



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**El papel de la proteína FIS en los cambios
topológicos del DNA de *Escherichia coli* en estrés
nutrimental y de pH**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

LILIANA REYNA GARCÍA COVARRUBIAS



Directora de Tesis:

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann

2006



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Gómez Eichelmann, por sus comentarios, por las enseñanzas, por compartir su gran experiencia y conocimiento, pero sobre todo por la gran oportunidad de trabajar bajo su dirección. Sinceramente, muchas gracias.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos, por las enseñanzas, críticas y comentarios que fueron de suma importancia para la realización de esta Tesis.

Al Sr. Miguel Páez por todo el apoyo que nos brinda en el laboratorio y más.

A la Dra. María Elena Flores Carrasco

Al Dr. Víctor Manuel Valdés López

Al M. en C. José Luis Silencio Barrita

A todos ellos por la revisión de esta tesis, sus correcciones y valiosos comentarios.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A Dios por la gran oportunidad y maravillosa experiencia que es la vida, y porque sin el nada de esto existiría.

A mis Padres Antonio y Lidia con amor, respeto y admiración porque su apoyo y confianza, y cada uno de los consejos brindados a lo largo de mi vida la han enriquecido, gracias por todo lo brindado. Quiero que sepan que este logro está dedicado, inspirado y enriquecido por ustedes, los amo.

A mi hermano Antonio, porque eres y siempre serás una parte muy importante de mi vida, te quiero y te agradezco por todas las experiencias compartidas a lo largo de este sendero llamado vida que nos conduce a valorar lo verdaderamente importante.

Al M. en I. Edén Bojórquez Mora, la palabra apoyo tomó un nuevo significado al haberte conocido, gracias por tu gran talento, por las hermosas experiencias compartidas, por tu vida y tu gran energía, por tu apoyo incondicional, pero sobre todo gracias por ser una gran persona y ser parte tan importante de todo esto. ¡Te Quiero y te admiro siempre!

A mis amigos que siempre han estado ahí hasta en los momentos difíciles, por los momentos maravillosos que he pasado y espero pasar en su compañía. Los que tengo desde la infancia, y adolescencia, los que conocí durante la carrera, ahora en el trabajo y en algún otro lugar. Tengo la fortuna de que son muchos y ustedes saben quienes son.

A Sandy por todos estos años de hermosa amistad y porque siempre has estado ahí.

A Elsa Gutiérrez, amiga, por tus consejos, las pláticas y las experiencias que se pueden resumir en una gran amistad durante todo este tiempo.

¡Gracias Amigas! la gran experiencia de la Biología no hubiera sido igual sin ustedes

Alle MSS Giuli, Lori, Rose, Alessia, Claudia, Filo, e a tutte per condividere la vostra vita e amicizia, e anche per la gran esperienza de conoscervi perche in ogni momento e in ogni pensiero mi avete fatto scoprire cose meravigliose, come il bello di condividere la vita insieme, e insieme a nostro compagno di viaggio. Grazie per avermi accompagnato in ogni paso ed essere stati sempre presenti. Vi voglio davvero bene!!

Al M. en C. Alberto Guevara Flores, que gran oportunidad conocerte, gracias por permitirme aprender a tu lado, tanto académicamente como en aspectos que van más allá de este terreno. Muchas gracias por tus consejos pero sobre todo por enriquecer mi vida con tu presencia.

Y por último un agradecimiento muy especial a todas aquellas personas que han formado parte importante de mi vida, que han creído en mi, me han brindado su amistad o han compartido experiencias únicas que han moldeado y enriquecido mi vida.

A todos ustedes, las personas que quiero y que hacen de este mundo un lugar aún mejor.

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
DNA topoisomerasas y superenrollamiento.....	8
Topoisomerasas tipo1.....	8
Topoisomerasas tipo2.....	8
DNA Topoisomerasas de <i>Escherichia coli</i>	9
Mecanismo de catálisis de Girasa.....	10
Funciones biológicas de las topoisomerasas de <i>Escherichia coli</i>	13
Regulación del nivel de SE de <i>Escherichia coli</i>	14
Fase estacionaria de <i>Escherichia coli</i>	16
La Proteína FIS.....	18
Regulación del gene <i>fis</i>	20
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23

RESULTADOS	30
I.- Verificación del genotipo de la cepa LG4101 y del fenotipo y genotipo de la cepa LG4101 <i>fis</i> ::Cm.....	30
a) Fenotipo de la cepa LG4101.....	30
b) Fenotipo de la cepa LG4101 <i>fis</i> ::Cm.....	31
Verificación del genotipo mutante <i>fis</i> - por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
II.- Cambios en el nivel de SE del DNA en las cepas LG4101 y LG4101 <i>fis</i> ::Cm durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria y en la recuperación del crecimiento.....	35
Cinética de los cambios del SE en las cepas <i>fis</i> + y <i>fis</i> - en medio LB-MOPS (estrés nutricional).....	35
Cinética de los cambios del SE en las cepas <i>fis</i> + y <i>fis</i> - en medio LB (estrés nutricional y alcalino).....	37
Efecto de un incremento repentino de pH en el nivel de SE del DNA durante la fase de crecimiento exponencial.....	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	47

APÉNDICE.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	51

ABREVIATURAS

Ap	ampicilina
C	control
Clq	cloroquina
Cm	cloramfenicol
FE	fase exponencial
FS	fase estacionaria
LB	medio Luria Bertani
LB-MOPS	medio Luria Bertani + ácido morfolinopropano sulfónico
R	DNA relajado
Re	Recuperación
S	DNA superenrollado
SE	superenrollamiento del DNA
Sm	estreptomicina
Tc	tetraciclina

RESUMEN

El DNA cromosomal de todas las células se encuentra bajo tensión helicoidal o superenrollamiento (SE), el cual es esencial para los procesos metabólicos del DNA. El nivel de SE en la bacteria *Escherichia coli* depende principalmente de la topoisomerasa I (Top I) que relaja al DNA y de la II o Girasa que lo enrolla. Este nivel varía de acuerdo a la fase de crecimiento y a condiciones de estrés. Por ejemplo, el SE disminuye en la fase estacionaria (FS) y se recupera al añadir nutrimentos al medio. Esta recuperación no se presenta en cultivos donde el pH se alcaliniza al llegar a la FS.

La proteína FIS es uno de los principales reguladores globales de la expresión genética de *E. coli*. FIS regula la expresión de muchas proteínas, entre ellas la de Girasa y Top I. FIS reprime la expresión de Girasa y activa la de Top I, lo que sugiere que FIS participa en los mecanismos homeostáticos de regulación del nivel de SE. La concentración de FIS aumenta notablemente tras añadir medio nuevo a cultivos en FS, momento en el que disminuye la transcripción de los genes *gyr*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de FIS en los cambios de SE en células bajo estrés nutrimental y estrés nutrimental y de pH alcalino, y en la recuperación de las células al añadir medio nuevo. Para este proyecto se construyeron por transducción con el fago P1 *vir* las cepas LG4101 (*fis*⁺) y LG4101 *fis*::Cm (*fis*⁻). Se verificó el fenotipo de las dos cepas construidas, y el genotipo *fis*::Cm se verificó además por PCR. Los cambios en el nivel de SE del DNA se analizaron con un plásmido reportero (pMS01), el cual se purificó por lisis alcalina y sus topoisómeros se separaron en geles de agarosa con cloroquina.

Los cambios de SE en las células *fis*⁺ y *fis*⁻ en estrés nutrimental, son similares: El SE disminuye en la FS de 18 y 72 horas, y se recupera al añadirse nuevamente nutrimentos. En las células *fis*⁺ y *fis*⁻ en estrés nutrimental y de pH de 18 y 48 horas, estos cambios son también similares: Los plásmidos presentan un patrón bimodal con

plásmidos relajados y SE, el cual no cambia al añadirse nutrientes. Sin embargo, después de 72 horas de FS en la cepa *fis-* se presenta una disminución de plásmidos relajados, y permanece la de plásmidos SE. Este patrón se mantiene después de añadirse nutrientes. Un estudio preliminar de la respuesta de las células *fis+* y *fis-* en FE a un estrés alcalino sugiere que ambas células responden de manera similar a este estrés.

Los resultados de este trabajo muestran que FIS no tiene un papel importante en la regulación del SE cuando las células se exponen a estrés nutricional y en la recuperación del crecimiento. Sin embargo, los cambios de SE en las células *fis-* de 72 horas en FS en LB, sugieren que la proteína FIS puede ser importante en las células en estrés nutricional y alcalino prolongado. Es posible que en estas condiciones las cepas *fis-* presenten una mayor sensibilidad a la suma de ambos tipos de estrés, lo que impide que se mantenga la población de plásmidos relajados.

INTRODUCCIÓN

El DNA cromosomal de todas las células se encuentra normalmente bajo tensión helicoidal o superenrollamiento (SE) de tipo negativo, imprescindible para procesos celulares como la replicación, la transcripción, la reparación, la recombinación y la transposición. El nivel de SE en la bacteria *Escherichia coli* se modifica en respuesta a cambios en la osmolaridad, temperatura, concentración de oxígeno o de nutrientes del medio.

El genoma de esta bacteria está formado por 4.6×10^6 pares de bases (pb) y mide aproximadamente 1mm. Esta molécula es mil veces más larga que la longitud total de la célula, de ahí que existan ciertas estrategias para lograr que una molécula tan grande ocupe un volumen muy pequeño y además que el DNA pueda llevar a cabo eficientemente sus funciones metabólicas. El DNA se encuentra en una estructura celular compacta que se denomina nucleoide, que contiene además proteínas y RNA. Las proteínas del nucleoide más relevantes son: FIS, HU, H-NS, IHF, y DPS, las cuales participan en la organización del DNA en el nucleoide y en la regulación de un número importante de genes. En el nucleoide, además de estas proteínas, están presentes las DNA polimerasas, RNA polimerasas y DNA topoisomerasas (Gómez y Camacho, 1995; Ali Azam e Ishihama 1999)

Existen dos formas para compactar al DNA: el SE de tipo plectonómico que implica el entrecruzamiento de la molécula sobre sí misma, de manera que la hélice del DNA describe a su vez una hélice en el espacio y el tipo toroidal, que implica la intervención de proteínas básicas tipo histona alrededor de las cuales la doble hélice se enrolla, lo que provoca zonas de torsión (Gómez y Camacho, 1995 b). En *E. coli*, el 50% del SE es plectonómico y el otro 50% toroidal o restringido.

DNA Topoisomerasas y Superenrollamiento

Las DNA topoisomerasas son enzimas que modifican la tensión helicoidal o SE del DNA mediante reacciones de corte, rotación y ligación de cadenas. Las topoisomerasas actúan independientemente de la secuencia del DNA y se clasifican en dos grupos: topoisomerasas tipo 1 y tipo 2 (Gómez y Camacho, 1995 b; Wang, 1996; Champoux, 2001)

Las **topoisomerasas tipo 1** son endonucleasas monoméricas que requieren iones de magnesio, no requieren ATP y sólo cortan una hebra de DNA de tal forma que la otra pasa libremente a través del corte, relajando progresivamente la molécula. Estas enzimas relajan sólo el DNA enrollado negativamente e incrementan el valor de Lk en una unidad por ciclo de reacción (Gómez y Camacho, 1995a).

Las **topoisomerasas tipo 2** son enzimas multiméricas que cortan ambas hebras de DNA en una reacción acoplada a la unión e hidrólisis de ATP. En los eucariontes estas enzimas están presentes como dímeros y en los procariontes como tetrámeros. Los extremos amino y carboxilo terminal de las enzimas eucarióticas tienen homología con la subunidad B y A de la TopII de los procariontes, respectivamente (Berger et al. 1996).

La generación del SE plectonémico por medio de las topoisomerasas, puede comprenderse mejor al imaginar una molécula de DNA circular y cerrada que reposa sobre un plano; si esta molécula se corta, rota y se une nuevamente, el resultado es que ahora sale del plano ya que se introduce cierta tensión en la hélice y la molécula lo compensa girando en el espacio. Si ahora se corta la molécula enrollada y se une nuevamente después de ser liberada la tensión, la molécula regresa a su conformación original.

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

$$Wr = Lk - Tw$$

Donde **Wr** (writhe number) expresa lo que conocemos como SE y representa el número de veces que el DNA gira sobre sí mismo formando una superhélice. En una molécula completamente relajada este número es igual a cero. El **Tw** (twist number) es el número de vueltas de la hélice en su conformación nativa cuando ésta se restringe a ocupar un solo plano. Tw es dependiente del número de bases por vuelta de la hélice; por ejemplo, en el caso de DNA-B es igual al número de bases de la molécula entre diez. El **Lk** (Linking number) es el número de veces que una hebra de DNA pasa sobre otra en una molécula de DNA superenrollado. Este número es igual a Tw en una molécula relajada (Reece y Maxwell, 1991).

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

DNA Topoisomerasas de *Escherichia coli*

E. coli posee cuatro DNA topoisomerasas, dos del tipo 1 y dos del tipo 2. Al tipo 1 pertenecen la topoisomerasa I (TopI) y la topoisomerasa III (TopIII); mientras que la topoisomerasa II (TopII) o Girasa y la topoisomerasa IV (TopIV) pertenecen al tipo 2. Por su relevancia para la supervivencia celular, la TopI y la Girasa han sido objeto de una investigación exhaustiva. Los modelos de la actividad catalítica de este par de enzimas parecen ser paradigmas del funcionamiento general de las otras dos topoisomerasas que existen en esta bacteria.

La **TopI** es un monómero de 102 kDa cuyo gene estructural *topA* está situado en el min 28 del mapa genético de *E. coli*. *In vitro*, esta enzima cataliza la relajación de DNA superenrollado negativamente y en ciertas condiciones la resolución de nudos intramoleculares en DNA circular y la encadenación-desencadenación de círculos de DNA en forma dependiente de Mg^{2+} .

La **TopIII** es una proteína de 75 kDa codificada por *topB* (min 38.7 del mapa genético de *E. coli*). *In vitro*, la TopIII resuelve nudos en moléculas del DNA circular y encadena-desencadena DNA circular de manera más eficiente que la TopI, pero a

diferencia de esta última, la TopIII no es esencial para la supervivencia. Esta enzima requiere Mg^{2+} y K^+ para su actividad.

La **TopII** o Girasa es un tetrámero constituido por dos subunidades GyrA de 97 kDa y dos GyrB de 90 kDa. Sus genes estructurales, *gyrA* y *gyrB*, se sitúan en los min 48 y 83 del mapa genético de *E. coli*, respectivamente. La Girasa es la única topoisomerasa con la capacidad de introducir SE negativo a expensas de la hidrólisis de ATP en presencia de Mg^{2+} . También es capaz de resolver nudos intramoleculares y encadena-desencadena moléculas de DNA circular. En ausencia de ATP cataliza la relajación del DNA (Gómez y Camacho, 1995b; Wang, 1996; Champoux, 2001).

La **TopIV** es una enzima de 75 kDa codificada por los genes *parC* y *parE*. Las proteínas ParC y ParE muestran una identidad del 40% con respecto a las proteínas GyrA y GyrB respectivamente. Esta enzima también corta las dos hebras del DNA y requiere de ATP; sin embargo, es incapaz de introducir supervueltas en la molécula. Su función *in vivo* es desencadenar los cromosomas hijos, aunque también la TopII puede hacerlo. Las cepas sobreproductoras de TopIV pueden suplir la falta de TopI (Gómez y Camacho, 1995 b).

Debido a la relevancia que tiene la TopII o Girasa para este trabajo, se presenta a continuación su mecanismo de acción detallado.

Mecanismo de catálisis de la Girasa

La introducción de supervueltas negativas catalizada por Girasa se da de la siguiente forma: Girasa interactúa inicialmente con una molécula circular de DNA y forma un complejo en el cual 120pb se enrollan alrededor de la enzima lo que provoca un enrollamiento toroidal positivo. Este enrollamiento toroidal a su vez genera la formación de una supervuelta negativa en la región distal de la molécula de DNA (Fig. 1). Posteriormente se cortan las dos hebras del DNA del complejo Girasa-DNA y se desplaza un segmento de DNA vecino a través del corte. Finalmente se liga el corte

de doble hebra, se hidroliza el ATP y se separa la enzima del DNA (Reece y Maxwell, 1991) (Fig. 2). Cuando la Girasa se disocia del DNA, después de haber ligado el dúplex cortado, el resultado final es que se introducen dos vueltas negativas, debido a que la vuelta positiva toroidal se transforma en una plectonémica negativa.

La hidrólisis de ATP se requiere para un cambio conformacional del tetrámero, lo que permite que Girasa se disocie del complejo DNA-Girasa y se inicie un nuevo ciclo de reacción. Por cada ciclo de reacción de Girasa se requieren dos moléculas de ATP, por lo que por cada ciclo se introducen dos supervueltas negativas; es decir, disminuye el valor de Lk en dos unidades .

Cada uno de los dímeros de la Girasa pueden ser imaginados como un par de mandíbulas conectadas entre sí donde los orificios internos permiten el alojamiento momentáneo del dúplex (Fig. 2).

La subunidad A de Girasa es la responsable del corte y la unión de las cadenas. El análisis cristalográfico de la estructura de este dímero revela la presencia de una cavidad de $\sim 20 \text{ \AA}$ que podría estar implicada en el acomodo del dúplex del DNA durante el intercambio de las cadenas. El fragmento N-terminal es el que posee la actividad de nucleasa y ligasa del DNA.

La subunidad B de Girasa posee el sitio ATPasa, situado dentro de los primeros 400 aa. La porción C-terminal de esta subunidad es necesaria para la interacción entre las subunidades de Girasa.

La Girasa es el blanco de diversos compuestos biológicos y sintéticos. Estos compuestos pueden agruparse en función de su mecanismo de acción. La primera clase reúne a las cumarinas (e.g., cumermicina y novobiocina), compuestos producidos por *Streptomyces* spp. que inhiben competitivamente la unión del ATP a GyrB. Por lo tanto, las cumarinas inhiben la introducción de SE, pero no la relajación. La escasa similitud estructural entre el ATP y las cumarinas sugiere que tienen sitios de unión próximos y mutuamente excluyentes (Maxwell, 1999; Lewis et al. 1996). La segunda clase esta representada por las quinolonas (e.g., ácido nalidíxico y ciprofloxacina), antibióticos sintéticos que se unen a GyrA y estabilizan la unión

covalente DNA-Girasa e impiden la ligación del segmento cortado. La afinidad de las quinolonas por el DNA de cadena sencilla, sugiere que éstas podrían unirse a los bordes del corte (Maxwell, 1999; Lewis et al. 1996).

Mecanismo de acción de Girasa en la introducción de supervueltas negativas en el DNA.

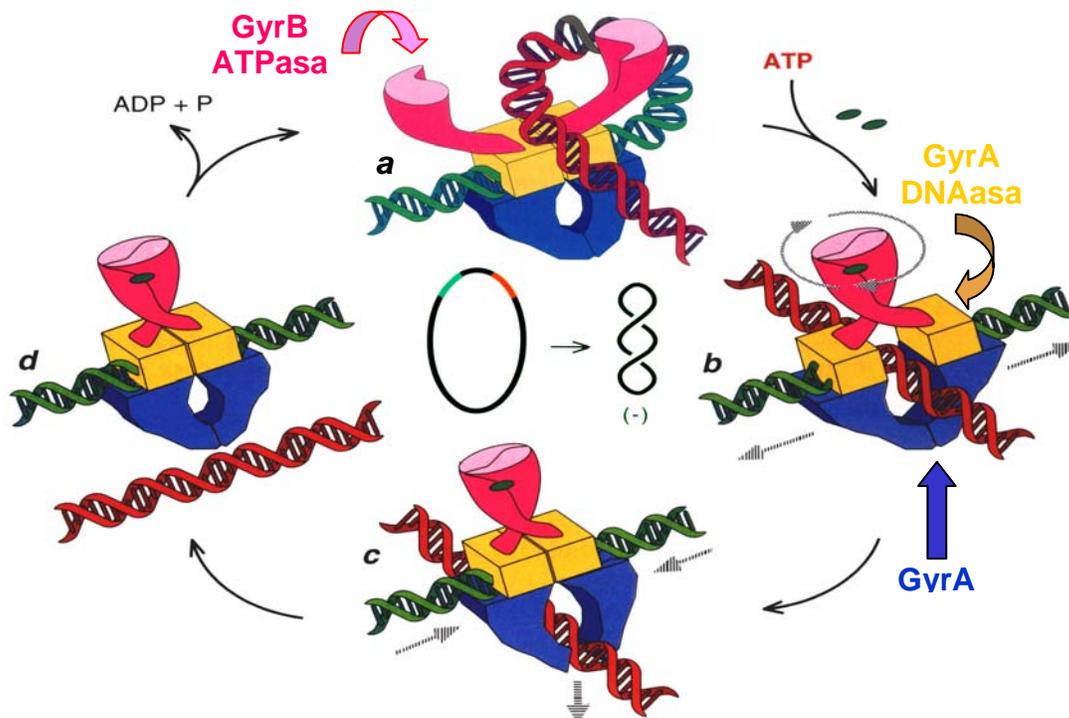


Figura 1.- Cuando la topoisomerasa interacciona con el DNA, acomoda primero en su interior al segmento G (en verde) y queda a la espera de la aparición del segmento T (en rojo) (a). La unión del ATP provoca la dimerización de los dominios aminoterminales (en rosa); el cierre de esta compuerta captura al segmento T hacia el interior de la enzima (b). En su trayecto, el segmento T se abre paso a través del corte producido en el segmento G y alcanza la cavidad central de la topoisomerasa. Al sellarse de nuevo el segmento G, se estrecha el diámetro de la cavidad central; el segmento T se ve entonces forzado a salir de la misma cruzando la principal región de dimerización de la enzima (c). una vez que la compuerta de salida ha vuelto a cerrarse (d), la hidrólisis del ATP permite a la topoisomerasa II adquirir su configuración inicial para empezar un nuevo ciclo de transporte de ADN. (Modificado de Scientific American Latinoamérica, 2003. No.17)

Funciones biológicas de las topoisomerasas de *Escherichia coli*

Cada una de las topoisomerasas es responsable de un conjunto definido de funciones, aunque los análisis bioquímicos muestran cierto grado de superposición de actividades. Estas enzimas son esenciales para mantener un nivel adecuado de SE del DNA para que puedan llevarse a cabo diversas actividades dentro de la célula, como es la replicación y transcripción del DNA. Por ejemplo, durante la replicación la separación de las dos hebras de DNA generan supervueltas positivas hacia delante y negativas hacia atrás de la horquilla de replicación. La función de TopI y de Girasa en este caso es mantener una tensión helicoidal tal que elimine las barreras topológicas creadas por el movimiento de las horquillas. Si no existiera una proteína capaz de liberar la tensión en genomas circulares, ésta se acumularía hasta el punto en que la replicación no pudiera avanzar más. Así mismo, la tensión helicoidal contribuye energéticamente a la separación de las hebras. Muchas de las proteínas que intervienen en el inicio de la replicación requieren de un sustrato SE (Drlica, 1984). Se ha sugerido que la Girasa puede estar implicada con el inicio de la replicación, debido a su mayor afinidad por las zonas de DNA relajado, como cuando se abre la horquilla. Después de completar un ciclo de replicación se generan cromosomas encadenados. Una segregación adecuada de éstos requiere de una actividad de desencadenamiento específica, la cual es llevada a cabo por la TopIV. Además de la replicación, la recombinación y la reparación del DNA también requieren de una topología adecuada para llevarse a cabo.

El avance de la maquinaria de transcripción induce tensión helicoidal positiva al frente y negativa atrás de la RNA polimerasa (RNAP) (Rahmouni y Wells, 1992). La relajación de esta tensión implica directamente a la Girasa y a la TopI. Aparentemente, la TopI es más importante que la TopIV en la relajación de la tensión inducida por la transcripción porque su tasa de relajación es superior (Zechiedrich et al. 2000).

La Girasa podría participar además en la organización del DNA en el nucleoide mediante la formación de estructuras toroidales en sitios preferenciales. Estos sitios podrían ser las secuencias REP (repetitive extragenic palindromic sequences) que son sitios de unión para la Girasa (Gómez y Camacho, 1995b).

La enzima TopI podría estar involucrada en la reparación del DNA. Se sabe que las mutantes en TopI incrementan su sensibilidad a los rayos UV; sin embargo, no se ha determinado si estos efectos son debidos a la alteración de la expresión de las enzimas involucradas en la reparación o si el DNA en estas condiciones no es un buen sustrato para estas enzimas (Drlica, 1984).

La función biológica de la TopIII aún no se conoce bien. Esta enzima está involucrada en la separación de estructuras precursoras de encadenación en la vecindad de la horquilla de replicación (Champoux, 2001). Así mismo, parece ser importante para mantener una frecuencia baja de mutaciones espontáneas provocadas por la pérdida de DNA (Gómez y Camacho, 1995b).

Regulación del nivel del SE en *E. coli*

El DNA de *E. coli* se mantiene dentro de un margen estrecho de superenrollamiento negativo. Este margen depende principalmente del balance de las actividades complementarias de la TopII (Girasa) y la TopI. Una mutación en *topA*, el gene que codifica para la TopI, que inactive parcialmente a ésta, produce un nivel de SE mayor al normal, que puede ser tan grande que provoque un arresto del crecimiento celular. El regreso a un nivel normal de SE puede realizarse al generarse una mutación compensatoria en los genes que codifican a la Girasa (Drlica, 1984). Esta observación condujo a la propuesta de que el SE del DNA es susceptible a un mecanismo homeostático de autorregulación.

La regulación del nivel de SE es importante para la transcripción de un gran número de genes. Por ejemplo, los genes *topA*, el de resistencia a tetraciclina *tetA*, *trp* y los de

los RNA ribosomales (rRNA), se transcriben más eficientemente cuando el DNA esta superenrollado, mientras que *gyrA*, y *gyrB* cuando el DNA está relajado.

Esta regulación es particularmente importante durante la respuesta celular a los cambios ambientales. Se sabe, como ya se mencionó, que un aumento de temperatura, de osmolaridad o el ingreso de las células a una fase estacionaria (FS) por disminución de nutrientes en el medio, se acompañan de cambios importantes en el nivel del SE, lo que induce una respuesta celular compensatoria.

En el caso de un aumento brusco de temperatura (estrés calórico), el nivel de SE disminuye en los primeros dos minutos y recupera su nivel normal de SE a los cinco minutos. La recuperación de este SE depende de la Girasa y posiblemente de las chaperonas DnaK y ClpB (Camacho et al. 1995, datos del laboratorio no publicados).

Las células de FS en medio LB (medio que se torna alcalino en FS), presentan una topología distinta en el DNA de un plásmido reportero, a aquellas células de FS en medio LB-MOPS, (medio que permanece neutro a lo largo de toda la curva de crecimiento) (Reyes, Contreras et al. 2003, datos del laboratorio no publicados).

En medio LB, el nivel de SE del DNA decrece en las células al entrar éstas a FS. Sin embargo, después de 12 y 72 horas de FS, los plásmidos de las células de aproximadamente el 60% de los cultivos presentan una distribución bimodal del plásmido; es decir, una población de plasmidos relajados, y otra de plásmidos SE (datos no publicados).

El nivel de SE de los plásmidos de las células en medio LB-MOPS, disminuye progresivamente conforme las células entran en FS. Estos plásmidos se encuentran más relajados tras haber permanecido 72 horas en FS, en comparación con 18 horas en esta fase. Los plásmidos de las células en FS en medio LB-MOPS, presentan un nivel de relajación menor que los plásmidos de las células en LB.

Con respecto a la recuperación del crecimiento después de una FS, las células en medio LB después de 30 minutos de agregarse nutrientes, muestran una

distribución bimodal similar a la de las células de FS que no se someten a este periodo de recuperación. Este patrón permanece sin cambios, y sólo se recupera parcialmente después de 80 minutos tras la adición de nutrientes. En contraste, los plásmidos de células en medio LB-MOPS, alcanzan en aproximadamente 1-3 minutos después de la adición de nutrientes, un nivel de SE similar al observado en células de FE. Los resultados son similares a lo señalado para cada caso después de haber permanecido 72 horas en fase estacionaria (Reyes, Contreras et al. 2003, datos no publicados).

Debido a que el objetivo principal de esta tesis es estudiar los cambios en el nivel de SE durante un estrés inducido por limitación de nutrientes, como ocurre en la FS de *E. coli*, se exponen a continuación los conocimientos existentes sobre dicha fase.

Fase estacionaria de *E. coli*

En la naturaleza las bacterias se enfrentan a diversas condiciones ambientales, la mayoría de las veces adversas, ya sea por presencia de moléculas extrañas en el medio, cambios de temperatura, de osmolaridad, carencia de nutrientes, etc. La carencia de nutrientes es una etapa frecuente en la vida de las bacterias, como lo sugiere la presencia de sistemas eficientes de captación de nutrientes y la capacidad de incrementar rápidamente el volumen celular cuando éstos reaparecen en el medio.

Durante el ciclo de vida de *E. coli*, las células llevan a cabo divisiones celulares continuas hasta que se agotan los nutrientes. En este momento las células disminuyen su velocidad de crecimiento hasta que se detiene por completo y entran en lo que se conoce como FS de crecimiento. En esta fase las células muestran cambios tanto fisiológicos como morfológicos. Por ejemplo, cambian su metabolismo a uno de menor costo energético y mayor resistencia celular (condensación del nucleóide, morfología celular más pequeña y redonda, incremento en la degradación de proteínas, y un decremento general a nivel de transcripción y traducción) para

resistir el estrés nutricional y permanecer viables hasta que las condiciones ambientales sean favorables y puedan reiniciar su crecimiento.

Los niveles de transcripción de *gyrA* y *gyrB* incrementan progresivamente conforme las células entran a FS. En esta fase, los niveles de expresión alcanzan una meseta y permanecen constantes por al menos 18 horas. Después de la adición de nutrientes al cultivo, el nivel de transcripción de los genes *gyr* disminuye rápidamente, y se incrementa sólo hasta después de 60 minutos (Reyes, et al. 2003).

Los análisis de Western blot muestran que Girasa está presente en las células de FS a una concentración similar a la de las células en FE. La adición de nutrientes al cultivo de FS induce una rápida recuperación del nivel de SE. Así mismo, se ha comprobado que la rápida recuperación del SE cuando las células crecen en LB-MOPS, se da aún con la adición al medio de rifampicina y cloramfenicol que actúan como inhibidores de la transcripción y la traducción de los genes de Girasa respectivamente. Sin embargo, esta recuperación no se presenta si se adiciona novobiocina que actúa como inhibidor de la actividad de Girasa. Estos resultados muestran que Girasa recupera su actividad, tan pronto como los nutrientes vuelven a estar disponibles en el medio, y que la recuperación del SE no requiere de la síntesis de novo de Girasa. Por tal motivo, se ha propuesto que la Girasa presente previamente en las células de FS es la responsable de la pronta recuperación del SE, ya que ésta, a diferencia de la mayoría de las proteínas, no se degrada incluso durante una FS prolongada. Con lo anterior se puede afirmar que el ayuno nutricional se acompaña, de cambios en el nivel de SE del DNA.

El retraso en la transcripción de los genes *gyr* durante la recuperación del crecimiento se debe probablemente al rápido incremento de la concentración celular de una proteína conocida como FIS. Esta proteína aumenta su concentración intracelular inmediatamente después de añadirse nutrientes al medio probablemente como respuesta compensatoria al aumento en el nivel de SE del DNA al reiniciar el crecimiento.

La proteína FIS regula la expresión de un número importante de genes, entre los que se encuentran, como se mencionará más adelante, los genes *gyr* y *topA*.

La Proteína FIS

Como se mencionó anteriormente, en las bacterias existe un grupo de pequeñas proteínas que se unen al DNA conocidas como proteínas asociadas al nucleóide o tipo-histona, las cuales contribuyen a la estructura del nucleóide bacteriano y a la regulación de la expresión génica. FIS por sus siglas en inglés (**F**actor for **I**nversion **S**timulation) es una proteína homodimérica (11.2 kDa) perteneciente a esta clase. Esta proteína de 98 aminoácidos se une a la región activadora de los operones de los genes RNAr y RNAt incrementando su actividad de transcripción.

Originalmente FIS se identificó en *E. coli* como un factor involucrado en la recombinación sitio-específica; además, induce el doblamiento del DNA, se une al origen de replicación en *E. coli* (*oriC*) y actúa como regulador transcripcional de genes necesarios para el crecimiento y la replicación del DNA.

FIS es parte de un operón donde el gene precedente de *fis*, (*yhdG*), codifica una RNAt dihidrouridina sintasa (Osuna, R., 2004). La proteína FIS es considerada un regulador transcripcional global debido a la gran cantidad de genes que regula. Por ejemplo, funciona como un regulador negativo de la transcripción de *gyrA* y *gyrB*, y positivo de *topA*; además, como ya se mencionó, activa los promotores de RNA estable durante el ajuste celular de la maquinaria de traducción a condiciones de rápido crecimiento (Travers et al. 2001).

Esta proteína aumenta de manera importante y transitoria inmediatamente después de añadir medio nuevo a cultivos alcalinos en FS. Dentro de 15 minutos después de la adición de nutrientes se da un rápido aumento transitorio en los niveles de RNAm de *fis*, posteriormente cesa la producción de este RNAm.

La Proteína FIS se acumula y alcanza su concentración máxima antes de la primera división celular. En respuesta a la adición de nutrientes, FIS aumenta su número de aproximadamente 50 moléculas por célula a 50,000 moléculas. (Reid et al. 1992). Cabe mencionar que la regulación de la síntesis de FIS ocurre únicamente a nivel transcripcional (Khamann et al.1992).

Se mostró también que hay una correlación inversa entre la cantidad de FIS y el grado de SE de un plásmido. Recientemente se ha demostrado que el incremento en los niveles del superenrollamiento negativo activa fuertemente el promotor de *fis* tanto *in vivo* como *in vitro*.(Muskhelishvili et al. 1997).

Con respecto a las concentraciones de FIS, estas son más bajas en células creciendo en un medio pobre; sin embargo, estudios previos no han establecido si la variación en los niveles de FIS es importante para la activación de la transcripción de RNAr. Es posible que los sitios destinados para FIS sean ocupados completamente a concentraciones muy bajas de FIS y que se requieran niveles altos para otras funciones celulares (Gourse et al. 1998)

Se sabe que cuando FIS se une a distintos sitios con diferente afinidad, la concentración intracelular de FIS podría afectar la forma en que participa en diferentes mecanismos biológicos. Inicialmente se observó que los extractos crudos de *E. coli* en distintas fases de crecimiento, tienen cantidades diferentes de FIS (Thompson et al.1990)



Figura 2.- Estructura tridimensional de la proteína FIS.
(Tomado de www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.shtml.)

Regulación del gene *fis*

Por medio de análisis mutacionales utilizando fusiones con el promotor *lacZ* se demostró que *fis* es autorregulado por FIS; es decir, funciona como autorregulador de su propio promotor y la unión a éste puede excluir la unión de la RNA polimerasa (Muskhelishvili et al. 1997).

Las mutantes del gene *fis* muestran tasas de crecimiento ligeramente reducidas en medio rico, además de presentar una fase lag más larga después de la dilución de los cultivos en FS, alcanzando a la cepa silvestre al inicio de la fase estacionaria, (Mushkelishvili et al. 1997),. Estas mutantes presentan además anormalidades morfológicas a altas temperaturas (Spaeny-Dekking et al. 1995).

Los efectos *in vivo* de FIS en la topología del DNA ocurre en el contexto de compactar al DNA por medio de otras proteínas estructurales y activar la modulación de la densidad del SE por su acción sobre la expresión de las DNA topoisomerasas.

En un trabajo previo (Muskhelishvili, G., et al 2002), reportaron la existencia de 5 promotores en la región reguladora de *fis*, mostrando una compleja regulación, donde el promotor 2 se consideraba el promotor principal en la transcripción del operón FIS, existiendo además autorregulación y participación de CRP (otro regulador global) en la regulación de FIS. Dos años más tarde (Osuna, R., et al. 2004) demostraron por medio de mapeo con nucleasa S1, ensayos de β galactosidasa y transcripción *in vitro*, la existencia de un único promotor, atribuyendo la anterior asignación de los promotores adicionales a artefactos producidos por eventos de alineamiento secundarios, al exceder la concentraciones de la enzima utilizada en la realización de este ensayo.

Estudios previos presentaban a *fis* como uno de los genes más complejamente regulados, ya que proponían la presencia de 5 promotores, uno de ellos divergente, en la región reguladora de *fis*. Además, en esta región se detectaron cajas para FIS y CRP, lo que sugiere la existencia de un efecto sinérgico entre estas dos proteínas (Muskhelishvili et al.2002).

Sin embargo, los estudios recientes de la expresión del gene *fis* descartaron la presencia de 4 de estos 5 promotores al demostrar la presencia de un único promotor (P1) involucrado en la transcripción del operón del gene *fis* (Osuna et al. 2004).

Con estos datos, se sugiere que FIS modula la dinámica cromosomal durante las fases de crecimiento y su expresión podría tener implicaciones sobre los mecanismos homeostáticos de regulación del nivel de SE, que son, como se explicó, dependientes de las fase de crecimiento (Muskhelishvili et al. 2000).

La elevada expresión de FIS en FE podría ser necesaria para que se compense o prevenga la generación de una tensión excesiva en el DNA que podría comprometer el crecimiento celular (Mushkelishvili et al. 1997).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el papel de la proteína FIS en la regulación de los cambios del nivel de superenrollamiento del DNA que se observan en las células de *E. coli* durante el estrés nutricional y el estrés nutricional y de pH.

Objetivos particulares

Determinar el nivel de superenrollamiento del DNA en células *fis+* y *fis-* en las siguientes condiciones:

- Crecimiento exponencial.
- Durante la fase estacionaria en un medio de pH neutro (estrés nutricional) y la fase estacionaria en un medio alcalino (estrés nutricional y de pH).
- Recuperación del crecimiento de las células en estrés nutricional y nutricional y de pH al añadirse nutrientes al medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos

Todos los experimentos se realizaron con las cepas LG4101 (*wt*) y LG4101 *fis::Cm*. Estas cepas se construyeron a partir de la cepa MC4100. El genotipo de esta cepa es $\Delta(\textit{argF-lac})295 \textit{araD139 rpsL150 thiA1 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR}$ y su fenotipo Lac⁻ Ara⁻ Thi⁻ Sm^R.

Inicialmente se construyó la cepa MC4100 *relA+* Tn10 por transducción con el fago P1 *virA* propagado previamente en la cepa CAG12079. El genotipo de esta cepa es *relA+* *fuc-3072::Tn10* y su fenotipo RelA⁺ Tc^R (Berlyn et al.1990). La mutación *fuc3072::Tn10* se localiza en el minuto 63.2 del mapa genético de *E. coli* y *relA+* en el minuto 62.7 lo que permite la cotransducción del gene de resistencia a tetraciclina presente en el transposón Tn10 y el gene silvestre *relA+* de la cepa CAG12079 a la cepa MC4100. La cepa construida de esta manera se denominó LG4101. Esta cepa presenta el genotipo de la MC4100 pero es *relA+* Tn10 y su fenotipo es Lac⁻ Ara⁻ Thi⁻ RelA⁺ Sm^R Tc^R.

La cepa LG4101 *fis::Cm*, se construyó por transducción con el fago P1 *virA*, a partir de la cepa CSH50 *fis::Cm*. (González-Gil et al.1996). El fenotipo de esta cepa es Lac⁻ Ara⁻ Thi⁻ RelA⁺ FIS⁻ Sm^R Tc^R Cm^R. Las cepas LG4101/pMS01 y LG4101 *fis::Cm*/pMS01 se construyeron por transformación con el plásmido pMS01.

El plásmido pMS01 es un derivado Tc^S del plásmido multi-copia pBR322 Ap^R Tc^R al que se le eliminó el gen *tetA* (León et al. 1988).

Para la conservación de las cepas, se inoculó una colonia de la cepa en 3 ml de medio rico de cultivo LB (ver apéndice) y se incubó a 37°C durante toda la noche. De estos cultivos se tomaron 500 µl y se transfirieron a tubos con 500 µl de glicerol al 40%. Los tubos se almacenaron a -70°C.

Curvas de crecimiento bacteriano

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

Las cepas LG4101/pMS01 y LG4101 *fis*::Cm/pMS01 se cultivaron en los medios antes mencionados con carbecín a 300 µg/ml; este antibiótico es similar a ampicilina pero su degradación es más lenta. El crecimiento bacteriano se midió indirectamente como el aumento en unidades de absorbancia del cultivo usando un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 20D) en la longitud de onda de 550_{nm}. Las lecturas se tomaron cada 30 minutos.

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

Cuentas viables

Para obtener el número de células viables presentes en un cultivo (cuentas viables) en diferentes puntos de la curva de crecimiento y en la FS, se hicieron diluciones tanto para la cepa silvestre LG4101 como para la mutante LG4101 *fis*::Cm de la siguiente manera:

A partir del cultivo bacteriano se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a una dilución de 10^{-7} en tubos con 5 y 4.5 ml de medio de dilución, inoculando 50 y 500 µl respectivamente. En cajas con LB y LB con cloramfenicol (25 µg/ml), se sembraron por goteo 100 µl de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se contaron las unidades formadoras de colonias. Las cuentas viables se reportan como número de células/ml.

Transformación con el plásmido pMS01 (Ap^R)

Para introducir el plásmido reportero pMS01 en las cepas LG4101 y LG4101 *fis::Cm* se utilizó el método de preparación de células competentes en un paso descrito por Chung et al. (1989). Para ello se tomaron 100 µl de un cultivo de toda la noche de las cepas LG4101 y LG4101 *fis::Cm* y se inocularon por separado en 10 ml de medio LB. Estos cultivos se dejaron crecer a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 550_{nm} de 0.45. En este valor de D.O., el cultivo se encuentra en crecimiento exponencial y tiene una cuenta viable de aproximadamente 1×10^8 células/ml. De ahí se tomaron 500 µl y se mezclaron homogéneamente con 500 µl de TSS 2X.

De esta mezcla se transfirieron 100 µl a un tubo Eppendorf y se adicionó 1 µl de plásmido pMS01 (aproximadamente 0.5-1µg), se incubó durante 30 minutos, después el tubo se transfirió a un baño a 45°C durante 5 minutos, transcurrido este tiempo, el tubo se regresó a hielo 5 minutos, después se le adicionaron 900 µl de medio LB, y se hizo otra incubación a 37°C durante mínimo 1 hora. Finalmente, se tomaron 100 µl del contenido y se sembraron por espatulado en una caja de medio LB con ampicilina (200 µg/ml). Como control se procesó de la misma manera un tubo con 100 µl de la mezcla sin plásmido.

Propagación de P1 *virA* en *Escherichia coli*

Se puso 0.1 ml de un cultivo de una noche de la cepa CSH50 *fis::Cm* en 10 ml de medio LB a 37°C y se creció hasta una D.O 550_{nm} de 0.45.

Posteriormente, se añadió CaCl₂ a una concentración final de 5 mM (0.005 M). Esto se consiguió añadiendo 333 µl de una solución estéril 0.15 M de CaCl₂ a los 10 ml de cultivo. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación. Después se mezcló 1 ml de cultivo, más 0.1 ml del fago (10^7 - 10^8 ufp/ml) (unidades formadoras de placa). Esta mezcla se incubó 20 minutos a 37 °C sin agitación, después un tubo de LC (2.5 a 3 ml de LB con CaCl₂ a 2.5 mM) previamente licuado se mezcló con los 1.1 ml de la mezcla bacteria-

fago. Esta mezcla se vació a cajas de medio LC y las cajas se incubaron a 37 °C durante 12 horas.

Transcurridas las 12 horas, se añadió 200 µl de Luria a cada caja, y se incubó a 4°C durante 3 horas. Pasado este tiempo se separó con espátula el agar blando. Se añadieron 3 gotas de cloroformo, se agitó fuertemente y se centrifugó 15 minutos a 5,000 rpm. Por último el sobrenadante se guardó ya que es ahí donde se encuentra el fago. Se repitió todo el procedimiento tres veces para asegurar la presencia de fagos transductantes; es decir, de fagos con fragmentos de DNA bacteriano.

Titulación de P1 *virA* en *Escherichia coli*

Para obtener el número de fagos/ml, o titulación del fago, se pusieron 100 µl de un cultivo de una noche de la cepa CHS50 *fis::Cm* en 10 ml de medio LB a 37°C y se creció hasta una D.O de 550_{nm} de 0.45.

El cultivo se centrifugó a 5,000 rpm y se resuspendió en 1 ml de triptona al 1% para tener 10⁹ células/ml.

Posteriormente, se mezclaron los componentes en el siguiente orden:

- 100 µl (~10⁸ células/ml) de la cepa bacteriana concentrada.
- 100 µl de una solución de CaCl₂ 0.015 M y MgSO₄ 0.030 M.

La mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

- Se añadió 100 µl del fago diluido en medio LB.

Para estos experimentos se prepararon mezclas de bacterias con fagos a las siguientes diluciones: 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Después, se incubó, sin agitación, a 37°C durante 20 minutos.

Cada mezcla se añadió a un tubo de 3 ml de medio semisólido LC previamente licuado e incubado a 45°C, se agitó y se vació a cajas LC a temperatura ambiente, procurando que las cajas quedaran bien niveladas; se incubó a 37°C durante 12 horas.

Transducción de P1 *vir* en *Escherichia coli*

Se pusieron 200 µl de un cultivo de toda la noche de la cepa a transducir en 10 ml de medio LB a 37°C, y se creció el cultivo hasta una D.O 550_{nm} de 0.45 (~10⁸ células/ml). El cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm, y se resuspendió en un volumen de triptona 1% para tener aproximadamente 10⁹ células/ml.

Se tomaron 500 µl de este cultivo y se disolvieron en el mismo volumen de una solución de CaCl₂ 0.015M y MgSO₄ 0.030M, y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 500 µl de una dilución del bacteriofago P1 *virA* en LB con aproximadamente 5 x 10⁷ ufp/ml y se incubó a 37°C por 20 minutos sin agitación.

Se siguió el mismo procedimiento para hacer un experimento control sin fago

A continuación, se centrifugó el tubo durante 2 minutos a 500 rpm, y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de medio de dilución, se repitió este paso para retirar al máximo a los fagos libres, y se resuspendió ahora en 400 µl de medio de dilución con el fin de concentrar a las células.

Para seleccionar a las cepas transductantes, las células se sembraron por goteo en medio selectivo (LB tetraciclina) para LG4101 y en LB cloramfenicol para LG4101 *fis::Cm*.

Purificación del plásmido reportero pMS01

La purificación del plásmido se hizo con una versión modificada del método de lisis alcalina para la extracción del DNA (Maniatis et al. 1982).

Se tomaron 50 µl de los cepas silvestre y *fis::Cm* de glicerol, se inocularon en tubo de ensayo de 10 x 1 cm con 3 ml de medio LB con carbecín 300 µg/ml y se dejó crecer en agitación toda la noche. De este cultivo se tomaron 100 µl y se inocularon en 10 ml de medio LB o LB-MOPS con carbecín 300 µg/ml.

Para llevar a cabo la purificación del plásmido, se creció el cultivo en medio selectivo a 37 °C con agitación constante (180 rpm) hasta alcanzar la densidad óptica de 0.45

para los cultivos en fase exponencial y 1.5 para cultivos en fase estacionaria. Los cultivos se transfirieron rápidamente a tubos de 30 ml con 15 ml de medio LB congelado tipo frappé. Para purificar el plásmido de un número similar de células, de los cultivos de fase exponencial se transfirió un volumen de 10 ml (todo el cultivo) a cada tubo. En el caso de los cultivos de fase estacionaria, se transfirieron 2 ml de éste y 8 ml de medio nuevo a cada tubo.

Las células se cosecharon por centrifugación a 11,000 rpm durante 10 minutos a 4°C; se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 200 µl de Solución I con lisozima 5 mg/ml y se añadió 15 µl de RNasa (10 mg/ml). La solución se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agitó suavemente en el vortex para formar un homogenado. El tubo se incubó destapado en hielo-agua durante 10 minutos.

Posteriormente se adicionaron 400 µl de solución II, se mezcló invirtiendo el tubo cuatro veces con la mano, y se incubó durante 10 minutos en hielo-agua.

Transcurrido este tiempo, se añadió 300 µl de la solución III, se agitó el tubo invertido en el vortex por 10 segundos y se incubó en hielo-agua durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos en frío, se recuperó el sobrenadante, en un tubo nuevo Eppendorf, se agregaron 650 µl de isopropanol y se incubó toda la noche a -20°C.

Los tubos, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el líquido y se secó la pastilla a 42°C por dos horas.

Por último, se resuspendió la pastilla en 12 µl de agua y 8 de colorante guía para DNA.

El DNA del plásmido pMS01 contenido en los 20 µl de solución se utilizó como muestra para observar su patrón de SE en el gel de agarosa.

Separación de los topoisómeros del plásmido pMS01 por electroforesis en geles de agarosa

Los plásmidos se separaron por electroforésis en geles de agarosa (Bio-Rad) con cloroquina (Clq) (10 µg/ml). Se prepararon 1000 ml de amortiguador TBE 1X con la concentración de Clq señalada. De estos 1000 ml, 70 ml se utilizaron para preparar el gel de agarosa al 1% con dimensiones de 9 x 15 cm y el resto del buffer se colocó en la cámara de electroforesis.

Las muestras (20 µl) se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 segundos y al transferirlas al gel se evitó tomar el sedimento.

La electroforesis se llevó a cabo a 25 Volts constantes durante 22 horas. El amperaje al inicio de la electroforesis fue de aproximadamente 38 mA.

Al terminar la electroforesis el gel se lavó con agua corriente con agitación suave con cuatro cambios de agua a intervalos de una hora con el fin de eliminar la Clq. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma) 2.5 µg/ml y se fotografió con película KODAK TRI-X-PAN utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y filtro rojo.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasasa se llevó a cabo siguiendo los estándares del proveedor "Life Technologies" para la DNA Taq polimerasa, usando una temperatura de alineamiento (T_m) de 55°C, una temperatura de desnaturalización de 94°C y una de extensión de 72°C con 35 ciclos. Las bandas generadas como producto de la amplificación, se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

I.-Verificación del fenotipo de la cepa LG4101 y del fenotipo y genotipo de la cepa LG4101 *fis::Cm*

Todos los experimentos se realizaron con las cepas LG4101 (silvestre o “wild type”) y LG4101 *fis::Cm*. Estas cepas se construyeron a partir de la cepa MC4100 *relA1* por medio de transducción con el fago P1 *vir*. (ver Material y Métodos).

Fenotipo de la cepa LG4101

En un primer paso, la cepa MC4100 se hizo *relA+*, debido a que el producto de este gene es una de las dos proteínas responsables de la síntesis de ppGpp en *E. coli*. El ppGpp es el efector del control estricto de la expresión génica, el cual se induce en diferentes condiciones de limitación nutrimental (Metzger et al., 1989; Cashel et al., 1996), por lo tanto, se consideró importante realizar los experimentos con una cepa silvestre para *relA* ya que el objetivo de este trabajo es estudiar el SE del DNA durante la FS.

Para verificar el fenotipo *RelA+* de la cepa LG4101, se siguió el método descrito por Danchin y Uzan (1976) con el cual pueden diferenciarse las cepas silvestres de las mutantes *relA1*, de acuerdo a su habilidad para crecer en un medio mínimo suplementado con 20 µg/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos: Serina, Glicina, Metionina y con 100 µg/ml de Valina. En este medio, el crecimiento de la cepa *relA1* se inhibe. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa LG4101 es *relA+*.

Fenotipo de la cepa LG4101 *fis*::Cm

Las cepas *fis*⁻ muestran un retardo moderado en el reinicio del crecimiento cuando los cultivos de una noche se diluyen en medio nuevo. Para verificar este comportamiento en la cepa LG4101 *fis*::Cm, se comparó su curva de crecimiento con la de la cepa silvestre LG4101, en dos medio diferentes.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

a).- LB es un medio donde la principal fuente de carbono son los aminoácidos y péptidos, de tal manera que cuando las células se van acercado a la FS expelen al medio moléculas aminadas; como consecuencia, se produce un incremento progresivo del pH, llegando a un máximo de 9 (Lazar et al.1998). En esta condición las células, además de que se enfrentan a la falta de nutrientes, se someten a un estrés adicional que es el aumento de pH del medio. *E. coli* es una bacteria neutrofílica y el intervalo de pH externo en el cual puede regular su pH interno es de 5 a 8, por encima o debajo de estos valores las células presentan mecanismos regulatorios de tolerancia. Se ha reportado que la homeostasis del pH en *E. coli* requiere de una alta tasa respiratoria o bien de ATP (Booth 1985), por lo que esta homeostasis podría no mantenerse en las bacterias de fase estacionaria en medio LB. En esta fase las células contienen poco ATP y la tasa de respiración es baja.

b).- LB-MOPS, es un medio LB con el amortiguador (MOPS) que permite mantener un pH de 7 a lo largo de toda la curva de crecimiento.

En la figura 4 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas *fis*⁺ y *fis*⁻ en las que el crecimiento se expresa en Unidades de Densidad Óptica (D.O.) a longitud de onda de 550_{nm}. Tanto en el medio LB como en LB-MOPS se observa un retraso en el crecimiento en la cepa LG4101 *fis*::Cm, con respecto a la silvestre. Estas diferencias se observan durante toda la fase de crecimiento exponencial, y desaparecen cuando

las células llegan la fase estacionaria, ya que en esta fase alcanzan una D.O. muy similar.

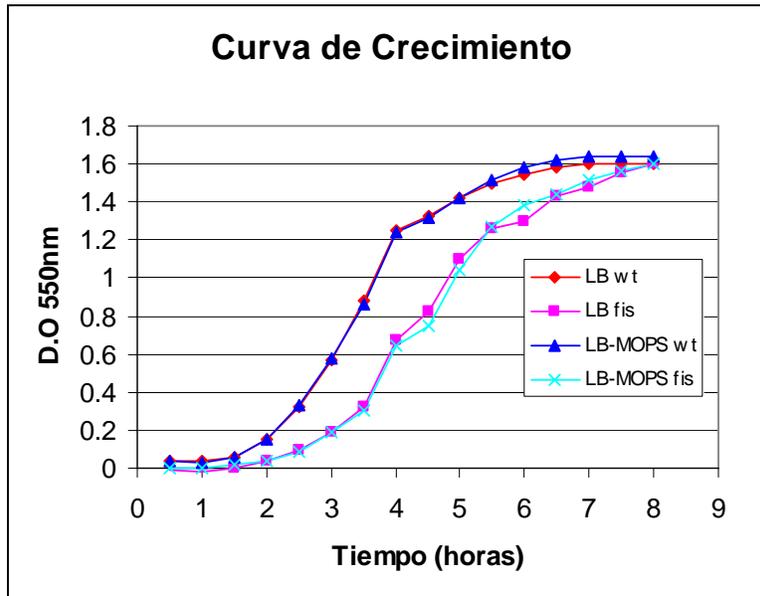


Figura 3.- Curva de crecimiento de las cepas LG4101 y LG4101 *fis*::Cm a 37 °C en medios LB y LB-MOPS.

Otra característica de las células *fis*⁻, es su comportamiento cuando se co-cultivan con células silvestres (Muskhelishvili, G., et al. 1997). El co-cultivo se inicia con aproximadamente 50% de células *fis*⁺ y 50% de *fis*⁻. Después de unas horas de crecimiento, la proporción de células *fis*⁺ es mayor que la de las *fis*⁻. La explicación de este comportamiento no se ha dilucidado, ya que las células *fis*⁻, en FS presentan una sobrevivencia similar a la de las silvestres cuando crecen en un cultivo por separado.

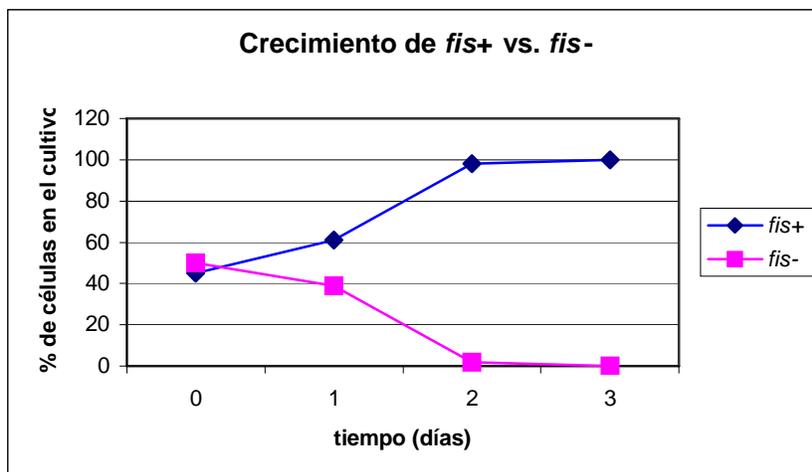


Figura 4.- Curva de crecimiento de las cepas LG4101 *fis*::Cm a 37 °C en medio LB en un co-cultivo con células silvestres LG4101 en una proporción inicial de 50% de cada cepa.

En la Figura 5 se presentan los resultados de un experimento de co-cultivo durante una FS prolongada, siguiendo el método de (Muskhelishvili, R. et al. 1997), donde se observa que la cepa LG4101 *fis*::Cm disminuye su proporción en relación a la cepa silvestre LG4101. Con esto se confirma que la mutante que se construyó es efectivamente *fis*⁻. La explicación de este comportamiento no se ha dilucidado aún, sin embargo, cuando la cepa *fis*⁻ se cultiva por separado, presentan una sobrevida similar a la de las silvestres (datos no mostrados).

Verificación del genotipo mutante *fis*⁻ por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el fin de verificar directamente el reemplazo del gene silvestre *fis* por el gene mutado *fis*::Cm, se llevó a cabo un PCR a partir de colonias aisladas en LB. Para la reacción de amplificación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: (5'-TCAACGCCATTGAGGATGCCAG-3') y (5'-TTTCGCCTGCACTCCAGAACTGTC-3'). El fragmento amplificado utilizando estos oligos debe ser de 835 pb (pares de bases)

en la cepa silvestre y de 1,650 pb en la mutante, ya que en este caso, está interrumpido por un gene de resistencia a cloramfenicol.

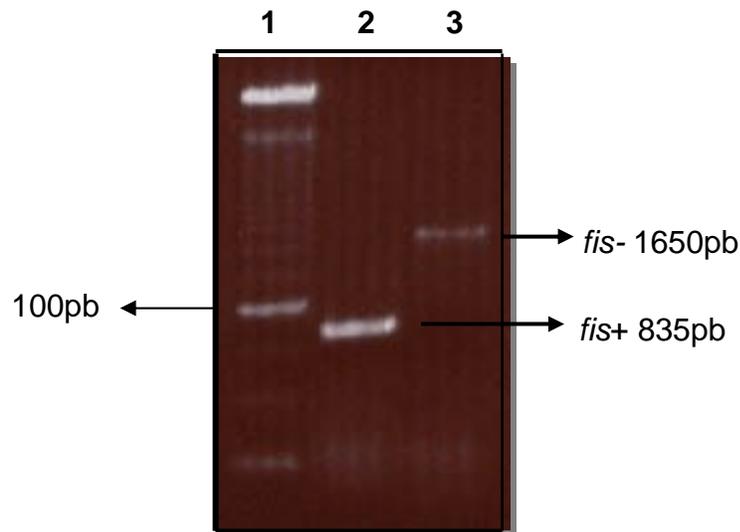


Fig.- 5 Amplificación por PCR del gene *fis+* y de la región mutada *fis::Cm* (*fis-*). (1).-Marcador de peso molecular. (2).-Fragmento de 835 pb amplificado por PCR correspondiente al gene *fis*. (3).- Fragmento de 1650 pb amplificado por PCR correspondiente a la mutación *fis::Cm*

Conforme a lo esperado, el producto de la amplificación en el carril número 2, muestra un fragmento de 835 pb para la cepa silvestre LG4101. En el carril número 3, se observa un fragmento de 1,650 pb que corresponde al producto de la amplificación de *fis::Cm* dentro de la cepa mutante LG4101 *fis::Cm* (Fig. 6).

II.-Cambios en el nivel de SE del DNA en las cepas LG4101 y LG4101 *fis::Cm* durante las fase de crecimiento exponencial y estacionaria y en la recuperación del crecimiento.

Para evaluar el papel de la proteína FIS en la regulación de los cambios en el SE del DNA se utilizó un plásmido reportero ya que éste, como del DNA del cromosoma, está sujeto principalmente al balance de las actividades de la TopI y de la Girasa.

El plásmido reportero que se utilizó fue el pMS01 que, como ya se mencionó, es un derivado del pBR322 al cuál le fue deletado el gene *tet* (León et al. 1988).

Cabe mencionar que las células pueden entrar a la fase estacionaria por diversos motivos como son: agotamiento súbito o paulatino de nutrimentos, cantidad limitada de un nutrimento preferencial, fuentes de energía pobres, etc.

En este trabajo se llegó a una FS por pérdida paulatina de nutrimentos a partir de un medio rico. Esta forma de estrés nutricional permite que al ir agotando lentamente los diferentes nutrimentos de un medio de crecimiento, las células sean capaces de modular su fisiología.

Así mismo, se estudió el efecto de un estrés adicional a la falta de nutrimentos que es el aumento en el pH del medio que se observa en la FS. Para ello, se estudió el efecto del pH sobre los cambios en el nivel de SE de las cepas LG4101 y LG4101 *fis::Cm* en medio LB y LB-MOPS.

Cinética de los cambios del SE en las cepas *fis+* y *fis-* en medio LB-MOPS (estrés nutricional).

Para estudiar la influencia de FIS en el nivel de SE del DNA de *E. coli* en LB-MOPS donde las células se encuentran bajo estrés nutricional, se determinó el patrón de distribución de topoisómeros de pMS01 en estas células. Este patrón se obtuvo de células en fase exponencial (FE) y en fase estacionaria (FS) de 18 y 72 horas. Además se obtuvieron los patrones de las células con diferente tiempo en FS después

de 10 minutos de añadirse medio nuevo al cultivo. Estos patrones permiten estudiar la capacidad de las células de FS para recuperar el nivel de SE al tener nuevamente nutrientes.

Los resultados muestran que el nivel de SE de las células *fis+* y *fis-* en la fase exponencial y en la estacionaria de 18 y 72 hrs es similar: el DNA se encuentra SE en la exponencial, y en la estacionaria de 18 y 72 horas el DNA se relaja; es decir, disminuye el nivel de SE. La capacidad para recuperar el SE a los 10 min después de añadirse nuevamente nutrientes al cultivo, es también similar en las células *fis+* y *fis-* (Fig.7). Es decir, en estas células los plásmidos recuperan un nivel de SE similar al de las células de FE.

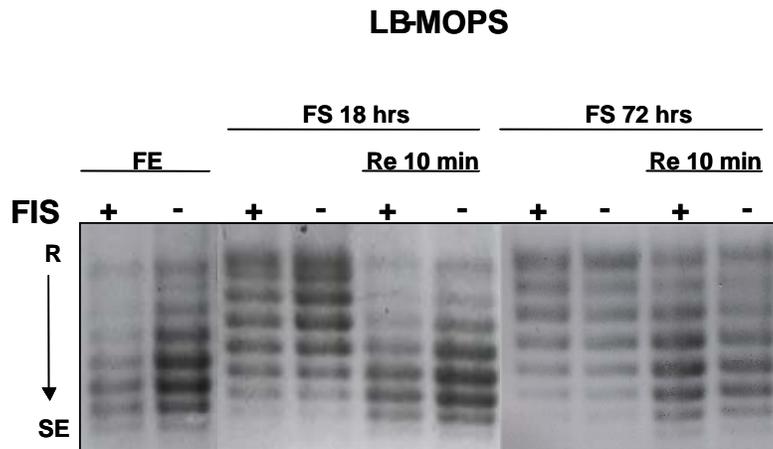


Figura 6. Cinética de los cambios del SE del pMS01 en células *fis+* y *fis-* en estrés nutricional

Estos resultados sugieren que la proteína reguladora FIS no tiene un papel importante en la regulación de los cambios de SE que se observan cuando las células se exponen a un estrés nutricional (fase estacionaria en LB-MOPS) y en la recuperación de este estrés al añadirse nuevamente nutrientes al cultivo.

Cinética de los cambios del SE en las cepas *fis+* y *fis-* en medio LB (estrés nutrimental y alcalino).

Los cambios en el nivel de SE del DNA de *E. coli* bajo estrés nutrimental y alcalino se estudiaron cultivando en medio LB las mismas cepas que en el caso anterior. En este medio se observa un nivel de SE del DNA muy similar en ambas cepas durante la FE, momento donde los plásmidos presentan un alto nivel de SE.

Mientras que las células de FS que permanecen únicamente bajo estrés nutrimental (LB-MOPS) presentan una relajación uniforme y gradual de los plásmidos (Fig.7), las células *fis+* y *fis-* que crecen en medio LB presentan una disminución de las formas del plásmido con SE intermedio después de que transcurren 18 o 72 horas en FS. Además de la población de plásmidos relajados, se hace notoria una subpoblación de plásmidos SE (Fig.8). Este tipo de distribución se conoce como distribución bimodal, la cual se mantiene hasta 48 horas después del inicio de la FS (datos no mostrados).

Una vez transcurrido el periodo de recuperación del crecimiento; es decir, 10 minutos después de la adición de nutrimentos al medio LB, tanto en las células *fis+* como en las *fis-* no se observa la recuperación del SE de los plásmidos. La distribución bimodal de los plásmidos en las células de FS de 18 y 48 horas se mantiene en ambas cepas (Fig. 8, FS de 18 horas; FS de 48 horas datos no mostrados).

Los resultados muestran además que cuando las células permanecen en estrés nutrimental y alcalino prolongado (72 horas), se presenta un patrón de distribución de topoisómeros de pMS01 diferencial entre las células *fis+* y las *fis-*. En la cepa *fis+* se presenta una población bimodal que permanece aún después del periodo de recuperación del crecimiento, mientras que en la cepa *fis-* se observa una disminución de la población de plásmidos relajados y la presencia de únicamente la población de plásmidos con alto nivel de SE (Fig. 8).

Esto pudo observarse en la cepa *fis-* tanto a las 72 horas en FS, como en el periodo de recuperación de 10 minutos de esta fase (Fig.8). Lo anterior sugiere que las cepas

fis⁻ podrían presentar una mayor sensibilidad al estrés alcalino, lo que les impide mantener la población de plásmidos relajados.

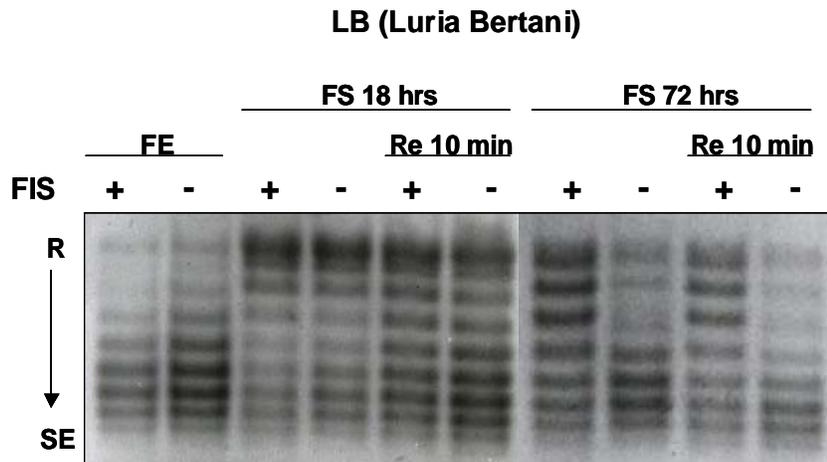


Figura 7. Cinética de los cambios del SE del pMS01 en células *fis*⁺ y *fis*⁻ en estrés nutrimental y alcalino

Efecto de un incremento repentino de pH en el nivel de SE del DNA durante la fase de crecimiento exponencial en células *fis*⁺ y *fis*⁻.

Para estudiar si la proteína FIS es importante en la regulación del SE durante la respuesta celular al estrés alcalino, se determinó el patrón de topoisómeros en células *fis*⁺ y *fis*⁻ en FE al aumentar repentinamente el pH. Estas células, en contraste con las células en FS prolongada en medio LB no están en estrés nutrimental.

Los resultados preliminares muestran que tanto en la cepa *fis*⁺ como en la *fis*⁻, el incremento de pH en el cultivo no modifica el nivel de SE. Los plásmidos en ambas

cepas en FE se encuentran SE; este SE se mantiene después de 5 y 10 min de la adición de 70 µl de NaOH a 2.5N al cultivo (Fig. 9). Esta cantidad de NaOH induce un aumento rápido del pH de un valor de 7 a uno de 8.8. Es importante confirmar este resultado preliminar, ya que un pH de 8.8 es lo suficientemente elevado como para inducir cambios en el SE y una respuesta celular para compensarlos.

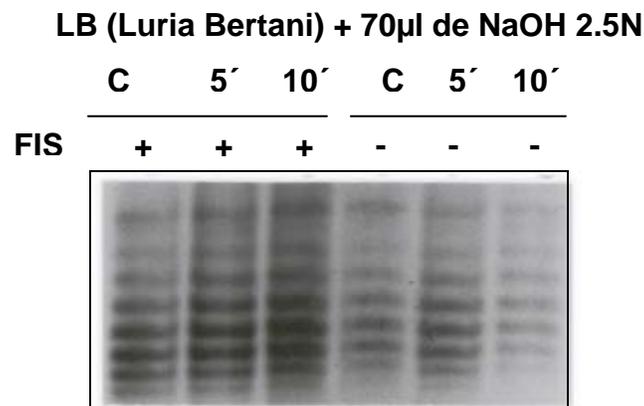


Figura. 8.- Cinética de los cambios del SE del pMS01 en células *fis+* y *fis-* en FE en estrés alcalino.

DISCUSIÓN

El interés de este trabajo se centró en estudiar la influencia de FIS en los cambios del nivel de SE del DNA en células *fis+* y *fis-* durante la FE, FS y al salir de esta fase al agregar nutrimentos al cultivo. El gene *fis* se encuentra clasificado dentro de los siete genes conocidos como “reguladores globales”, entre los que se encuentran *fis*, *h-ns*, *ihf*, *crp*, *arcA*, *lrp* y *fnr*. (Martínez- Antonio, A. y Collado, J., 2003), estos genes se definen de esta manera por estar involucrados en la regulación tanto positiva como negativa de muchos otros genes de *E. coli*. Por ejemplo, las proteínas encargadas de regular el SE (Girasa y TopI) tienen en común el regulador *fis*, quien regula positivamente la transcripción del gene de TopI y negativamente la transcripción de los genes de Girasa.

Como se ha mencionado, el nivel de SE del DNA cambia en respuesta a diversos estímulos del medio como el aumento o disminución en la temperatura, estrés oxidativo, carencia de nutrimentos, entre otros. En estos casos la expresión de los genes sensibles al SE cambia, tal es el caso del gene *fis*, que aumenta su transcripción inmediatamente después de adicionar nutrimentos al cultivo, pasando de 50 moléculas de FIS por célula en FS a 50,000 en fase temprana de crecimiento exponencial. Después de 90 minutos de la adición de nutrimentos al medio los niveles de FIS descienden de forma drástica (Johnson, R. et al.1992). Lo anterior muestra que FIS presenta una variación muy importante de su concentración intracelular y que ésta depende de la fase de crecimiento.

Se comprobó que FIS activa la transcripción del RNAm de *cspA*, que codifica para la principal proteína encargada de la respuesta a estrés de frío, y se observó que la delección de *fis*, disminuye hasta un 50% la cantidad intracelular de CspA. Esta disminución provoca que las células *fis* sean muy sensibles a este estrés y muestra que FIS tiene un papel importante en la respuesta al estrés inducido por bajas temperaturas (Pon, C. et al. 1999).

(Weinstein, D., et al. 2000), demostraron que las células *fis*- son extremadamente sensibles a un estrés inducido por peróxido de hidrógeno, al observar que el 85% de las células muere después de someterlas 30 minutos a un tratamiento con H₂O₂. Además estos autores demostraron que bajo condiciones de estrés oxidativo, la activación que ejerce *fis* sobre *topA*, es de suma importancia para mantener la viabilidad celular

Dichos antecedentes señalaban a *fis* como un gene que también podría ser importante en la regulación del metabolismo en otras condiciones de estrés celular, como es el caso del estrés nutricional y alcalino, ya que está involucrado en la regulación de los genes que codifican a las principales topoisomerasas encargadas de regular el SE.

En este trabajo el nivel de SE del DNA se estudió utilizando un plásmido reportero presente en células que se cultivaron en medio rico LB con y sin el amortiguador MOPS. Así mismo, este estudio tiene el objetivo de avanzar en el conocimiento del papel de FIS en la regulación del nivel de SE en células en estrés nutricional, y la combinación de estrés nutricional y alcalino a través del nivel de SE resultado de la regulación negativa que ejerce FIS en los genes *gyr* y positiva de *topA*.

Los resultados muestran que en las células *fis*+ y *fis*- que crecen en (LB-MOPS) de FE, los plásmidos se encuentran superenrollados, y se relajan al entrar a FS. A las 18 y 72 horas bajo estrés nutricional y durante la recuperación del crecimiento, ambas cepas presentan un nivel de SE de los plásmidos similar: el nivel de SE disminuye en FS y se recupera rápidamente después de añadir nutrientes al medio. Este resultado podría explicarse con los datos demostrados por Reyes, D., Contreras, G., et al. 2003, quienes encontraron que en cultivos neutros esta recuperación depende de la Girasa presente en las células en FS ya que esta recuperación se presenta aunque se inhiba la transcripción y traducción genética, lo que demuestra que no se requiere la síntesis *de novo* de Girasa. Es importante considerar que los datos previos publicados se

llevaron a cabo en medio LB-MOPS que previene a las células de permanecer en un estrés alcalino adicional al nutrimental que se da en el medio. Estos datos demuestran que en ausencia de un estrés adicional a la falta de nutrientes, la estrategia que lleva a cabo la célula para asegurar una recuperación rápida del SE al añadirse nutrimentos es proteger a la Girasa durante la FS de degradación e inactivación por oxidación. Así, la adición de nutrimentos incrementa el ATP celular y permite la rápida reactivación de la enzima.

En resumen, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, no se observó ninguna diferencia en el nivel de SE del plásmido cuando las células permanecen en medio LB-MOPS. Es decir, se encontró que la ausencia de FIS no modifica la regulación del SE del DNA cuando las células son sometidas únicamente a estrés nutrimental.

Los cambios en el SE del DNA las células *fis+* y *fis-* durante un estrés nutrimental y alcalino (LB) de 18 horas y en la respuesta a la adición de nutrimentos son similares. En la FE el DNA esta superenrollado y durante el estrés se presenta una distribución bimodal de topoisómeros relajados y superenrollados. Esta distribución se mantiene en ambas cepas en el periodo de recuperación. Se desconocen aún las causas de la formación de la distribución bimodal de topoisómeros. Sin embargo, una posible explicación podría deberse a lo encontrado por el grupo de Nyström, T. et al. 2003, que demostró que dentro de una misma población existen células de *E. coli*, que aún siendo viables, llegan a ser no cultivables después de permanecer un periodo de 24 horas en FS; es decir, estas células son incapaces de formar colonias. Lo anterior se observó al separar el cultivo celular por medio de una técnica de centrifugación por gradiente de densidad, que consigue diferenciar dos fracciones celulares. Los resultados mostraron que sólo un pequeño porcentaje de las células presentes en la fracción de alta densidad, fue apta para formar colonias, mientras que más del 90% de las células en la fracción de baja densidad, fue cultivable. Se encontró también que existe un mayor daño oxidativo en las proteínas de las células de la fracción no cultivable o de alta densidad. Estos datos podrían sugerir una explicación en la

formación de la distribución bimodal de los topoisómeros que se han observado en la FS de las células que crecen en medio LB, proponiendo que las células de la fracción de baja densidad, sean posiblemente las que presentan un grado de SE mayor del DNA, mientras que los plásmidos de las células de la fracción de alta densidad son los que se observan en el gel con menor nivel de SE, posiblemente debido a que presentan un mayor daño oxidativo.

Por otro lado, las células *fis*- que permanecen en estrés nutrimental y alcalino durante periodos prolongados (72 horas), así como durante la recuperación del crecimiento, presentan una disminución de la subpoblación de plásmidos relajados, mientras que permanece la de plásmidos SE. Estos datos podrían sugerir que la ausencia de *fis* no modifica la regulación del SE del DNA cuando las células son sometidas únicamente a estrés nutrimental, y que esto se puede explicar por la presencia de Girasa durante la FS. Además sugieren que los cambios observados en la cepa *fis*- son el resultado del estrés producido en las células por estrés nutrimental en conjunto con estrés de pH.

Con esto se demuestra que el pH que alcanza el medio de cultivo en FS, influye en las variaciones del nivel de SE del plásmido y la recuperación de este nivel es dependiente del grado de alcalinidad del medio donde se encuentren las cepas. Esto podría deberse a que las células que son sometidas a estrés de pH en conjunto con estrés nutrimental disminuyen la capacidad de modular su metabolismo de tal manera que el SE del DNA no se recupera aún tras el periodo de recuperación. Por lo tanto, la recuperación del SE depende del pH del medio.

(Reyes, D., Contreras, G., et al. 2003), encontraron que el nivel de transcripción de los genes *gyr*, incrementa progresivamente durante la fase de crecimiento exponencial hasta llegar a FS. Este incremento, no es inmediato, ya que después de la adición de medio nuevo a células de 18 horas en FS, la transcripción de *gyr* baja, y se incrementa sólo hasta después de 60 minutos, momento en donde se ha comprobado que la concentración celular de FIS llega a su máximo nivel, lo que sugiere que sea este el motivo por el cual se retrasa la transcripción de los genes de Girasa, hasta una

hora después de la adición de nutrientes al medio, ya que se sabe que FIS actúa inhibiendo la transcripción de los genes de Girasa.

Cuando las células además del estrés nutricional, se someten a un estrés alcalino, el nivel de SE se ve afectado principalmente en la cepa *fis-*, al observarse una notoria disminución de la cantidad de plásmidos relajados. Esto sólo sucede cuando las células han permanecido en fase estacionaria prolongada como es el caso de una fase estacionaria de 72 horas.

Para poder dilucidar la causa de la disminución de los plásmidos se estudió la influencia de un incremento repentino de pH en el nivel de SE del DNA en cepas *fis+* y *fis-* en la fase de crecimiento exponencial. Bajo estas condiciones, las células se someten únicamente a estrés alcalino, sin exponerse al estrés nutricional de la FS. Sin embargo, los datos preliminares obtenidos no muestran diferencias en el nivel de SE de ambas cepas.

Se ha demostrado que una gran cantidad de genes presentan cambios en el nivel de expresión a lo largo del ciclo de división celular (Nyström, T. et al. 2003). Uno de estos genes podría ser *fis*, que además de presentar cambios en el nivel de expresión a lo largo del ciclo de división celular, su ausencia puede hacer más susceptibles a las células de la subpoblación de alta densidad (no cultivables y oxidadas), a un estrés alcalino y nutricional prolongado es posible que los plásmidos relajados se encuentren precisamente en esta subpoblación.

Como se ha explicado anteriormente la transcripción y la traducción de *fis* ocurre dentro de los 60 minutos después de añadir nutrientes al medio; es decir, durante la fase temprana de crecimiento exponencial, lo que podría sugerir que en esta fase de crecimiento celular, la presencia de la proteína FIS sería muy importante en la regulación del SE, no así en FS, ya que la cepa *fis+* presenta únicamente una concentración de 50 moléculas por célula de la proteína FIS.

Por otro lado, es importante continuar los estudios sobre la influencia de un incremento repentino de pH en el nivel de SE del DNA en cepas *fis+* y *fis-* en la fase de crecimiento exponencial. En este caso, las células estarían sometidas únicamente a estrés alcalino, y se podría explorar si lo que se observa en las cepas *fis-* de 72 horas en FS, se debe al alcalinización del medio. Así mismo, sería importante estudiar si en periodos de recuperación del crecimiento a tiempos mayores de 90 minutos, y en periodos de recuperación del crecimiento, donde la cantidad de FIS llega a su máxima concentración celular se observa alguna diferencia en el nivel de SE de los plásmidos de las cepas *fis+* y *fis-*.

Podría esperarse, dado que está comprobada la represión que ejerce *fis* sobre los genes de Girasa, que en las cepas *fis-* la transcripción y traducción de esta enzima no se vea inhibida y se produjera un SE superior al óptimo, que podría afectar el crecimiento celular, y es posible que esta condición pueda explicar el retraso en el crecimiento de las células *fis-*.

Hasta aquí este trabajo demuestra que la proteína FIS, un regulador transcripcional de los genes de Girasa y Top I, no es esencial en la regulación del SE durante la respuesta a un estrés nutricional o a un estrés nutricional y alcalino de hasta 48 horas. Sin embargo, la proteína FIS podría tener un papel en la regulación del SE durante la respuesta celular a un estrés nutricional y alcalino de FS de más de 48 horas.

CONCLUSIONES

- Los cambios en el SE del DNA en las células *fis+* y *fis-* durante un estrés nutricional de 18 y 72 hrs y en la respuesta a la adición de nutrientes son similares. En la FE el DNA está superenrollado, durante el estrés el DNA se relaja, y al añadirse nutrientes al medio, el SE se recupera rápidamente.
- Los cambios en el SE del DNA las células *fis+* y *fis-* durante un estrés nutricional y alcalino de 18 hrs y en la respuesta a la adición de nutrientes son similares. En la FE el DNA está superenrollado y durante el estrés se presenta una distribución bimodal de topoisómeros relajados y superenrollados. Esta distribución se mantiene en ambas células en el periodo de recuperación.
- Las células *fis-* que permanecen en estrés nutricional y alcalino durante periodos prolongados (72 horas), así como durante la recuperación del crecimiento, presentan una disminución de la subpoblación de plásmidos relajados, mientras que permanece la de plásmidos SE.
- El SE del DNA durante la respuesta celular de las células *fis+* y *fis-* en FE a un estrés alcalino no cambia.

La proteína FIS, un regulador transcripcional de los genes de Girasa y Top I, no es esencial en la regulación del SE durante la respuesta a un estrés nutricional o a un estrés nutricional y alcalino de hasta 48 horas.

La proteína FIS podría tener un papel en la regulación del SE durante la respuesta celular a un estrés nutricional y alcalino durante FS de más de 48 horas.

PERSPECTIVAS

Determinar la influencia de un incremento repentino de pH en el nivel de SE del DNA en cepas *fis+* y *fis-* en la fase de crecimiento exponencial.

Posteriormente, se pretende llevar a cabo el estudio del SE en periodos de recuperación del crecimiento a tiempos mayores (60-90 min), donde FIS llega a su máxima concentración celular.

APÉNDICE

Medios de cultivo y soluciones:

Los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave a 110°C y 115 libras de presión durante 25 minutos.

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

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

Medio Luria Bertani (LB)

1.-Líquido

Extracto de levadura (Difco)	5g/L
Triptona (Difco)	10 g/L
NaCl (Baker)	10 g/L
Timina	20 µg/ml
PH	7.0

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

2.-Sólido

Extracto de levadura (Difco)	5g/L
Triptona (Difco)	10 g/L
NaCl (Baker)	10 g/L
Timina	20 µg/ml
Bacto-agar (Difco)	2%
PH	7.0

Medio TSS 2X.

NaCl (Baker) 1%

Triptona (Difco) 1%

Extracto de levadura (Difco) 0.5%

MgCl₂ (Merk) 50 mM

Polietilenglicol, PEG, 8000 (Sigma) 20%

Dimetil sulfóxido, DMSO (Merck) 10%

pH final 6.5

Medio de dilución

Sulfato de magnesio 10 mM

Solución I.

Dextrosa (Baker) 50mM

Etilen-diamino-tetraacetato de sodio EDTA (pH 8) 10 mM

Tris (Sigma) (pH 8) 25mM

Lisozima (Sigma) 5mg/ml

RNAasa (Sigma) 10 mg/ml

Solución II.

Dodecil sulfato de sodio, SDS (Sigma) 1%

NaOH (Baker) 0.2N

Solución III.

Acetato de potasio (Baker) 3M

Acido acético glacial (Baker) 11.5%

pH final 5.6

Colorante para DNA (6 X)

EDTA 1mM

Azul de bromofenol 0.25%

Xilen cianol 0.25%

Glicerol 30%

Solución amortiguadora TBE 1X

Trizma 90mM

Acido bórico 90 mM

EDTA 10 mM

pH final 8.3

Medio de cultivo mínimo: M9

NH₄Cl 1.0 gr

KH₂PO₄ 3.0 grs

Na₂HOP₄ 6.0 grs

NaCl 0.5 gr

Agar 20 grs

Agua A 1.0 Lt

(Para mayor facilidad preparar las sales en 500ml de agua y el agar en 500 ml.

Esterilizar y mezclar posteriormente).

Antes de vaciar, añadir:

MgSO₄ 1.0 ml de una solución al 25%.

Glucosa 0.2% Concentración final.

Aminoácidos:

Serina 20.0 µg/ml

Glicina 20.0 µg/ml

Metionina 20.0 µg/ml

Valina 20.0 µg/ml

Vitamina B1 0.16 ml de una solución al 0.1%

BIBLIOGRAFÍA

Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. & A. Ishihama. 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181 (20): 6361-6370.

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

Appleman, J.A., Ross, W., Salomon, J & R. Gourse. 1998. Activation of *Escherichia coli* rRNA transcription by FIS during a growth cycle. *American society for microbiology.* 180 (6): 1525-1532.

Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C. & R. Johnson. 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174 (24): 8043-8056.

Balke, V.& J. Gralla. 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169 (10): 4499-4506.

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

Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, O. & C. Pon. 1999. Massive presence of the *Escherichia coli* "major cold-shock protein" CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* 18 (6): 1653-1659.

Cashel, M., Gentry, D., Hernández, J. & D. Vinella. 1996. "The stringent response" in: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*, second edition. Neidhardt, F. C. (Ed.) ASM Press. Washington, D.C.

Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70 :369-413.

Cheung, K.J., Badarinarayana, V., Selinger, D.W., Janse, D. & G. Church. 2003. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. *Genome Research*. 13: 206-215.

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

Danchin, A. & M. Uzan. 1976. A rapid test for the *relA* mutation in *E. coli*. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 69 (3): 751-758.

Desnues, B., Cuny, C., Gregori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H., & T. Nyström. 2003. Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO reports*. 4 (4): 400-404.

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

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

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

Gómez, J., Baquero, F. & J. Blázquez. 1996. Cyclic AMP receptor protein positively controls *gyrA* transcription and alters DNA topology after nutritional upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178(11): 3331-3334.

González, G., Brigman, P. & R. Kahmann. 1996. FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 22 (1): 21-29.

Goulsbra, A.M., Edwards, C. & M. Gallagher. 2001. Surface hygiene monitored using reporter of *fis* in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 91: 104-109.

Huijun, Z., Xiangdong, W., Cabrera, J., Johnson, R. & D. Jun Jin. 2003. Fis stabilizes the interaction between RNA polymerase and the ribosomal promoter *rnbB* P1, leading to transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 278 (47): 47340-47349.

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

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

Keane, O. & C. Dorman. 2003. The *gyr* genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor. *Mol. Gen. Genomics.* 270: 56-65

Koch, C., Vandekerckhove J. & R. Khamann. 1988. *Escherichia coli* host factor for site-specific DNA inversion: cloning and characterization of the *fis* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4237-4241.

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

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

Lewis, R., Tsai, F. & B. Wigley. 1996. Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays.* 18 (8): 661-671.

Mallik, P., Pratt, T.S., Beach, M.B., Bradley, M.D., Undamatla, J. & R. Osuna. 2004. Growth phase-dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis P*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186 (1): 122-135.

Maniatis, T., Fritsch, E. & J. Sambrook. 1982. Alkaline lysis method. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y

Martinez, A. & J. Collado. 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 482-489.

Martinez, A. & R. Kolter. 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA binding protein DPS. *J. Bacteriol.* 179 (16): 5188-5194.

Maxwell, A. 1999. DNA gyrase as a drug target. *Biochem. Soc. Trans.* 27 (2): 48-53.

Metzger, S., Scheiber, G. & G. Glaser. 1989. Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264 (35): 21146-21152.

Nasser, W., Rochman, M. & G. Muskelishvili. 2001. CRP modulates *fis* transcription by alternate formation of activating and repressing nucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* 276 (21) 17878-17886.

Nasser, W., Rochman, M. & G. Muskelishvili. 2002. Transcriptional regulation of *fis* operon involves a module of multiple coupled promoters. *EMBO J.* 21: 715-724.

Ninnemann, O., Koch, C. & R. Kahmann. 1992. The *E. coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.* 11 (3): 1075–1083.

Rahmouni, A., & R. Wells. 1992. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J. Mol. Biol.* 223 (1): 131-144.

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

Reyes, Y., Contreras, G., Ramírez, J., Membrillo, J. & M.C. Gómez-Eichelmann. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* 185 (3): 1097-1100.

Richins, R. & W. Chen. 2001. Effects of FIS overexpression on cell growth rRNA synthesis, and ribosome content in *Escherichia coli*. *Biotech. Progress* 17: 252-257.

Roca, J. 2003. Topoisomerasas de ADN de tipo II. *Scien. Ame. Lat.* 17 (2):44-53.

Rochman, M., Blot, N., Dyachenko, M., Glaser, G., Travers, A. & G. Muskelishvili. 2004. Buffering of stable RNA promoter activity against DNA relaxation requires a far upstream sequence. *Mol. Microbiol.* 53 (1): 143-152.

Ross, W., Newlands, J., Grouse, R. & J.Thompson. 1990. *E. coli* FIS protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. EMBO J. 9 (11): 3733-3742.

Saito, H. & H. Kobayashi. 2003. Bacterial responses to alkaline stress. Science Progress. 86(4): 271-282.

Schneider, R., Travers, A., & G. Muskelishvilli. 1997. FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 26(3): 519-530.

Schneider, R., Travers, A. & G. Muskelishvilli. 2000. The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. Mol. Microbiol. 38 (1): 167-175.

Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T & G. Muskelishvilli. 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 34: 953- 964.

Spaeny-Dekking, L., Schlicher, E., Franken, K., & N. Goosen.1994. Gin mutants that can be suppressed by a Fis-Independent Mutation. J. Bacteriol. 177 (1): 222-228.

Travers, A., R. Shneider & G. Muskelishvilli. 2001. DNA supercoiling and transcription in *Escherihia coli*: The Fis connection. Biochimie 83: 213-217.

Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. 65: 635-692.

Weinstein, D., Elgrably, M. & S. Altuvia. 2000. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, Topoisomerase I and Fis. Mol. Microbiol. 35(6): 1413-1420.

Xu, J., & R. Johnson. 1995. Fis activates the RpoS-dependent stationary-phase expression of *proP* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol.177(18): 5222-5231.

Zechiedrich, E., Khodursky, S., Brachellier, R., Chen, D., Lilley, D. & N. Cozarelli. 2000. Roles of topoisomerases in mantaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 275 (11): 8103-8113.