 To explore if the relatively high concentration of Ccd proteins present in the  
16 nutritionally stressed bacteria could lead, under this particular condition, to the formation of  
17 some CcdB-gyrase-DNA complexes and thus to DNA double-strand breaks, the “adaptive”  
18 mutation assay (Cairns and Foster 1991) was used. As already mentioned, this class of  
19 mutations observed in non-actively growing bacteria under non-lethal selection, is mainly  
20 generated by recombination repair of DNA double-strand breaks (Foster 2004; Rosenberg  
21 and Hastings 2004).

22 Results obtained showed that the number of Lac<sup>+</sup> revertants in non-actively dividing  
23 Lac<sup>-</sup> bacteria, either *ccd*<sup>+</sup> or *ccd*<sup>-</sup>, was similar. However, when pULB2707, a Tc<sup>R</sup> multi-  
24 copy plasmid carrying the *ccdAB* genes, was introduced into strain FC40 F'  $\Omega(lacI33-lacZ)$

1  $\Delta(ccdABresD)1333::Cm$ . a reproducible increase in the accumulation of Lac<sup>-</sup> revertants  
2 was observed (Fig. 4). After 5 days of incubation, the total number of Lac<sup>-</sup> revertants of the  
3 strain overproducing the Ccd proteins was approximately 1.7 higher than that of the *ccd*<sup>-</sup>  
4 strain. All Lac<sup>-</sup> revertants were Rif<sup>R</sup>, while revertants derived from the FC40 strain bearing  
5 plasmid pULB2707 were also Tc<sup>R</sup>. These results show that there is a moderate mutagenic  
6 effect of the *ccd* system when over-expressed in bacteria under nutritional stress.

7

## 8 **Discussion**

9       Based on a database analysis of prokaryotic toxin-antitoxin systems as well as  
10 experimental evidences, it has been proposed that these systems have functions unrelated to  
11 plasmid maintenance (Couturier et al. 1998; Gerdes 2000; Pandey and Gerdes 2005). One  
12 could be to favor a bacteriostatic state, by contributing to decrease the synthesis of  
13 macromolecules during nutritional stress (Gerdes 2000). Results presented here suggest that  
14 *ccd* could have this function, since the activity of the *ccd* promoter increases along the  
15 growth curve and when bacteria enter stationary phase and the amount of Ccd proteins is  
16 higher in bacteria under prolonged nutritional stress than in growing bacteria. The CcdB  
17 interaction with GyrA, for example, could contribute to reduce the replication rate in  
18 stressed bacteria. It should be mentioned that the amount of DNA-gyrase, an enzyme  
19 essential for DNA replication and a target of CcdB, does not decrease in stationary-phase  
20 bacteria (Reyes-Domínguez et al. 2003). Another function proposed for *ccd* is to increase  
21 the genetic variability of the fraction of cells that does not inherit the F plasmid and  
22 survives (Couturier et al. 1998). Data presented here suggest that *ccd* could also be  
23 involved in generating genetic variability in non-actively dividing bacteria that still contain

1 the F plasmid. We propose that a small fraction of the “adaptive” mutations observed in the  
2 FC40 strain that overproduce Ccd proteins, could correspond to mutants induced by the  
3 repair of DNA breaks generated by the CcdB-poisoned DNA-gyrase. Although the  
4 mutagenic effect of *ccd* in nutritionally stressed bacteria was only revealed under  
5 conditions of overexpression, the effect could be evident in populations of F<sup>-</sup> bacteria  
6 repeatedly subjected to prolonged starvation periods. Further experiments are required to  
7 clarify the role of the *ccd* system in bacteria under different nutritional stress conditions and  
8 the participation of CcdB-gyrase-DNA complexes in the generation of genetic variability in  
9 non-actively dividing bacteria.

10

#### 11 **Acknowledgements**

12

13 We thank M. Paéz for preparing bacterial media and I. Pérez-Monfort for advice on  
14 manuscript style. We also thank P. Foster for providing strains FC40 and FC29, and J.  
15 Membrillo-Hernández and R. García for advice in the construction of the transcriptional  
16 fusion and the *ccdABresD* deletion. This work was supported by a grant to M.C.G.-E. from  
17 the CONACyT (36984-N).

18

#### 19 **References**

20 Afif, H., Allali, N., Couturier, M., and Van Melderen, L. 2001. The ratio between CcdA  
21 and CcdB modulates the transcriptional repression of the *ccd* poison-antidote system.  
22 Mol. Microbiol. **41**: 73-82.

23 Bahassi, E.M., O’Dea, M.H., Allali, N., Messens, J., Gellert, M., and Couturier, M. 1999.  
24 Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of GyrA, poisoning of the



1 gyrase/DNA complex. and the antidote action of CcdA. J. Biol. Chem. 274: 10936-  
2 10944.

3 Bahassi, E.M., Salmon, M.A., Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. 1995. F  
4 plasmid CcdB killer protein: *ccdB* gene mutants coding for non-cytotoxic proteins  
5 which retain their regulatory functions. Mol. Microbiol. 15: 1031-1037.

6 Bernard, P., and Couturier, M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves  
7 poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J. Mol. Biol. 226: 735-745.

8 Cairns, J., and Foster, P.L. 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in  
9 *Escherichia coli*. Genetics 128: 695-701.

10 Casadaban, M. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in  
11 *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. J. Mol. Biol. 104: 541-555.

12 Couturier, M., Bahassi, E.M., and Van Melderen, L. 1998. Bacterial death by DNA gyrase  
13 poisoning. Trends Microbiol. 6: 269-275.

14 Critchlow, S.E., O'Dea, M.H., Howells, A.J., Couturier, M., Gellert, M., and Maxwell, A.  
15 1997. The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with gyrase: Induction of  
16 DNA cleavage and blocking of transcription. J. Mol. Biol. 273: 826-839.

17 Dao-Thi, M.H., Charlier, D., Loris, R., Maes, D., Messens, J., Wyns, L., and Backmann, J.  
18 2002. Intricate interactions within the *ccd* plasmid addition system. J. Biol. Chem.  
19 277: 3733-3742.

20 Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in  
21 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 6640-  
22 6645.

23 Foster, P.L. 2004. Adaptive mutation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186: 4846-4852.

- 1 Gerdes, K. 2000. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules  
2 during nutritional stress. *J. Bacteriol.* **182**: 561-572.
- 3 Guyer, M., Reed, R.R., Steitz, J.A., and Low, K.B. 1981. Identification of a sex-factor-  
4 affinity site in *E. coli* as  $\gamma\delta$ . *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**: 135-140.
- 5 Hayes, F. 2003. Toxin-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell  
6 cycle arrest. *Science* **301**: 1496-1499.
- 7 Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. *In* Bacterial stress  
8 responses. *Edited by* G. Storz and R. Hengge-Aronis. American Society for  
9 Microbiology, Washington, D.C. pp. 161-178.
- 10 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of  
11 bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 12 Lazar, S.D., Almirón, M., Tormo, A., and Kolter, R. 1998. Role of the *Escherichia coli*  
13 SurA protein in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **180**: 5704-5711.
- 14 Lee, S.J., and Gralla J.D. 2001. Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via  
15 -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**: 30064-30071.
- 16 Lee, E-C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L.,  
17 Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. 2001. A highly efficient *Escherichia coli*-based  
18 chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning  
19 of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.
- 20 Maki, S., Takiguchi, S., Miki, T., and Horiuchi, T. 1992. Modulation of DNA supercoiling  
21 activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. *J. Biol. Chem.* **267**:  
22 12244-12251.

- 1 McKenzie, G.J., Lee, P.L., Lombardo, M.-J., Hastings, P.J., and Rosenberg, S. 2001. SOS  
2 mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive  
3 amplification. *Mol. Cell* **7**: 571-579.
- 4 Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook  
5 for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New  
6 York.
- 7 Pandey, D.P., and Gerdes, K. 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living  
8 but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acid Res.* **33**: 966-976.
- 9 Reece, R.J., and Maxwell, A. 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev.*  
10 *Biochem. Mol. Biol.* **26**: 335-375.
- 11 Reyes-Dominguez, Y., Contreras-Ferrat, G., Ramírez-Santos, J., Membrillo-Hernández, J.,  
12 and Gómez-Eichelmann, M.C. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in  
13 *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* **185**: 1097-1100.
- 14 Rosenberg, S.M., and Hastings, P.J. 2004. Adaptive point mutation and adaptive  
15 amplification pathways in the *Escherichia coli* Lac system: Stress responses producing  
16 genetic change. *J. Bacteriol.* **186**: 4838-4843.
- 17 Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. 2001.  
18 Programmed cell death in *Escherichia coli*: Some antibiotics can trigger *mazEF*  
19 lethality. *J. Bacteriol.* **183**: 2041-2045.
- 20 Simons, R.W., Houtman, F., and Kleckner, N. 1987. Improved single and multicopy *lac*-  
21 based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
- 22 Tam, J.E., and Kline, B.C. 1989. Control of the *ccd* operon in plasmid F. *J. Bacteriol.* **171**:  
23 2353-2360.

1 Van Melderen, L., Bernard, P., and Couturier, M. 1994. Lon-dependent proteolysis of  
2 CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregants bacteria.  
3 Mol. Microbiol. 11: 1151-1157.

4 Walker, G.C. 1996. The SOS response of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and  
5 *Salmonella: cellular and molecular biology*, Edited by F. Neidhardt, et al. American  
6 Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 1400-1416.

7 Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., and Hengge, R. 2005. Genome-wide  
8 analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent  
9 genes, promoters, and sigma factor selectivity. J. Bacteriol. 187: 1591-1603.

10 Wentzell, L.M., and Maxwell, A. 2000. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs  
11 on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex. J. Mol Biol.  
12 304: 779-791.

13 Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Court, D.L. 2000. An  
14 efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. Proc.  
15 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 5978-5983.

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

1

2

3

4

5

6

## 7 **Figure legends**

8

9 Fig. 1. Transcriptional level of the *ccd* system along the growth curve. Strains were grown  
10 in (A) LB or (B) LB-MOPS. Strain MC4100  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)/pOX38-Km$  was grown in the  
11 presence of  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin. Open symbols, cell growth (OD 600 nm); solid  
12 symbols, Miller relative units in which 1 unit represents the Miller units of mid-log cells  
13 (450-550 Miller units). Squares: MC4100  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$ ; circles: MC4100  $\lambda\Phi(ccd-$   
14  $lacZ)/pOX38-Km$  (single-copy of *ccd*). Error bars represent standard deviation from the  
15 averages of at least three independent experiments.

16

17 Figure 2. Transcriptional level of the *ccd* system along the growth curve in a *rpoS* mutant.

18 Strains MC4100  $\lambda\Phi(ccd-lacZ)$  and MC4100  $\lambda\Phi(ccd-lacZ) rpoS::TnJ0$  were grown in LB-

19 MOPS. Strains bearing plasmid pOX38-Km were grown in the presence of  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$

20 kanamycin. Open symbols, cell growth (OD 550 nm); solid symbols, Miller relative units in

21 which 1 unit represents the Miller units of mid-log cells (450-550 Miller units). Squares:

22 wild-type strain; circles: wild-type strain/pOX38-Km (single-copy of *ccd*); triangles: *rpoS*

1 strain: diamonds: *rpoS* strain/pOX38-Km (single-copy of *ccd*). Error bars represent  
2 standard deviation from the averages of at least three independent experiments.

3

4 Fig. 3. Amount of the CcdA and CcdB proteins in bacteria under prolonged nutritional  
5 stress. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to membranes for  
6 Western blot analyses (Material and methods). (A) Strain MC4100/pOX38-Km grown in  
7 LB or LB-MOPS in the presence of 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamycin. 0.1 and 0.4 days correspond to  
8 mid-log and early stationary-phase bacteria, respectively. (B) Strains FC29 and  
9 FC29/pULB2707 grown to saturation in M9 medium containing glycerol and then plated on  
10 M9 plates containing lactose. Strain FC29/pULB2707 was grown in the presence of 25  $\mu\text{g}$   
11  $\text{ml}^{-1}$  tetracycline. Cellular extracts corresponding to strain FC29/pULB2707 were diluted  
12 1:10 before PAGE. E, mid-log bacteria; 0 days, stationary-phase bacteria before been  
13 plated on lactose plates. Similar results were obtained in three independent experiments. A  
14 representative experiment is shown.

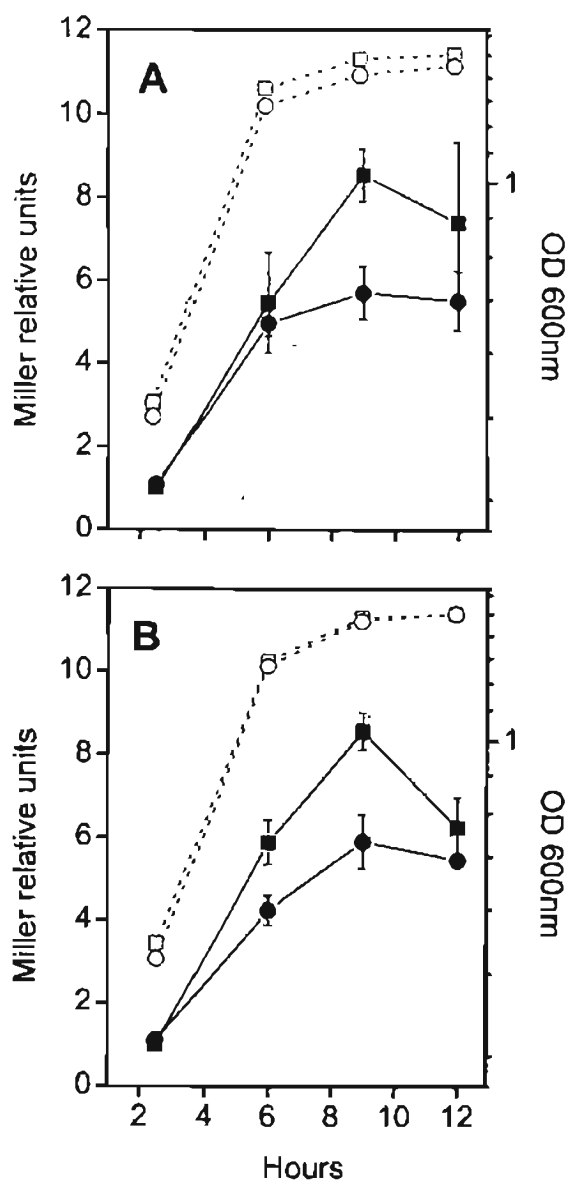
15

16 Fig. 4. “Adaptive” mutation in bacteria carrying none, one or multiple copies of the *ccd*  
17 system. (●) FC40 *ccd*<sup>+</sup> (single-copy of *ccd*); (▼) FC40 *ccd*<sup>-</sup>; (▽) FC40 *ccd*<sup>-</sup>/pKT279 and  
18 (○) FC40 *ccd*<sup>-</sup>/pULB2707 (multiple copies of *ccd*). Bacteria were grown to saturation in  
19 M9 medium with glycerol, mixed with approximately 10<sup>9</sup> scavenger cells and plated on M9  
20 medium lactose (Materials and methods). Lac<sup>-</sup> colonies were counted each day. Results  
21 taken from four separated experiments, each with 6 to 8 independent cultures. Error bars,  
22 represent the S.E.M.

23

1

2



3

4

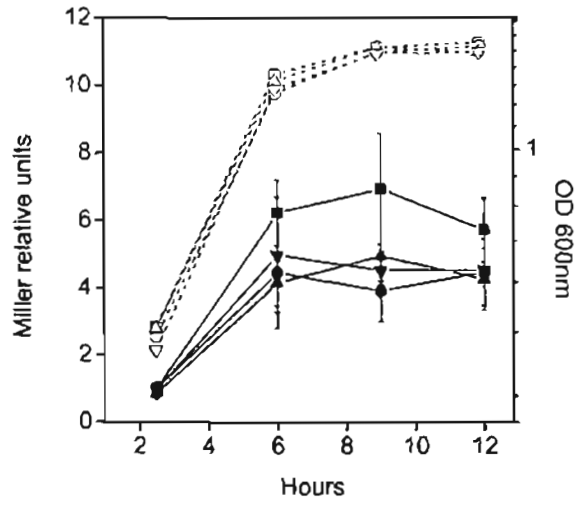
5

6

7

Figure 1

1  
2  
3

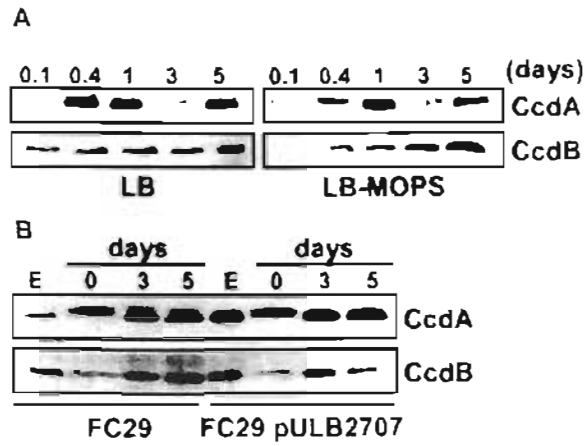


4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

Figure 2



1  
2  
3

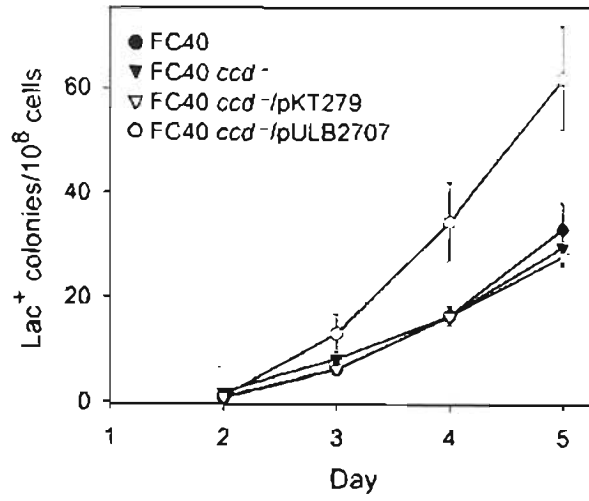


4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Figure 3

1  
2  
3



4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

Fig. 4