



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización de la variabilidad temporal de la respuesta SOS en células individuales de *Escherichia coli* en presencia de antibióticos beta-lactámicos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Oscar Bruno Aguilar Luviano

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Rafael Peña Miller
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Cuernavaca, Morelos, México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el grupo de investigación del Dr. Rafael Peña Miller en el programa investigación de Biología de Sistemas y Biología Sintética, adscrito al Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Este proyecto se realizó con fondos PAPIIT con el título “El efecto de antibióticos en la modulación de las interacciones genéticas, regulatorias y ecológicas de comunidades bacterianas” con la clave del proyecto IN215920.

Este trabajo se realizó gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de becario 886346.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes formaron parte emocional e intelectual durante este periodo. Al Dr. Rafael Peña Miller y a la Dra. Ayari Fuentes Hernández por sus consejos y apoyo, así como ayudarme a enriquecer mi trayectoria. A mis compañeros de laboratorio, que también me transmitieron conocimientos que requerí para este proyecto. A las nuevas amistades que conocí en esta etapa y a las que se han mantenido con los años. A los investigadores implicados en la revisión y evaluación de este proyecto.

A mi madre, por su apoyo incondicional. A mis hermanos, por ser mi motivación.

ÍNDICE TEMARIO

Resumen.....	3
Introducción.....	5
• Evasión de los mecanismos de acción de los antibióticos.....	5
• Ampicilina y su mecanismo de acción.....	5
• Mecanismos de supervivencia a antibióticos.....	6
▪ Resistencia.....	7
▪ Persistencia.....	7
▪ Tolerancia.....	7
• Plasticidad morfológica tras la exposición al estrés.....	8
▪ Filamentación.....	8
• Regulación de la respuesta SOS.....	10
• Inducción de la respuesta SOS por antibióticos beta-lactámicos.....	11
Antecedentes.....	12
• Modulación temporal precisa en la respuesta SOS a nivel de células individuales.....	12
• ¿Portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia genera variabilidad en los tiempos de respuesta SOS?.....	13
Hipótesis.....	17
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
Materiales y métodos.....	19
• Cepas, medio y plásmidos.....	19
• Curvas dosis-respuesta.....	19
• Citometría de flujo y PCR cuantitativo.....	20
• Fabricación de dispositivos de microfluídica.....	21
• Experimentos de microfluídica.....	22
• Microscopia de lapso de tiempo.....	24
• Análisis de imágenes.....	25
Resultados y discusión.....	29
• Caracterización de niveles de resistencia a ampicilina.....	29

- Portar un plásmido multicopia produce heterogeneidad en la población.....29
- Una población heterogénea incrementa la resiliencia ante ambientes fluctuantes.....31
- Distribución de plásmidos se reestablece después de un pulso de antibiótico.....33
- Heterogeneidad fenotípica como estrategia que promueve la resiliencia en la población.....35
- Estimación de la distribución de tiempos de filamentación en respuesta a un pulso de ampicilina.....37
- Células portadoras de plásmidos multicopia presentan activación asíncrona de la respuesta SOS.....39

Conclusiones.....43

Perspectivas.....44

Bibliografía.....45

ÍNDICE FIGURAS

1. Mecanismo de acción de ampicilina.....	6
2. Mecanismos de supervivencia a antibióticos.....	8
3. Filamentación inducida por ampicilina en <i>Escherichia coli</i>	9
4. Regulación de la respuesta SOS.....	11
5. Respuesta SOS inducida por antibióticos beta-lactámicos.....	12
6. Modulación precisa temporal del sistema SOS.....	13
7. Heterogeneidad en los tiempos de detonación de la filamentación en células individuales.....	14
8. Distribución de plásmidos multicopia.....	15
9. Hipótesis.....	16
10. Dispositivo de microfluídos, <i>Mother machine</i>	21
11. Dispositivo de microfluídos, quimiostato.....	22
12. Estrategia experimental.....	24
13. Procesamiento de imágenes.....	28
14. Niveles de resistencia a ampicilina de las cepas analizadas.....	29
15. Heterogeneidad en el número de copias de <i>bla</i> TEM1.....	30
16. Una población heterogénea incrementa la resiliencia ante ambientes fluctuantes.....	32
17. Distribución de intensidad de fluorescencia de GFP.....	34
18. Heterogeneidad fenotípica como estrategia que promueve la resiliencia en la población.....	35
19. La filamentación disminuye la concentración de antibiótico intracelular.....	36
20. Eventos de filamentación a nivel de células individuales.....	38
21. Asincronía en los tiempos de activación de la respuesta SOS debido a plásmidos.....	40
22. Variabilidad en el número de copias de un gen de resistencia produce diferentes comportamientos en la población.....	41

ÍNDICE TABLA

1. Experimentos de microfluídica.....	42
---------------------------------------	----

RESUMEN

En este proyecto nos enfocamos en estudiar un fenómeno de tolerancia a antibióticos que resulta cuando *Escherichia coli* sobrevive a la acción de ampicilina adquiriendo un fenotipo alargado, un proceso conocido como filamentación (Justice et al. 2008b). El proceso de filamentación es dependiente de la respuesta SOS (Bos et al. 2015), una respuesta por la cual las bacterias pueden generar rápidamente tolerancia a antibióticos, y que consiste en un estado de reparación de ADN, mutagénesis y detención del ciclo celular.

Estudios previos han demostrado que la regulación del sistema SOS tiene una coordinación temporal definida, es decir, la activación de la respuesta SOS en células individuales tiene una distribución de tiempo estrecha (Friedman et al. 2005). Sin embargo, en un experimento previo realizado en nuestro laboratorio, se observó que el fenómeno de filamentación de *E. coli* a nivel de células individuales en presencia de ampicilina ocurría en una distribución de tiempo amplia, mostrando asincronía. La diferencia en nuestro experimento fue el uso de una población intrínsecamente heterogénea, una cepa portadora de un plásmido multicopia (~19 copias) no conjugativo, que contiene un marcador de fluorescente GFP (*GFPmut2*) y el gen de resistencia *bla*_{TEM-1}, que codifica para una beta-lactamasa que inactiva a ampicilina.

Entonces, si el sistema de respuesta SOS tiene una coordinación temporal precisa, ¿de dónde podría provenir la heterogeneidad que detona la respuesta SOS en diferentes tiempos y que conduce a una plasticidad fenotípica?, ¿cuál es el beneficio funcional de presentar variabilidad temporal en la filamentación?

Para responder estas preguntas, utilizamos un sistema de microfluídica que nos permitió estudiar a nivel de células individuales los eventos de filamentación a pulsos de ampicilina. En particular, el objetivo del proyecto fue evaluar si portar un gen de resistencia (*bla*_{TEM-1}) en un plásmido multicopia aumentaba la variabilidad en la respuesta SOS con respecto al mismo gen portado en el cromosoma.

Los resultados obtenidos sugieren que portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia genera asincronía en la respuesta SOS, obteniendo una distribución de tiempos de filamentación mayor en la cepa portadora del gen de resistencia en el plásmido multicopia en comparación con portarlo en el cromosoma. Esto nos permite concluir que, la variabilidad temporal en eventos de filamentación debida al plásmido multicopia es un mecanismo que aumenta la resiliencia en una población.

INTRODUCCIÓN

- **Evasión de los mecanismos de acción de los antibióticos**

Los antibióticos son moléculas con efectos antimicrobianos y, por consiguiente, son utilizados como fármacos para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, ya sea matando a las bacterias (un bactericida, como la penicilina) o inhibiendo su crecimiento (bacteriostático). Sin embargo, la evolución bacteriana ha desarrollado estrategias para sobrevivir a los antibióticos, lo cual es un problema actual, debido a que las bacterias evaden los mecanismos de acción de los antibióticos. Esto se ha favorecido debido al mal uso de los mismos, por ser recetados en exceso e incluso utilizados en grandes cantidades en la industria ganadera (Landers et al. 2012). Entonces, el estudio de los mecanismos de evasión de antibióticos es un tema de importancia a nivel global, y su comprensión es necesaria para generar nuevas estrategias que eviten la supervivencia bacteriana.

- **Ampicilina y su mecanismo de acción**

Los antibióticos se pueden clasificar en función de los blancos sobre los que actúan. En este trabajo nos centraremos en antibióticos beta-lactámicos, específicamente en ampicilina (de la familia de las penicilinas), que interfiere con la biosíntesis de peptidoglucano (PG) en *Escherichia coli*. El PG es una capa rígida que está alrededor de la membrana interna, y da forma a la bacteria. El PG está formado por polimerización de unidades de pentapéptidos-disacáridos en reacciones que involucran conexiones entre ambos tipos de subunidades, y el último paso de su biosíntesis es el entrecruzamiento de las cadenas lineales de PG a través de la formación de un enlace entre el C=O de la D-ala del PG recién sintetizado y el grupo -NH₂ libre del diaminoácido del PG aceptor, por una reacción conocida como transpeptidación (Katayama et al. 2003; Pisabarro et al. 1986). Tal reacción es catalizada por las transpeptidasas, también conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP, por sus siglas en inglés), debido a que son blanco de las penicilinas. La ampicilina actúa inhibiendo este paso, debido a que su anillo beta-lactámico mimetiza al sustrato original, la D-ala-D-ala, de la PBP3 (Kong, Schneper, and Mathee 2010). Cuando PBP3 utiliza a ampicilina como sustrato, la enzima se inactiva; dejando inconcluso el entrecruzamiento entre las cadenas de PG, provocando la lisis celular.

- **Mecanismos de supervivencia a antibióticos**

La capacidad de las bacterias para detectar y responder ante perturbaciones, causadas por ambientes hostiles y fluctuantes, es crucial para su supervivencia. Existen mecanismos que permiten sobrevivir a la acción de sustancias antimicrobianas:

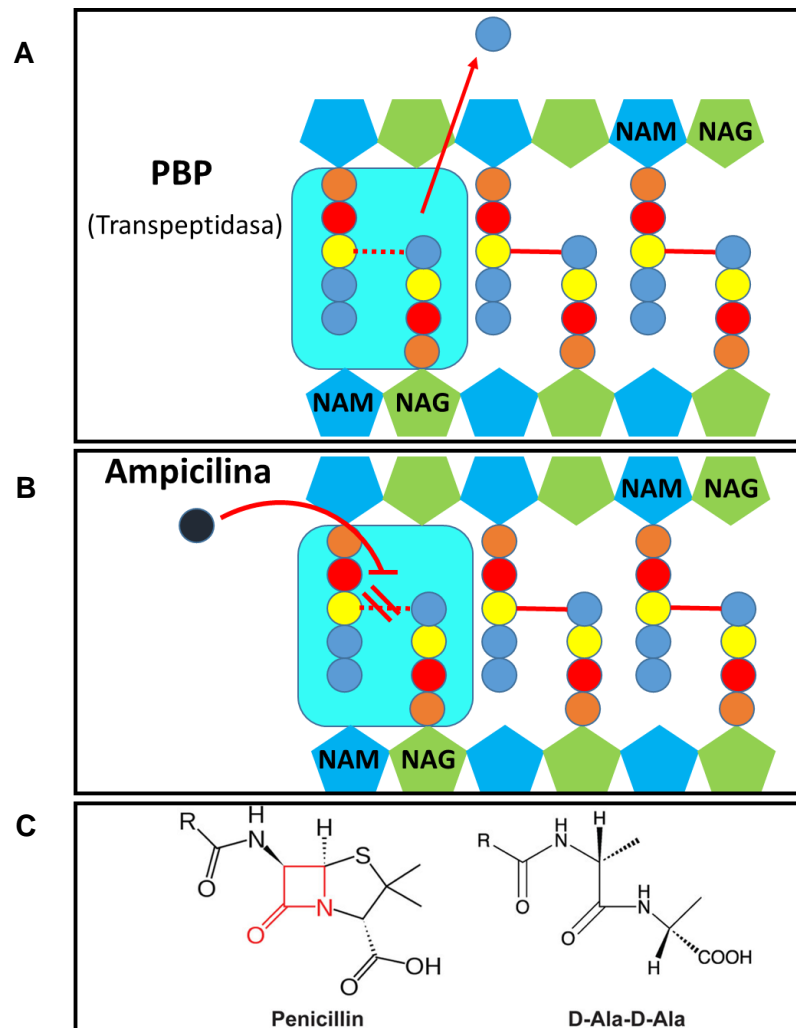


Figura 1. Mecanismo de acción de ampicilina. La pared de peptidoglicano, como su nombre lo indica, está conformada por péptidos (círculos) y glicanos (pentágonos). (A) Las subunidades nuevas se entrecruzan por medio de un enlace peptídico (línea roja) mediante una reacción llevada a cabo por una transpeptidasa (rectángulo azul), también conocida como PBP. (B) Sin embargo, en presencia de antibióticos beta-lactámicos, como ampicilina, se inhibe la actividad de la PBP. (C) Esto es debido a que el anillo beta-lactámico de las penicilinas mimetiza al sustrato original, y se une covalentemente a la enzima. NAM, ácido N-acetilmurámico. NAG, N-acetilglucosamina. Círculos azules, amarillos, rojos y naranjas son D-ala, L-lys, D-Glu y L-ala; respectivamente.

(a) Resistencia: Hay una concentración de antibiótico a la cual el crecimiento de las bacterias es inhibido, conocida como concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) (Andrews 2001). Sin embargo, las bacterias resistentes pueden contender ante el antibiótico a través de mutaciones en genes ya existentes, permitiendo su supervivencia a una dosis igual o mayor a la MIC de la cepa tipo silvestre, independientemente de la duración del tratamiento, y siendo un rasgo que se puede heredar a través de la segregación de material genético a células hijas (Brauner et al. 2016). Existen 4 mecanismos principales que generan resistencia a antibióticos (Baker-Austin et al. 2006): reducción de la permeabilidad de la membrana a los antibióticos (Delcour 2009), producción de enzimas que inactivan directamente al antibiótico (WRIGHT 2005), activación de bombas de flujo que bombean el antibiótico (Webber and Piddock 2003) y mutaciones en la diana celular (LAMBERT 2005). Un ejemplo relevante para este trabajo es la producción de la enzima beta-lactamasa que hidroliza el anillo beta-lactámico de la ampicilina, inactivándola (ABRAHAM and CHAIN 1940).

(b) Persistencia: Las bacterias persistentes son una fracción de una población microbiana genéticamente homogénea que pueden sobrevivir a la exposición a antibióticos al permanecer inactivas, es decir, permanecen en un estado latente (Brauner et al. 2016). Entre sus características están:

- (i) Cese de la actividad celular (latencia).
- (ii) No hay crecimiento en presencia o ausencia de antibiótico.
- (iii) El fenotipo de persistencia no es heredable. La progenie de las bacterias persistentes es susceptible al antibiótico.
- (iv) Las células regresan rápidamente al crecimiento de la cepa tipo salvaje una vez que se elimina la presión del antibiótico. Lo cual vuelve a las bacterias que previamente eran persistentes, en susceptibles, al enfrentarse nuevamente al antibiótico.
- (v) La persistencia es un rasgo de heterogeneidad preexistente a la exposición de antibiótico. Siendo importante en la adaptación de entornos fluctuantes.

(c) Tolerancia: Las poblaciones bacterianas tolerantes pueden sobrevivir a la exposición a altas concentraciones de antibiótico, sin modificación de su MIC, al disminuir la velocidad de procesos bacterianos esenciales (Brauner et al. 2016). A diferencia de las cepas resistentes, en las tolerantes se requiere de una mayor duración de la exposición al antibiótico para lograr tener un efecto (Brauner et al. 2016).

La tolerancia a los beta-lactámicos puede ocurrir cuando las bacterias crecen lentamente, lo cual se asocia con un montaje de la pared celular más lento.

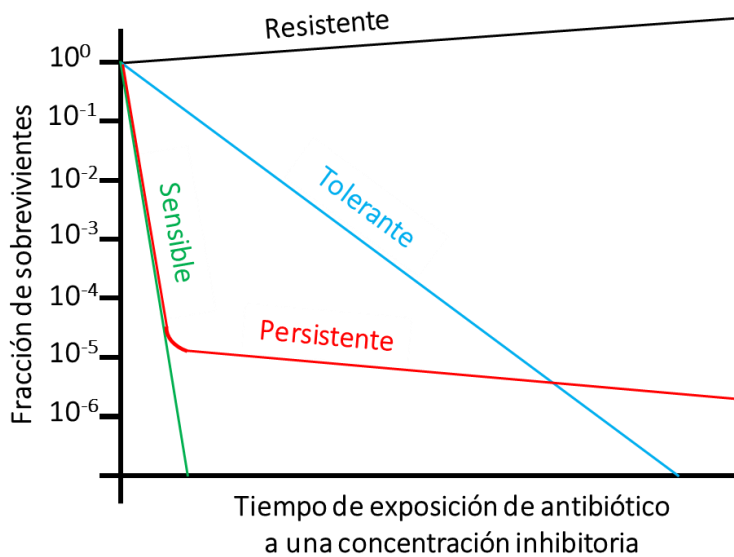


Figura 2. Mecanismos de supervivencia a antibióticos. Se muestra una gráfica del comportamiento de poblaciones bacterianas resistentes, persistentes y tolerantes, en comparación con una población susceptible a un antibiótico.

- **Plasticidad fenotípica tras la exposición al estrés**

Los mecanismos mencionados anteriormente no son los únicos por los cuales las bacterias contienden ante una perturbación. Un mecanismo general de respuesta a estrés ante distintas perturbaciones (temperatura, pH, presión osmótica, inanición, antibióticos, etc.) es el cambio de forma y tamaño de las bacterias, un proceso conocido como plasticidad fenotípica, que es una respuesta activa para contrarrestar las tensiones ambientales y promover la supervivencia en nuevos entornos (Justice et al. 2008b).

Las bacterias responden a una variedad de tensiones externas activando cascadas de señalización que conducen directa o indirectamente a una alteración de la morfología.

(a) Filamentación

Las bacterias se alargan y se dividen, pero en circunstancias estresantes pueden interrumpir el proceso de división celular y dar lugar a células de una mayor longitud.

Este es un proceso conocido como filamentación, por el cual las células hacen la transición a células largas que contienen múltiples cromosomas. Estas células filamentosas pueden alcanzar una longitud de hasta 70 μm como se describe en *E. coli* uropatógena (UPEC) (Justice et al. 2004).

La filamentación es un mecanismo de tolerancia a ampicilina, por tanto, se requiere de la presencia del antibiótico más tiempo para lograr el mismo efecto (**Figura 3**) (TUOMANEN et al. 1986).

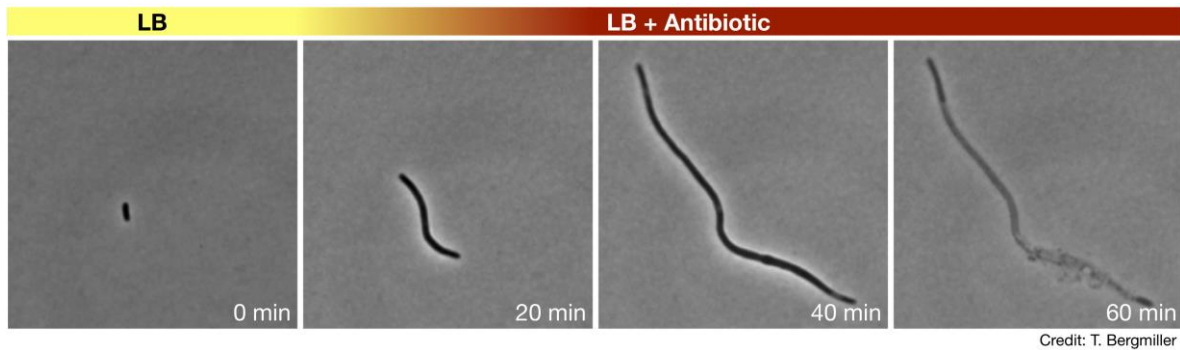


Figura 3. Filamentación inducida por ampicilina en *Escherichia coli*. Tras la exposición al antibiótico, ampicilina, *E. coli* adquiere un fenotipo alargado debido a la interrupción de la división celular desde la formación del septo. Al no retirar el antibiótico, eventualmente se produce la lisis celular.

La filamentación es consecuencia de un daño celular que no se logró contrarrestar por otros mecanismos, dando así una ventana de tiempo mayor a la bacteria para tratar de mitigar la tensión (Justice et al. 2008a). Entonces, la detección a tiempo del daño es clave para aumentar la probabilidad de supervivencia.

El fenómeno de filamentación se desencadena por la interrupción del ensamblaje del septo, que está conformado principalmente por las proteínas Fts ("*Filament forming Temperature Sensitive*"): FtsA, FtsB, FtsI, FtsK, FtsL, FtsN, FtsQ, FtsW, FtsZ y ZipA. El ensamblaje del septo, maduración y posterior división celular en *E. coli* se logra mediante la acción coordinada de los componentes antes mencionados (Xiao and Goley 2016).

Sin embargo, es a través de FtsI que se interrumpe la formación del septo. FtsI también conocida como PBP3, el blanco de la ampicilina (Chung et al. 2009).

La cascada de señalización previa que detona el proceso de filamentación es una respuesta ampliamente estudiada, conocida como respuesta SOS, por la cual las bacterias pueden generar rápidamente tolerancia a antibióticos. Además, se sabe que los antibióticos beta-lactámicos inducen la respuesta SOS (Miller et al. 2004).

- **Regulación de la respuesta SOS**

La respuesta SOS consiste en un estado de reparación de ADN, mutagénesis y detención del ciclo celular (Simmons et al. 2008). Cada uno de los mecanismos está regulado, presentándose únicamente cuando una situación de estrés debe ser mitigada. La respuesta SOS se regula de la siguiente manera:

- a) Respuesta SOS sin estrés

En condiciones normales, los genes SOS están regulados negativamente por los dímeros de la proteína represora LexA, la cual se une a la secuencia consenso de 20 pb (la caja SOS) en la región del operador para esos genes.

- b) Respuesta SOS ante un estrés

En condiciones de daño al ADN o interrupción de la replicación (Miller et al. 2004), se produce la activación de los genes SOS por una acumulación de regiones de ADN monocatenario generadas en las horquillas de replicación, donde se bloquea la acción del ADN polimerasa. RecA forma un filamento alrededor de las regiones de ADN monocatenario de una manera dependiente de ATP, y se activa. La forma activa de RecA interactúa con el represor LexA para facilitar su auto-escisión (Baharoglu and Mazel 2014).

Una vez que el represor LexA disminuye, los genes SOS se expresan de acuerdo con la afinidad de LexA por su caja SOS. Los operadores que se unen débilmente a LexA son los primeros en expresarse completamente (Janion 2008).

Si existe daño al ADN, la respuesta SOS cuenta con mecanismos para la reparación (recombinación homóloga y reparación por escisión de nucleótidos) del mismo, así como recurrir a mutagénesis (translesión) como última estrategia (de Laat, Jaspers, and Hoeijmakers 1999).

En el caso de la interrupción de la replicación (Miller et al. 2004), la respuesta SOS induce la detención de la división celular, ocasionando la filamentación. Esto se debe a un mecanismo conocido como oclusión nucleoide, el cual protege la integridad del genoma y evita la formación del septo (Wu and Errington 2012). Un jugador clave en este proceso es el inhibidor SulA. SulA detiene la división celular mediante la unión a FtsZ, la proteína iniciadora de este proceso (Schoemaker, Gayda, and Markovitz 1984).

Todos los niveles de la respuesta SOS están bajo control estricto, por lo tanto, el mismo gen *lexA* está regulado por la misma respuesta SOS. La inducción de SOS se revierte cuando se reparan los daños. Esto se debe a la desaparición del filamento RecA y permite que las moléculas de LexA recién sintetizadas se unan a los promotores SOS (Simmons et al. 2008).

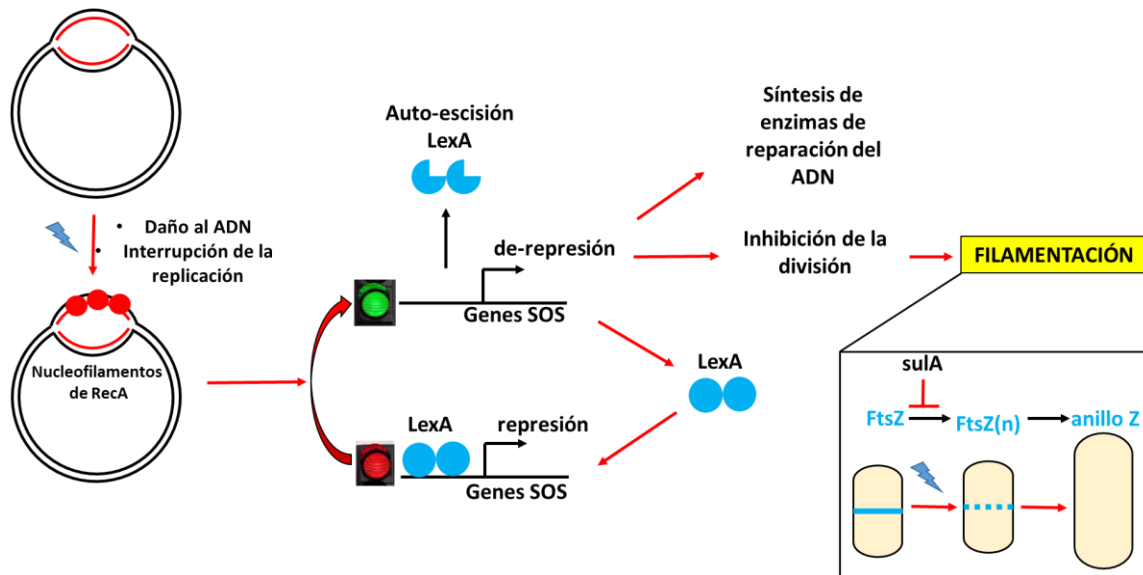


Figura 4. Regulación de la respuesta SOS. Tras el daño al ADN o la interrupción de la replicación por exposición a estrés (por ejemplo, ampicilina), se recluta a la proteína RecA que inicia la activación de la respuesta SOS. Esto desencadena la expresión de los genes SOS debido a la auto-escisión del represor LexA. La respuesta SOS se caracteriza por la reparación al ADN y la detención de la división celular. Particularmente, la división de inhibe impidiendo la polimerización de FtsZ por la interacción con Sula.

- **Inducción de la respuesta SOS por antibióticos beta-lactámicos**

La respuesta SOS es inducida por antibióticos beta-lactámicos (Miller et al. 2004). La ampicilina interrumpe la integridad de la pared celular por medio de su interacción con PBP3, inactivándola e induciendo la respuesta SOS en *E. coli* a través de un sistema de transducción de señales de dos componentes, conocido como DpiBA.

El deterioro de la pared celular funciona como estímulo en la superficie celular que conduce a la auto-fosforilación del sensor quinasa DpiB, que posteriormente fosforila a la proteína efectora DpiA (Miller et al. 2004). DpiA regula la transcripción, replicación y segregación del ADN mediante su capacidad poco común para unirse a secuencias ricas en AT en los orígenes de replicación. La interacción de DpiA con los orígenes de replicación, compite con la unión de las proteínas de replicación DnaA y DnaB (Miller et al. 2004), y de esta manera desencadenando la respuesta

SOS por interrupción de la replicación, por consiguiente, se inhibe temporalmente la división celular durante la exposición al antibiótico (**figura 5**).

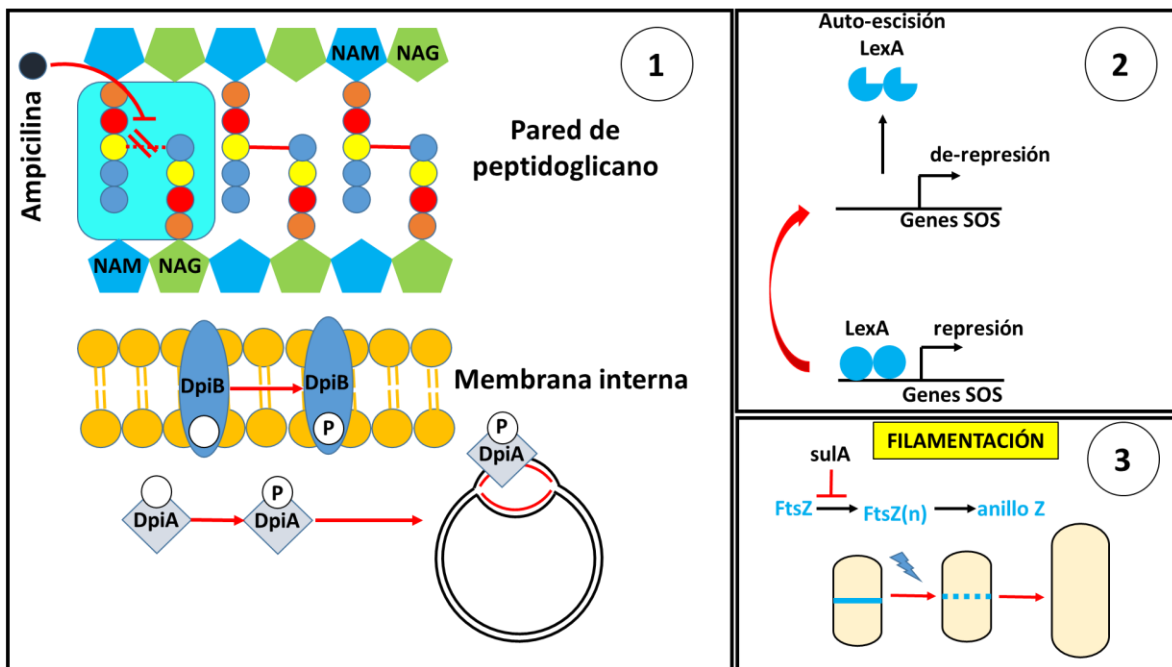


Figura 5. Respuesta SOS inducida por antibióticos beta-lactámicos. (1) En presencia de ampicilina, el daño a la pared de péptidoglicano es censado por un sistema de dos componentes llamado DpiBA. DpiB es una proteína que se auto-fosforila tras el deterioro en la pared, y posteriormente fosforila a la proteína efectora DpiA. DpiA se une a los orígenes de replicación, deteniendo el proceso de replicación. (2) Lo anterior desencadena la activación de la respuesta SOS y, (3) el proceso de filamentación. NAM, ácido N-acetilmurámico. NAG, N-acetilglucosamina. Círculos azules, amarillos, rojos y naranjas son D-ala, L-lys, D-Glu y L-ala; respectivamente.

ANTECEDENTES

- **Modulación temporal precisa en la respuesta SOS a nivel de células individuales**

Estudios previos han demostrado que la regulación de la respuesta SOS tiene una coordinación temporal precisa, es decir, la activación de la respuesta SOS a nivel de células tiene una distribución de tiempo estrecha (Friedman et al. 2005). Mostrándose que la respuesta es sincronizada a nivel de expresión génica. En la **figura 6** se observa la modulación del gen *recA*, una vez activada la respuesta SOS tras un estrés. Se ha demostrado mantener esta regulación precisa para otros genes

participes de la respuesta. Sin embargo, en dicho estudio no se consideró una población heterogénea.

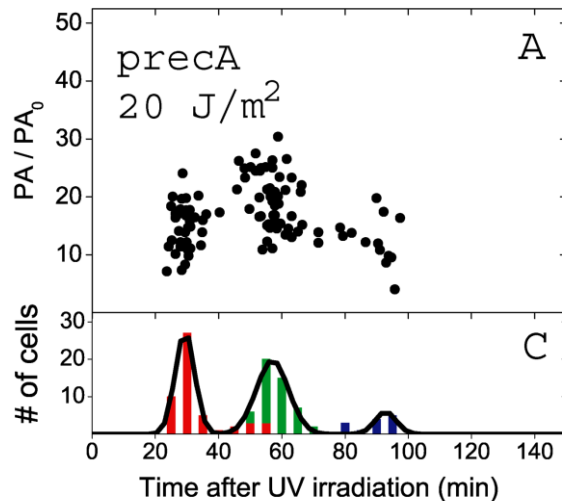


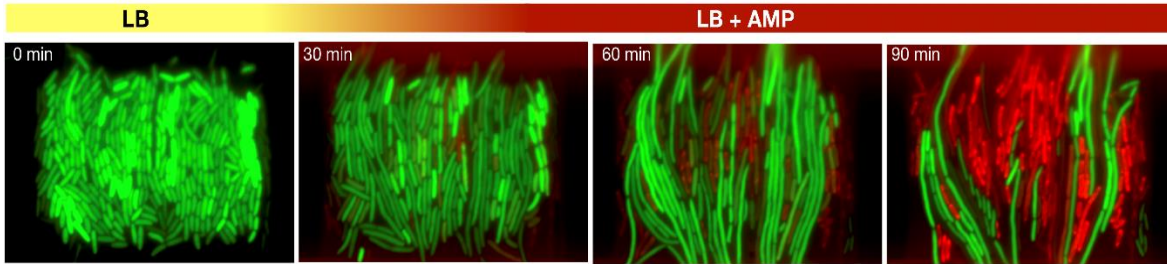
Figura 6. Modulación precisa temporal del sistema SOS. Se observa la actividad promotora (PA) del gen *recA* utilizando una fusión fluorescente (*gfpmut2*), después de la activación del sistema SOS por medio de irradiación con luz UV (20 J/m²). El número de picos aumenta, mientras que su amplitud alcanza una saturación, a medida que aumenta el nivel de daño. Cada punto representa una célula individual. La sincronización es muy precisa a nivel de

células individuales. PA₀ es PA promedio de las células no inducidas. Los colores rojo, verde y azul, son el primer, segundo y tercer pico de activación de *recA*, respectivamente. Figura tomada y modificada de Friedman et al. 2005.

- **¿Portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia genera variabilidad en los tiempos de respuesta SOS?**

Interesantemente, a pesar de que el trabajo anterior demostró una sincronía en la activación de la respuesta SOS, en un experimento realizado en nuestro laboratorio se observó que los eventos de filamentación en *E. coli* tras la exposición a ampicilina ocurrían en una distribución de tiempo amplia, mostrando asincronía (**Figura 7**).

La particularidad en nuestro experimento fue el uso de una población portadora de un plásmido multicopia (~19 copias/célula) no conjugativo, que contiene un marcador de fluorescente GFP (*GFPmut2*) y el gen de resistencia *bla*_{TEM-1}, que codifica para una beta-lactamasa que inactiva a ampicilina (San Millan et al. 2016).



Crédito: JCR Hernández

Figura 7. Heterogeneidad en los tiempos de detonación de la filamentación en células individuales. Experimento de microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo en un dispositivo de microfluídica. Se observa el fenómeno de filamentación en una distribución de tiempo amplia en células individuales de *E. coli* portadora de un plásmido multicopia (~19 copias/célula). El plásmido porta el gen de resistencia *bla_{TEM1}* que codifica para una beta-lactamasa que degrada ampicilina, así como el gen *gfp*. En rojo se observa la entrada del medio con ampicilina (AMP), como factor de estrés que desencadena la filamentación. Las bacterias que se tiñen de rojo han presentado lisis celular.

Entonces, si el sistema de respuesta SOS tiene una coordinación temporal precisa, ¿de dónde podría provenir la heterogeneidad que detona la respuesta SOS en diferentes momentos y que conduce a una plasticidad fenotípica?, ¿cuál es el beneficio funcional de presentar variabilidad temporal en la filamentación?

Nosotros proponemos que portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia genera la heterogeneidad fenotípica ante un estrés: células resistentes que no sufren daño, células susceptibles y células que forman filamentos para mitigar la tensión ambiental.

Una población genéticamente idéntica presenta una distribución de fenotipos en el tiempo debido a la diversidad de perfiles de resistencia generados como consecuencia de la variabilidad en el número de copias de un gen de resistencia portado en un plasmado multicopia. La variabilidad es consecuencia de la naturaleza estocástica de la dinámica de segregación y replicación del plásmido multicopia que produce una distribución del número de copias/célula en la población y, por lo tanto, una expresión heterogénea de genes portados en estos plásmidos (**Figura 8**) (Million-Weaver and Camps 2014).

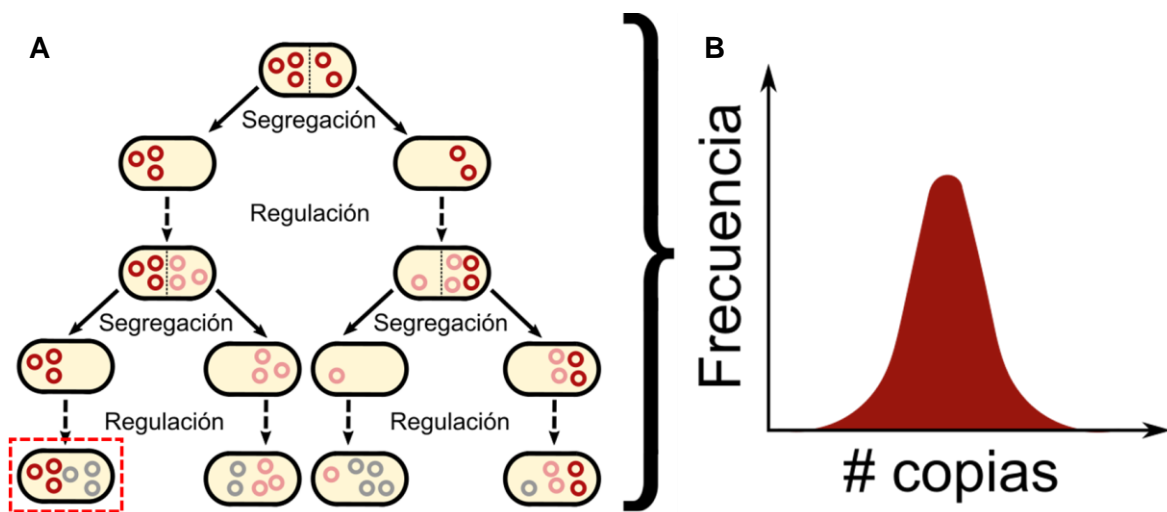


Figura 8. Distribución de plásmidos multicopia. (A) El sistema de distribución de plásmido multicopia se basa en segregación aleatoria y la regulación del número de copias. Sin embargo, el sistema no está exento de errores, generando células con diferente número de copias (rectángulo rojo). (B) Histograma de frecuencias del número de copias del plásmido en la población.

Entre los beneficios de portar genes en plásmidos en comparación con el cromosoma están:

- (i) Permite la transferencia horizontal de genes, inclusive entre células de distintas especies (San Millan et al. 2016).
- (ii) Portar un gen en un plásmido multicopia produce niveles más altos de expresión, y esto puede ser beneficioso para el huésped (Latorre et al. 2005).
- (iii) Plásmidos multicopia pueden acelerar la evolución de los genes debido al aumento de copias del gen por célula (Couce, Rodríguez-Rojas, and Blázquez 2015; Rodríguez-Beltrán et al. 2018).

En este proyecto, argumentamos que, además de los beneficios antes mencionados, portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia puede producir heterogeneidad en los perfiles de susceptibilidad de la población y, por consiguiente, la detonación asincrónica de la respuesta SOS a nivel de células individuales.

Lo anterior, aumentaría la resiliencia de la población, es decir, la capacidad de una población para superar una situación de estrés causada, en este caso, por un antibiótico. Una vez que el estrés cese, aquellas bacterias que sobrevivieron tendrán la capacidad de repoblar el medio. Por lo tanto, la heterogeneidad fenotípica es un

mecanismo de supervivencia que atenúa el impacto que tiene una condición de estrés.

En concreto, el objetivo del proyecto fue evaluar si portar un gen de resistencia (bla_{TEM-1}) en un plásmido multicopia aumentaba la variabilidad en la respuesta SOS con respecto al mismo gen portado en el cromosoma. Para esto, utilizamos un sistema de microfluídica que nos permitió estudiar a nivel de células individuales los eventos de filamentación a pulsos de ampicilina.

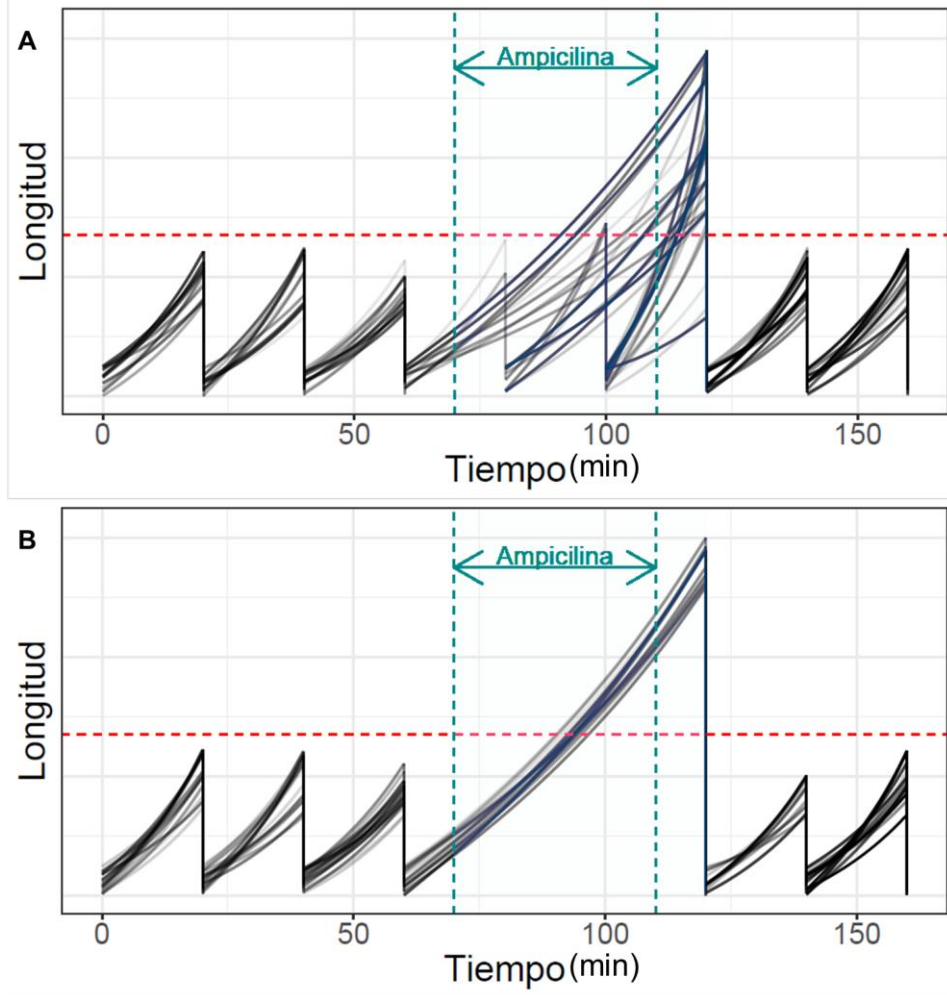


Figura 9. Hipótesis. La figura se describe en la siguiente página.

HIPÓTESIS.

- Portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia produce variabilidad en los perfiles de susceptibilidad y, por consiguiente, asincronía en el sistema de respuesta de SOS en la población (**Figura 9**).

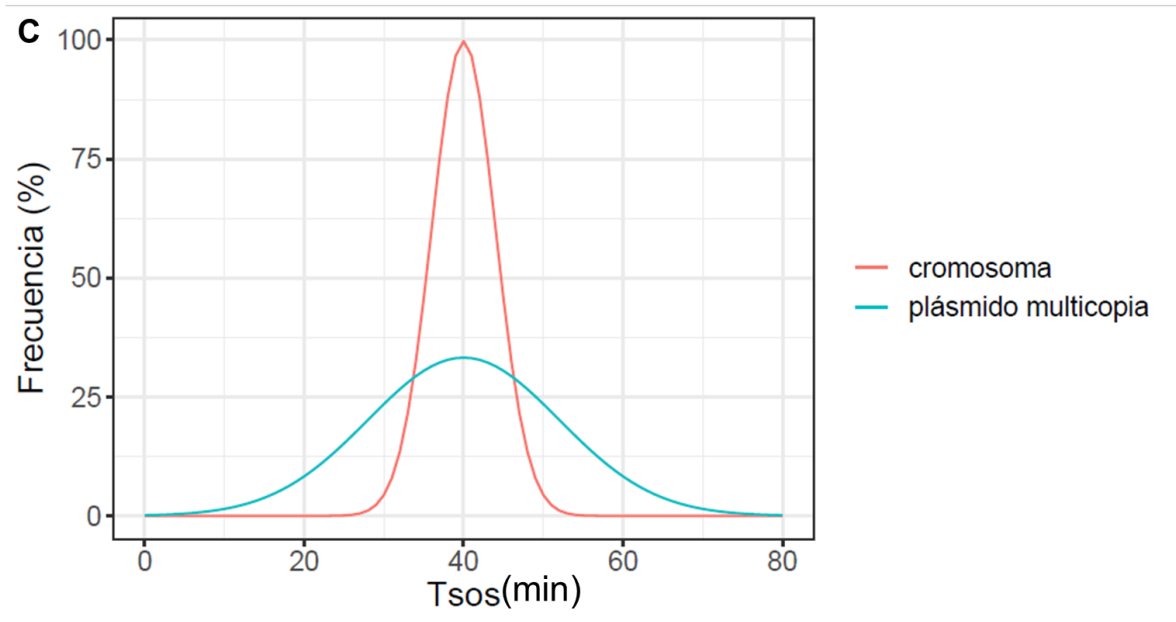


Figura 9. Hipótesis. Representación gráfica de nuestra hipótesis, no son datos reales. Se muestra el comportamiento esperado ante la presencia de antibiótico en una población heterogénea que portan el gen de resistencia en un plásmido multicopia (A) en comparación con una población homogénea que porta el mismo gen el cromosoma (B). Cada línea representa una bacteria en el tiempo. La línea roja es el umbral a partir del cual se considera un evento de filamentación. (C) Proponemos que, portar el gen de resistencia en un plásmido multicopia genera asincronía en la respuesta SOS y, por consiguiente, una distribución de tiempo más amplia en los eventos de filamentación (Tsos) ante el estrés.

OBJETIVO GENERAL.

- Correlacionar heterogeneidad en la expresión de *bla*_{TEM-1} con la variabilidad en los tiempos de filamentación, tanto en poblaciones que portan el gen de resistencia en el cromosoma, como en un plásmido multicopia no-conjugativo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Caracterizar la concentración mínima inhibitoria de las cepas de *E. coli* MG1655/pBGT1 y MG1655:*bla*_{TEM-1} por medio de curvas dosis-respuesta.
- Obtener series de tiempo de longitud de las células, de esta manera, identificando eventos de filamentación.
- Identificar eventos de división para estimar la tasa de duplicación.
- Identificar eventos de muerte celular.
- Cuantificar GFP en función del tiempo/tratamiento, correlacionando el número de copias con el fitness (tasa de duplicación, probabilidad de supervivencia).

MATERIALES Y MÉTODOS.

- **Cepas, medio y plásmido**

Las cepas de *E.coli* utilizadas en este trabajo son: MG1655 (cepa silvestre), MG1655::*bla*_{TEM-1} (cepa con una copia en el cromosoma del gen *bla*_{TEM-1} y *GFPmut2*) y MG1655/pBGT-1 (portadora de un plásmido multicopia con ~19 copias del gen *bla*_{TEM-1} y *GFPmut2*).

El plásmido portado por la cepa de este estudio es derivado del plásmido pBGT R164S que se han utilizado en publicaciones anteriores para reconstruir la evolución de Caz mediada por plásmidos de resistencia. El plásmido pBGT-1 porta el gen *bla*_{TEM-1}, el gen *GFPmut2* bajo el control de un promotor que es inducible por L-arabinosa, un gen que codifica para el represor de dicho promotor (*araC*), y una acetiltransferasa resistente a cloranfenicol.

Se usó medio LB líquido (20 g/L) para las curvas dosis-respuesta, y LB líquido (20 g/L) + L-arabinosa al 0.5% para los experimentos de microfluídica. Las soluciones stock de ampicilina se elaboraron a partir de reservas de polvo (Sigma-Aldrich) a 100 mg/ml en agua, y se almacenaron a -20°C. Las diluciones posteriores se realizaron a partir de estos stocks y se mantuvieron a 4°C.

- **Curvas dosis-respuesta**

Se tomaron bacterias de una colonia y se cultivaron en medio LB durante toda la noche en una incubadora con agitador (200 rpm) a 30°C. Posteriormente, se tomaron 150 microlitros del cultivo que se transfirieron a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Con un replicador de 96 pines se tomó una muestra del volumen de la placa antes mencionada, y que se transfirió a una nueva placa que contenía LB fresco y ampicilina.

Por medio de un lector de placas de microtitulación se midieron densidades ópticas de las cepas cada 20 min por 24 horas a 630 nm. La placa dentro del lector se incubó a 30°C para cultivar las bacterias, y se agitó de manera lineal y continua antes de tomar cada medición.

En cada cinética se realizaron al menos 4 réplicas de cada cepa. Las series de tiempo de las densidades ópticas y la fluorescencia se importaron al lenguaje de programación R para analizarse y restar el fondo, es decir, restar la medición de pozos en blanco que solo contenían LB.

- **Citometría de flujo y PCR cuantitavo**

Se tomaron bacterias MG1655/pBGT-1 (portadora de un plásmido multicopia con ~19 copias del gen *bla_{TEM-1}*) de una colonia y se cultivaron en medio LB durante toda la noche en una incubadora con agitador (200 rpm) a 30°C. Posteriormente, realizamos una clasificación de la población de acuerdo a su intensidad de fluorescencia mediante el equipo FACSARIA (SORTER) del LabNalCit, seleccionando diferentes fracciones, regiones de baja, media y alta intensidad de fluorescencia para GFP en la población.

A partir de las regiones separadas de la población, se determinó el número de copias de pBGT por PCR cuantitativo (qPCR). La obtención de la muestra de ADN se realizó de la siguiente manera:

- a) Se centrifugo 100 ul de bacterias que se cultivaron en medio LB toda la noche durante 1 min a 16,000 g, y se resuspendió en el mismo volumen de agua miliQ (libre de DNAsas y RNAsas).
- b) La muestra se dejó hervir durante 10 min a 95°C.
- c) Se centrifugo durante 30 segundos a 16,000 g, y se usó el sobrenadante.

Con la primera qPCR se calculó la eficacia de la reacción para pBGT (pBGT-F: ACATTTCCGTGTCGCCCTT, pBGT-R: CACTCGTGCACCCCACTGA, tamaño del amplicon: 115bp, eficacia: 106.47%, $R^2=0.99$) y el gen de monocopia cromosómica *dxs* (*dxs*-F: CGAGAA ACTGGCGATCCTTA, *dxs*-R: CTTTCATCAAGCGGTTTCACA, tamaño del amplicon: 113bp, eficacia: 116.73%, $R^2=0.98$), realizando una curva estándar de la reacción mediante 7 diluciones con un factor de dilución 1/8 por triplicado en 7500 Real-Time PCR System. Usamos el gen *dxs* para comparar la relación del plásmido y el ADN cromosomal.

Las qPCRs se realizaron de acuerdo como describe en (Millan et al. 2016), usando el protocolo recomendado en el kit SYBR Select Master Mix.

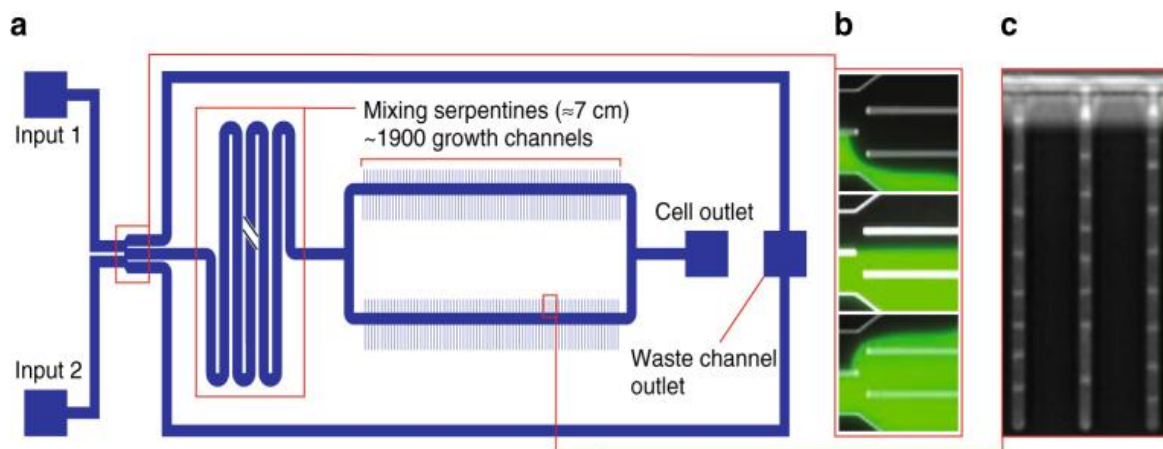
El número de copias se calculó usando la fórmula:

$$cn = \frac{(1 + Ec)^{Ctc}}{(1 + Ep)^{Ctp}}$$

Donde *cn* es el número de copias del plásmido por cromosoma. *Ec* y *Ep* son la eficiencia de la reacción del gen cromosómico y del gen del plásmido, respectivamente. *Ctc* y *Ctp* son los *threshold cycle* del gen cromosómico y plasmídico.

- **Fabricación de dispositivos de microfluídica**

Los dispositivos de microfluídica, se fabricaron de acuerdo con el procedimiento publicado anteriormente (Ramalho et al. 2016). En el laboratorio contamos con los moldes tanto para el dispositivo *Mother machine* (**Figura 5**) como el quimiostato (**Figura 6**). Las réplicas se crearon a partir de estos moldes que tienen los patrones de los canales del dispositivo, vertiendo PDMS (polidimetilsiloxano) en el respectivo molde y solidificando el polímero a 80°C durante 2 horas. Los puertos de entradas y salidas, se crearon utilizando agujas dispensadoras. El dispositivo de PDMS se limpió con cinta mágica para eliminar cualquier residuo del dispositivo. Finalmente, el dispositivo se unió a un cubreobjetos de vidrio mediante tratamiento con plasma.



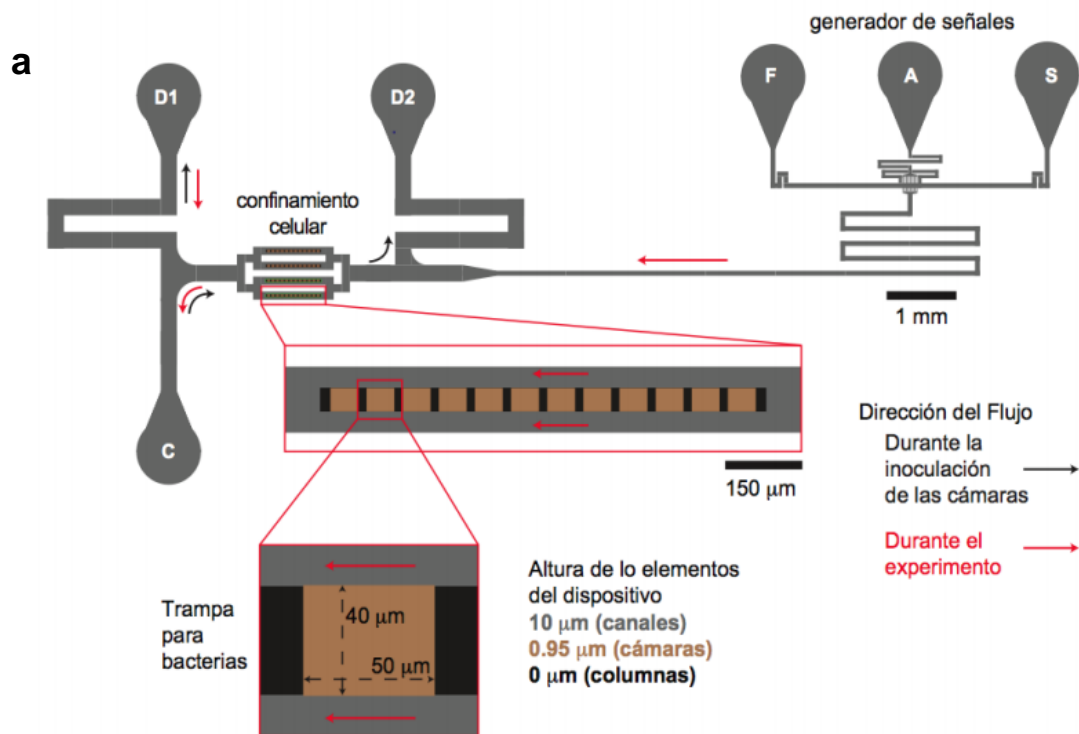


Figura 11. Dispositivo de microfluídica, quimiostato. (a) Diagrama del dispositivo. El dispositivo consiste en 3 entradas, 3 salidas, un mezclador de gradiente, una serpentina y 48 trampas para confinamiento de las bacterias. F, fondo (medio sin antibiótico). A, agua. S, señal (medio con antibiótico). D 1 y 2, desechos. C, células. (b) Imagen de contraste de fase de células de *E. coli*/pBGT1 en una trampa de quimiostato.

- **Experimentos de microfluídica**

- 1) *Preparación de jeringas y bacterias*

Se prepararon jeringas (4 o 6, depende del dispositivo de microfluídica), cada una conectada a 2 metros de tubo médico flexible que el otro extremo porta una aguja dispensadora. El contenido de cada jeringa es el siguiente:

- a) *Fondo*: LB + L-arabinosa 0.5%, como condición normal de crecimiento.
- b) *Señal*: LB + L-arabinosa 0.5% + dosis letal de ampicilina (depende de la cepa), como condición de estrés. Además, a esta jeringa se le añadieron 5 ul de rodamina como marcaje (para observar su entrada durante el experimento mediante este colorante) que tiñe de rojo el medio.
- c) *Desecho*: 3 jeringas (quimiostato) o 1 (*Mother machine*) con agua, como contenedores de desechos.
- d) *Células*: bacterias re-suspendidas en medio LB + L-arabinosa al 0.5%.

Previamente las bacterias se cultivaron en 100 ml de medio LB durante toda la noche a 200 rpm y 30°C en una incubadora. Al día siguiente, los 100 ml fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 min, y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el pellet se re-suspendió en 5 ml de LB + L-arabinosa al 0.5%. Por último, este medio con bacterias se cargó en una jeringa.

2) Sistema de control del flujo

El dispositivo de microfluídica respectivo se coloca en el microscopio y cada una de las jeringas se conecta al puerto correspondiente.

El flujo dentro del dispositivo se controla por medio de un sistema Dial-A-Wave (DAW), el cual está compuesto por un software, el dispositivo de microfluídica y un sistema mecánico (rotores) que cambia la altura de las jeringas. Al variar la posición de las jeringas se generan cambios dinámicos en la presión, por consiguiente, cambios en el flujo dentro del dispositivo (**Figura 10b**).

De esta manera, direccionamos el flujo para el confinamiento de bacterias en las trampas, y posteriormente para el crecimiento de las mismas. Una vez en las trampas, las bacterias se dejan crecer al menos 3 generaciones en medio libre de ampicilina antes de comenzar a tomar fotografías.

Mediante microscopía de lapso de tiempo y el sistema DAW, se tomaron fotografías en las siguientes condiciones (**Figura 12**):

- a) Las bacterias confinadas se dejan crecer en medio LB libre de antibiótico.
- b) Seguido de un pulso de ampicilina.
- c) Posteriormente se vuelve a medio libre antibiótico.

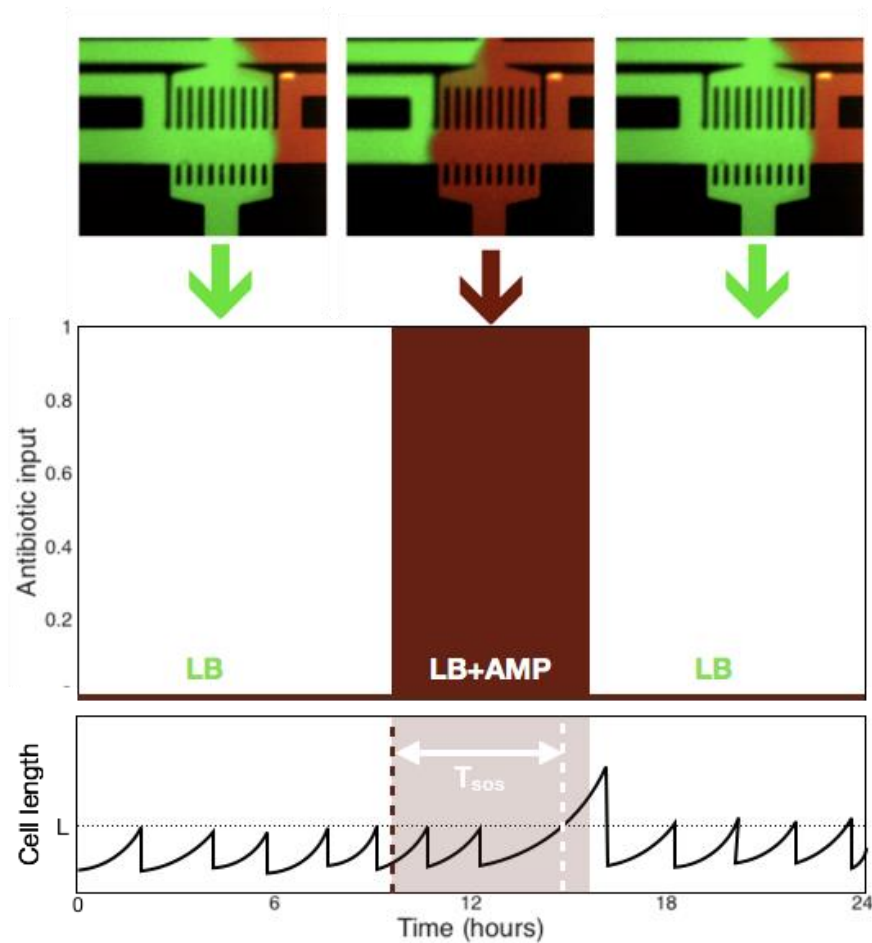


Figura 12. Estrategia experimental. Representación gráfica de experimento planeado (no real), se muestra el crecimiento de una bacteria individual, los pasos son los siguientes: (1) mediante experimentos de microfluídica obtener series de tiempo de bacterias creciendo en condiciones libres de estrés, (2) dar un pulso de antibiótico (100% de la concentración definida) en un periodo de tiempo corto para desencadenar la filamentación en las bacterias, (3) y posteriormente volver a una condición libre de estrés esperando que las bacterias tengan la capacidad de resolverse y volver a su tamaño normal. En la parte superior de la imagen se observa el mezclador del dispositivo de microfluídica tipo quimiostato. T_{sos} , representa el tiempo que cada célula individual tarda en cruzar el umbral de longitud definido como evento de filamentación. L , longitud. AMP, ampicilina.

- **Microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo**

Las mediciones de microscopia de lapso de tiempo se realizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Ti-Eclipse controlado con el software de imágenes NIS-Elements. El microscopio está equipado con una cámara, un escenario lineal automatizado (permite el movimiento en las coordenadas de los x-y) y una caja

incubadora mantener una temperatura constante de 30°C. Todas las fotografías fueron grabados con el objetivo 100x. Se seleccionaron las posiciones de interés donde se confinaron a las bacterias en los canales de crecimiento, y se tomaron fotografías cada 5 o 10 min, dependiendo del experimento. Las imágenes se tomaron en modo de contraste de fase, y modo de fluorescencia para GFP y DsRed, siendo los tiempos de exposición 200 ms, 200 ms y 600 ms, respectivamente.

- **Análisis de imágenes**

Para el análisis de imágenes usamos una serie de programas en uJ (<https://github.com/ccq-esb-lab/uJ>), que consiste en una macro biblioteca de ImageJ (principalmente) para la cuantificación de la dinámica bacteriana unicelular en dispositivos de microfluídos. Los pasos para el análisis son (**Figura 13**):

- 1) *Pre-procesamiento*

Exportación de las fotografías obtenidas por el software NIS-Elements de los experimentos de microfluídica, en formato TIFF. Cada imagen se nombró previamente de la siguiente manera: *nombrexy01c1t001*. Donde *nombre*, es el nombre que se asigne al experimento; *xy*, indica el número de trampa; *c*, indica el canal; *t*, indica el transcurso del tiempo.

Las imágenes se compilan, renombran y guardan como imágenes separadas en distintas carpetas. Se sigue la clasificación por canales de fluorescencia y contraste de fases, y dentro de la carpeta de canales esta la sub-clasificación por número de trampa.

- 2) *Segmentación*

Para determinar que partes de las fotografías corresponden a células, se realiza la segmentación de la imagen. La segmentación consiste en una clasificación a nivel de píxeles, identificando entre píxeles que dan identidad al límite de la célula, interior de la célula y el fondo de la imagen (no celular). A partir de lo anterior se genera una nueva imagen, conocida como máscara de segmentación, que contiene únicamente los píxeles que identifican a las células.

Para construir la máscara de segmentación, se usa una red de entrenamiento de *Deepcell* (Van Valen et al. 2016), un conjunto robusto de imágenes de muestra que previamente fueron clasificadas. En el laboratorio obtenemos imágenes que se parecen a las de la red de entrenamiento para poder realizar la segmentación.

La generación de máscaras de segmentación no está absuelta de errores, en ocasiones se deben corregir manualmente, debido a: 1) identificación de dos (o

más) células erróneamente como una sola, o viceversa, 2) identificar dos (o más) células cuando se trata solo de una célula y, 3) no identificar una célula.

3) *Tracking*

A partir de la segmentación de imágenes obtenemos archivos roi (*region of interest*), que contienen coordenadas de la posición de células individuales en cada fotografía. El tracking es el seguimiento de una región de interés en una serie consecutiva de imágenes. En este caso, el tracking genera la identificación de los linajes, es decir, la ascendencia de cada célula.

Leemos los archivos roi en Python a través del paquete *shapely* que reconstruye polígonos con eficacia, calculando de esta manera la longitud de las células. También en Python usando los archivos roi realizamos tracking de las células con el algoritmo *k-nearest neighbors* que usa varias propiedades como intensidad de fluorescencia, largo y forma de cada célula, para identificar linajes.

4) *Extracción de datos*

Mediante el procesamiento de imágenes generamos un archivo de texto que contiene la siguiente información de cada experimento, en columnas:

- **lineageID:**
se asigna un número entero único a la célula madre y a su ascendencia.
- **trackID:**
indica las coordenadas x-y donde inicia la célula que se está siguiendo.
- **cellID:**
se asigna un número de identificación único a cada célula existente desde el inicio o generada posteriormente.
- **motherID:**
representa el número de identificación de la célula madre que dio origen a la progenie.
- **frame:**
es el número de la fotografía en la secuencia de fotografías tomadas, siendo un indicativo del tiempo transcurrido.
- **roiID:**

indica la posición x-y en la que se encuentra la célula seguida tras cada fotografía.

- length:
es la longitud de cada célula a través de cada fotografía/tiempo.
- división:
indica los eventos de división celular, representados con el valor 1 cuando ocurren y, en caso contrario, se asigna el valor 0.
- GFP:
Representa la intensidad de fluorescencia relativa en cada célula a través del tiempo generada por la proteína verde fluorescente.
- DsRed:
Representa la intensidad de fluorescencia relativa para cada célula a través del tiempo generada por internalización de la rodamina. Siendo un indicativo de los eventos de muerte celular.
- Dead:
Indica los eventos de muerte celular. Se determinan a partir de un umbral de fluorescencia generado por la rodamina que utilizamos en los experimentos de microfluídica.

Todos los datos se importaron a R para analizarse. Se determinó el umbral de longitud celular a partir del cual se considera un evento de filamentación a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Umbral de filamentación} = \text{promedio de longitud} + 2 * \text{desviación estandar}$$

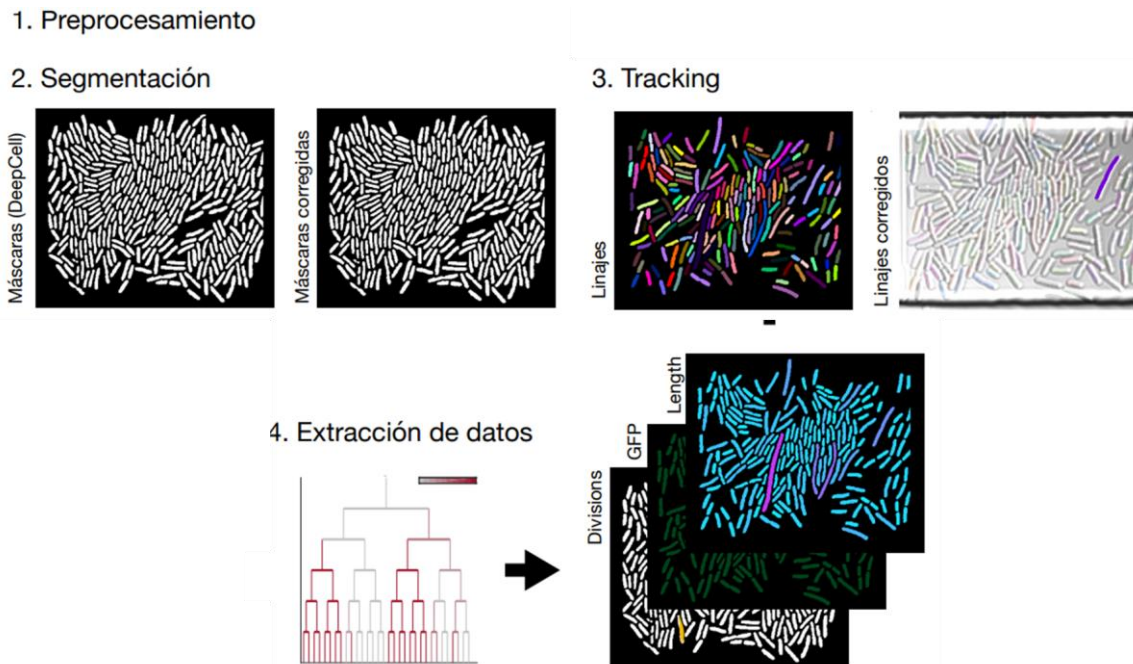


Figura 13. Procesamiento de imágenes. (1) Pre-procesamiento: consiste en el ordenamiento por canales (DIC y fluorescencias) y trampas (del dispositivo de microfluídica) de las fotografías obtenidas por microscopía de lapso de tiempo. (2) Segmentación: identificación de células en cada una de las fotografías, generando máscaras que en ocasiones no identifican todas las células y se debe realizar corrección manual. (3) Tracking: identificación de linajes a través de las fotografías. (4) Extracción de datos: a partir de los pasos anteriores, obtenemos información de cada célula sobre su intensidad de fluorescencia, su largo y si presentó un evento de división celular en una de las fotografías, permitiéndonos graficar series de tiempo y calculando tasas de división celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

- **Caracterización de niveles de resistencia a ampicilina.**

Nosotros usamos las cepas MG1655:*bla*_{TEM1} (MG:*bla*_{TEM1}) y MG1655/pBGT (MG/pBGT), ambas portadoras del gen *bla*_{TEM1} que codifica para TEM-1, una beta-lactamasa que inactiva a ampicilina, y un reportero fluorescente (*gfpmut2*). La cepa MG:*bla*_{TEM1} porta una sola copia/célula de los genes en el cromosoma, mientras la cepa MG/pBGT tiene ~19 copias/célula portadas en un plásmido multicopia (Millan et al. 2016). Realizamos curvas dosis-respuesta para encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de cada cepa en presencia de ampicilina. Como era de suponerse, el aumento en el número de copias de *bla*_{TEM1} produce un aumento en la resistencia a beta-lactámicos (**Figura 14**).

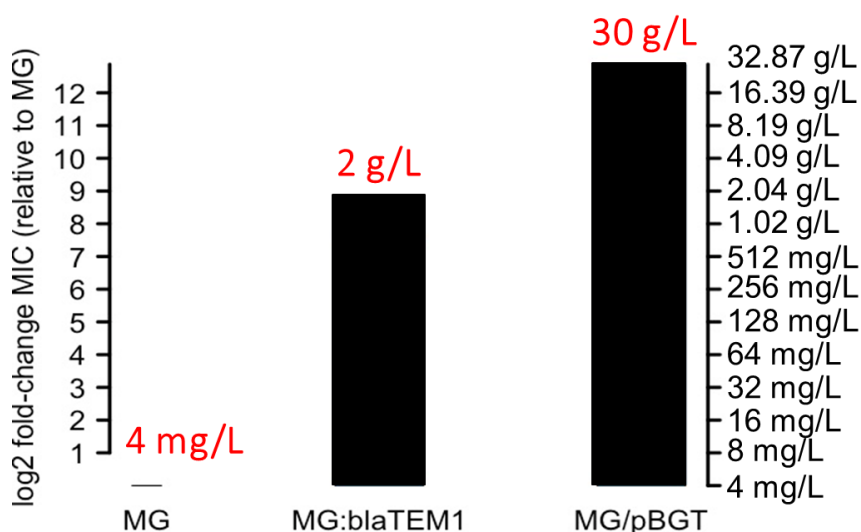


Figura 14. Niveles de resistencia a ampicilina de las cepas analizadas en este estudio. Los niveles de resistencia a ampicilina (AMP) de cada una de las cepas es representado como log₂ del incremento de veces del MIC comparado con la cepa parental MG1655. El MIC de ampicilina en la cepa MG1655 tipo salvaje es de 4 mg/L.

La MIC para MG:*bla*_{TEM1} y MG/pBGT, es 2 g/L y 30 g/L, respectivamente. Esta información fue pertinente para estimar las dosis que utilizamos en experimentos de microfluídica para cada cepa.

- **Portar un plásmido multicopia produce heterogeneidad en la población.**

Nosotros estudiamos la variabilidad en el número de copias de un gen de resistencia, *bla*_{TEM1}, en una población que lo porta en un plásmido multicopia. La

variabilidad es debido a la naturaleza estocástica de la dinámica de segregación y replicación del plásmido multicopia que produce una distribución del número de copias/célula en la población (Million-Weaver and Camps 2014) y, por lo tanto, una expresión heterogénea de genes portados en estos plásmidos (**Figura 15**).

En un experimento previo realizado en el laboratorio (revisar antecedentes), observamos que, en presencia de ampicilina existe una correlación entre los niveles de resistencia al antibiótico y la intensidad de fluorescencia a nivel de células individuales. Las células sobrevivientes a la perturbación, mostraban una mayor intensidad de fluorescencia. Esto nos hizo pensar que a su vez existía una correlación entre el número de copias del gen *bla*_{TEM1} y la intensidad de fluorescencia de cada célula. Por lo cual, realizamos una clasificación de la población portadora del plásmido de acuerdo a su intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, seleccionando diferentes fracciones de la población y, posteriormente realizamos PCR cuantitativo a cada una de las muestras previamente clasificadas (Figura 15).

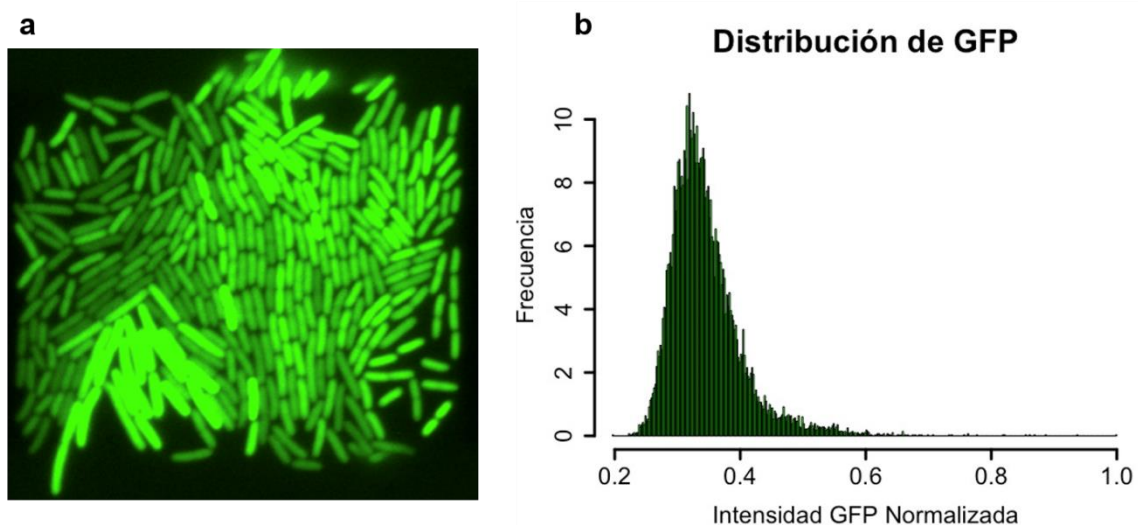


Figura 15. Heterogeneidad en el número de copias de *bla*_{TEM1}. Se describe en la siguiente página.

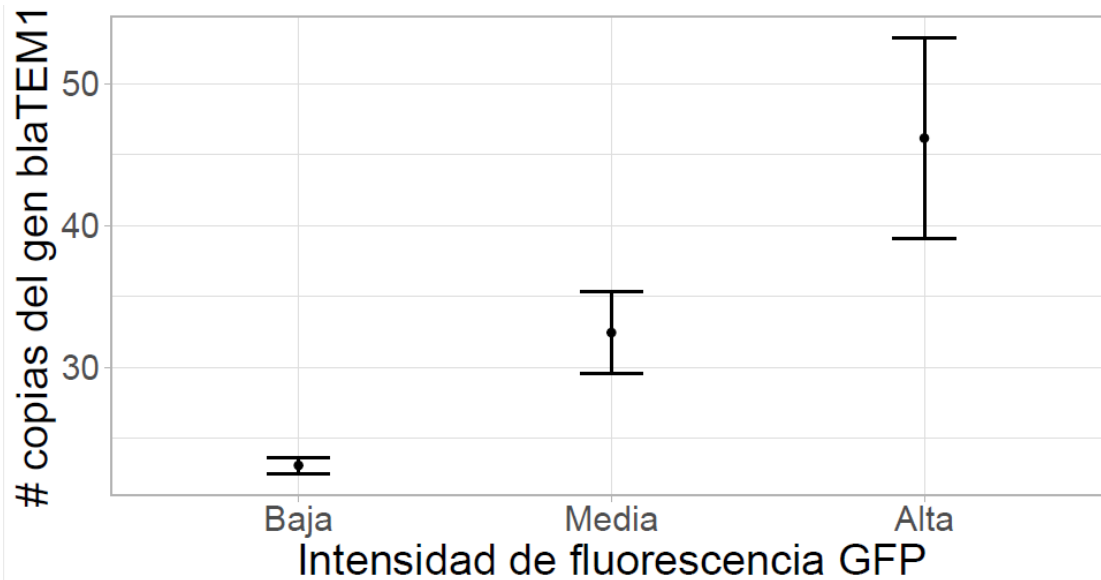


Figura 15. Heterogeneidad en el número de copias de *bla*_{TEM1}. (a) Imagen de microscopía de fluorescencia de la cepa MG/pBGT en una trampa de dispositivo de quimiostato. Se observa variabilidad en el número de copias del plásmido, por tanto, variabilidad en la expresión de los genes que porta. (b) Distribución de intensidad de fluorescencia de GFP. (c) Se muestra la correlación entre la intensidad de fluorescencia de GFP y el número de copias del gen de resistencia *bla*_{TEM1}. Las barras de error representan la desviación estándar de las 3 réplicas.

Con el resultado obtenido comprobamos que, a mayor intensidad de fluorescencia, mayor número de copias del gen de resistencia.

Nosotros pensamos que, la variabilidad en el número de copias de un gen de resistencia en una población puede generar una ventaja ante ambientes fluctuantes, aumentando la capacidad de supervivencia de una población mediante una mayor cobertura a diferentes situaciones.

- **Una población heterogénea incrementa la resiliencia ante ambientes fluctuantes.**

Una población bacteriana contiene ante ambientes hostiles e impredecibles que erradican a una fracción de la misma, sin embargo, el resto de la población tiene la capacidad de superar las circunstancias adversas. Esta capacidad se conoce como resiliencia.

Para obtener la dinámica de la población bacteriana portadora del plásmido multicopia ante un estrés, realizamos experimentos de microfluídica, por medio de los cuales obtuvimos información a nivel de células individuales: intensidad de fluorescencia de GFP, eventos de división, longitud y muerte celular.

Mediante un dispositivo de microfluídica con diseño de quimiostato (**Figura 11**), que nos permite tener una muestra suficientemente grande, y el uso de microscopia de lapso de tiempo, obtuvimos series de tiempo ante ambientes fluctuantes. Las variaciones en el ambiente se lograron mediante un sistema mecánico que cambia la altura de las jeringas que contienen los medios y se conectan al dispositivo de microfluídica.

La estrategia experimental implementada consistió en (**Figura 12**):

- a) Las bacterias confinadas se dejan crecer en medio LB libre de antibiótico.
- b) Seguido de un pulso breve de ampicilina.
- c) Posteriormente se vuelve a medio libre antibiótico.

La población bacteriana portadora del plásmido multicopia, confinada en el dispositivo de microfluídica, se mantuvo en condiciones libre de antibiótico previo al pulso de antibiótico. Usamos una dosis de 8 g/L de ampicilina durante 1 hora con 15 min como condición de estrés, y se reanuda el ambiente libre de antibiótico.

Tras el pulso de ampicilina, observamos heterogeneidad tanto fenotípica como en la expresión TEM-1, una beta-lactamasa, que produce variabilidad en los niveles de resistencia (**Figura 16**). Bacterias con mayor expresión de TEM-1 sobreviven a la exposición de ampicilina y continúan creciendo después de un pulso de antibiótico.

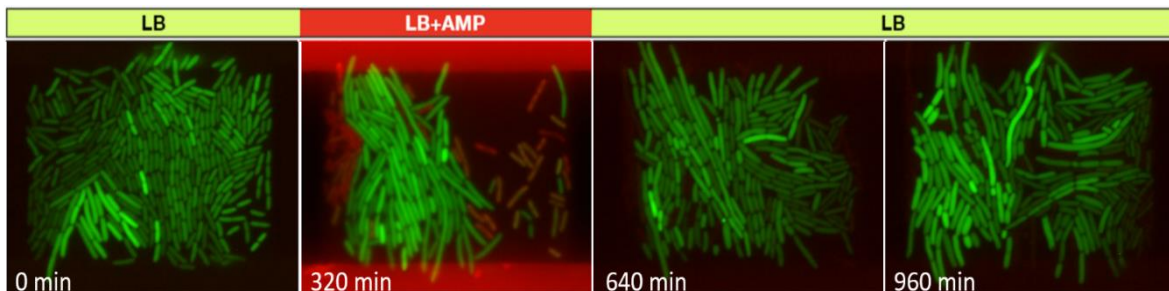


Figura 16. Una población heterogénea incrementa la capacidad de resiliencia ante ambientes fluctuantes. Una población de *E.coli* MG/pBGT1 muestra variabilidad en la expresión de TEM-1 antes, durante y después de un pulso de ampicilina. En rojo se observa la entrada de ampicilina (8 g/L).

Aquellas bacterias con menor expresión de TEM-1 son una subpoblación susceptible, y por ende son erradicadas. Tanto la dosis del antibiótico como el periodo de exposición al mismo, son factores que generan estrés. De manera inmediata la dosis del antibiótico ejerce su efecto bactericida sobre una fracción de la población. Sin embargo, mientras transcurre el tiempo la acumulación de antibiótico aumenta la fracción de células lisadas.

La ampicilina actúa interrumpiendo la biosíntesis de la pared de peptidoglicano (Miller et al. 2004), por tanto, en cada célula hay un número finito de dianas celulares y portan un conjunto de beta-lactamasas para su defensa. Tras la exposición continua a ampicilina, debido al flujo constante en el dispositivo de microfluídica, eventualmente la expresión de TEM-1 es insuficiente. La expresión diferencial de TEM-1 es la causa de la muerte celular en diferentes momentos.

A su vez, no descartamos un efecto cooperativo debido a la protección de beta-lactamasas ajenas que se encuentran en el entorno, provenientes de vecinos inmediatos que sufrieron lisis celular. Esto aumentaría la ventana de tiempo de supervivencia del resto de la población.

Por otra parte, observamos una correlación entre la expresión de TEM-1 y el momento de detonación de la filamentación. Esto tiene sentido, mientras las enzimas inactivan a la ampicilina no se crea una situación de estrés para la célula y no es necesario activar un segundo mecanismo de defensa. Pero, cuando la primera línea de protección es superada y se cruza un umbral de daño, la célula entra en un estado de estrés y debe mitigarlo por otro sistema.

La filamentación actúa atenuando el daño por medio de un incremento en la tolerancia al antibiótico (Justice et al. 2008b), extendiendo la ventana de tiempo de supervivencia de la bacteria, mientras continua la incertidumbre del momento en que cese el estrés. Observamos que, si el antibiótico se retira antes de presentarse lisis celular, aquellas células que formaron filamentos tienen la capacidad de repoblar el medio. Entonces, esta heterogeneidad fenotípica generada por la asincronía en el momento en que se presentan los eventos de filamentación en la población juega un papel crucial.

- **La distribución de plásmidos se reestablece después de un pulso de antibiótico.**

La variabilidad del número de copias del gen de resistencia portado en el plásmido multicopia, es una característica que proporciona ventajas ante tensiones ambientales. De esta manera, nos interesamos en conocer su dinámica.

En el transcurso del pulso de ampicilina, se seleccionaron los individuos con mayor expresión de TEM-1. Al anular el estrés la progenie de la población sobreviviente recupera e incluso incrementa la distribución del número de copias de plásmidos preexistente antes del pulso y, de hecho, se muestra un comportamiento bimodal (**Figura 17**). El comportamiento bimodal se explicaría, ya que, aquellas células con menor número de copias tienen una mayor tasa de crecimiento y se ven favorecidas en un entorno libre de estrés.

Esto nos permite argumentar que la heterogeneidad de la población es producto de la variabilidad intrínseca del sistema de control de número de copias del plásmido.

Por otro lado, el aumento en la amplitud de la distribución del número de copias genera una adaptación, preparando a la población en caso de que el próximo escenario de estrés sea más devastador que el primero.

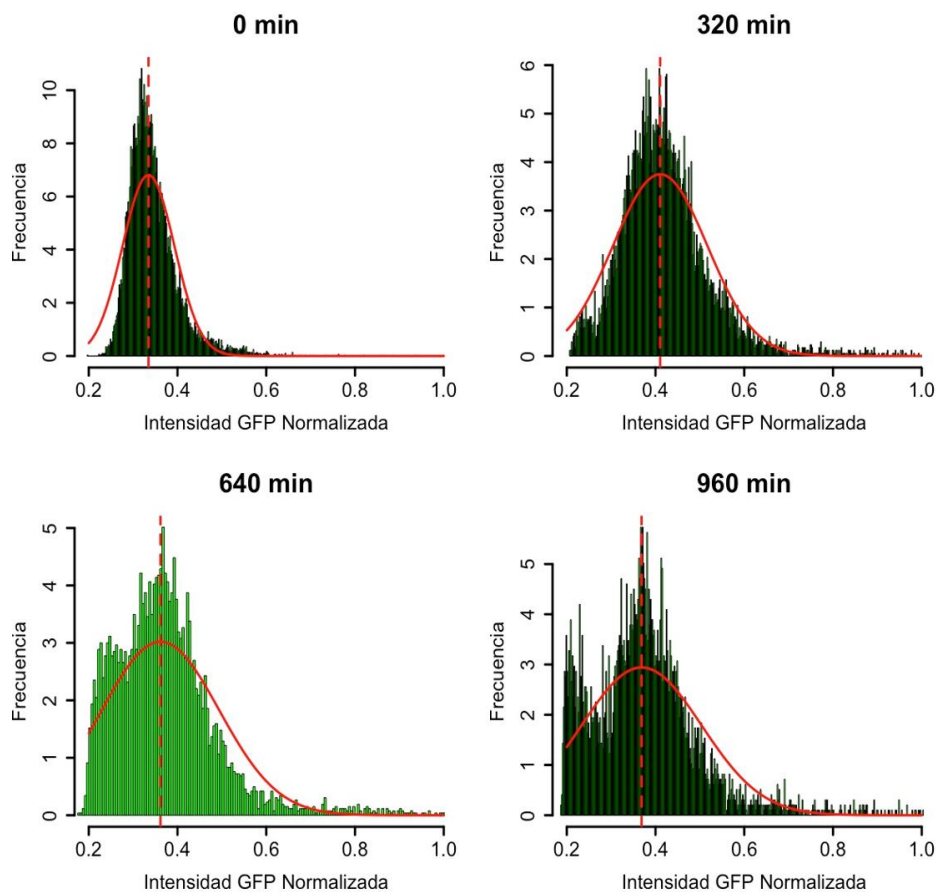


Figura 17. Distribución de plásmidos multicopia. Se muestran los histogramas de la distribución de plásmidos antes (a), durante (b) y después (c, d) de un pulso de antibiótico.

- **Heterogeneidad fenotípica como estrategia que promueve la resiliencia en la población.**

La heterogeneidad fenotípica generada por los eventos de filamentación asincrónicos en el tiempo en células individuales de una población, es de nuestro interés. Debido a la distribución de la expresión de TEM-1 en la población, cada célula censa el daño y se determina el momento en que se implementará la respuesta.

Para enfocarnos en la filamentación, realizamos un experimento complementario en un dispositivo de microfluídica distinto, conocido como *Mother machine* (Figura 10), el cual se distingue principalmente por sus trampas en posición vertical que retienen una célula madre en el fondo para obtener su dinámica.

Observamos que en el transcurso del pulso de ampicilina la célula madre y su progenie inician el proceso de filamentación. Esto no ocurre de manera instantánea debido al montaje previo del septo de división, no obstante, en rondas posteriores se inhibe la división, ocasionando un fenotipo alargado. Al retirar el antibiótico, si una célula formo un filamento, es capaz de resolverse, esto es: dividirse, reanudar su fenotipo y producir progenie viable (**Figura 18**).

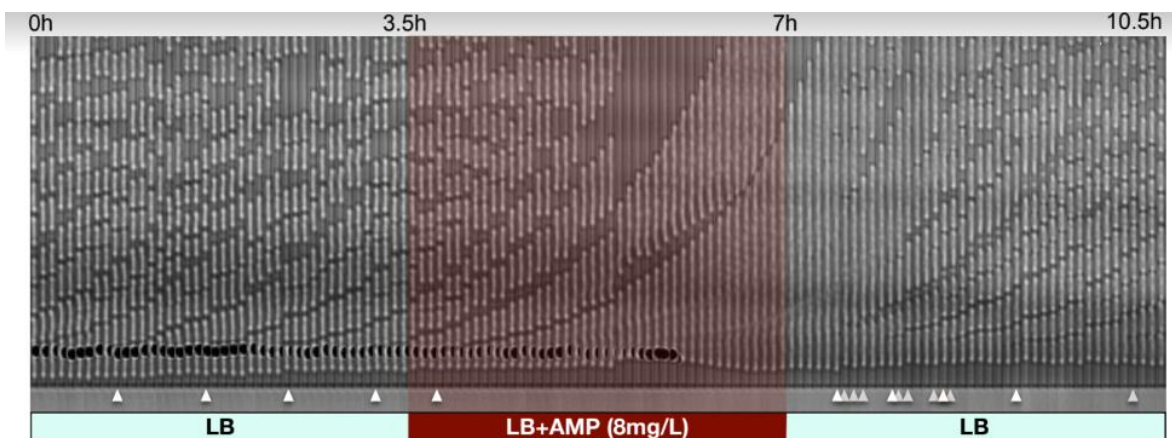


Figura 18. La heterogeneidad fenotípica promueve la resiliencia en la población. Se observan células retenidas un canal crecimiento vertical a través del tiempo (fotografías cada 5 min) del dispositivo *Mother machine*. La sección marcada en rojo indica el rango de tiempo en que estuvo presente la ampicilina (8 g/L). Las flechas blancas indican los eventos de división celular. El punto negro es una mancha.

Existen diferencias claras entre la etapa pre y post pulso de antibiótico. Los eventos de división celular pre-pulso tienen una coordinación temporal y suceden en el

centro de la célula, en cambio, en la etapa post-pulso la división es una secuencia temporal desorganizada y en una ubicación aleatoria en la célula. Adicionalmente, hay un periodo en la etapa post-pulso en que ocurre una recuperación celular antes de iniciar la división.

La filamentación es un estado de tolerancia transitorio que atenúa el daño por la ampicilina, extendiendo el tiempo de supervivencia. Si el daño persiste demasiado tiempo, las células eventualmente sufren lisis celular. Mientras que, si el estrés no es duradero, tras un periodo de recuperación las bacterias reanudan su fenotipo.

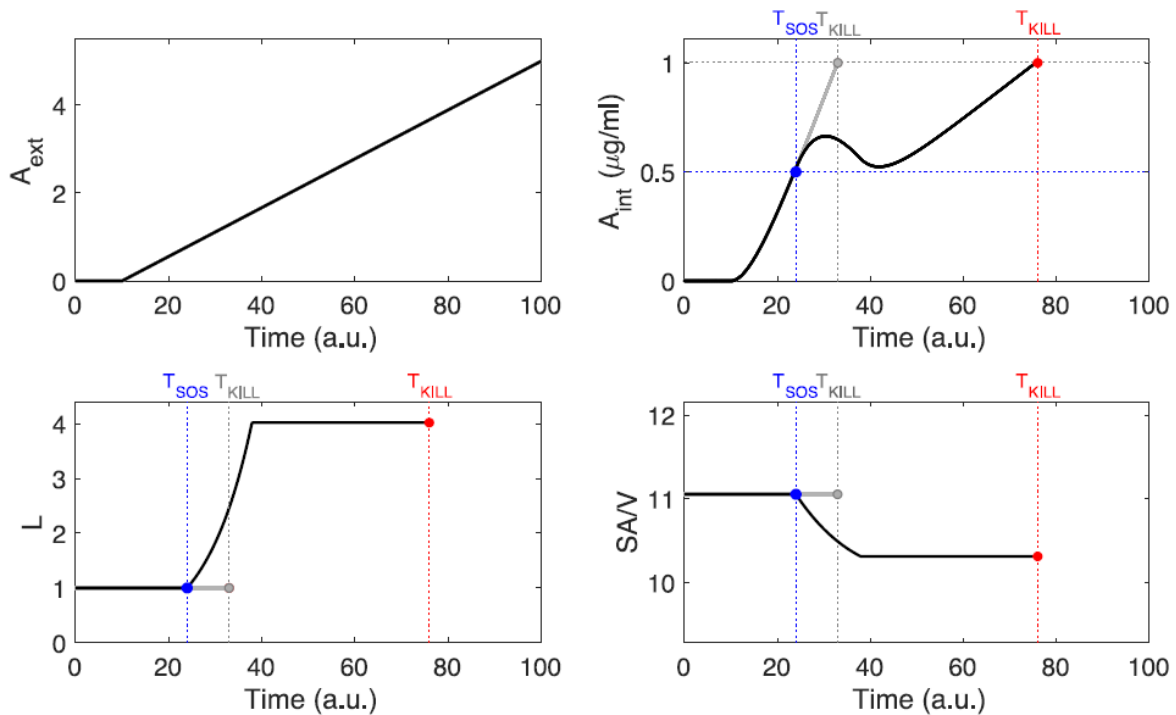
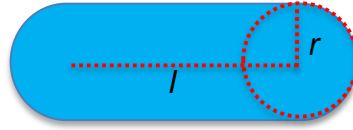


Figura 19. La filamentación disminuye la concentración de antibiótico intracelular. En presencia extracelular de antibiótico (A_{ext}), la concentración intracelular (A_{int}) incrementa hasta alcanzar un umbral de daño que detona la filamentación (T_{sos}), aumentando la longitud celular (L). Esto produce una disminución de la concentración intracelular de antibiótico al aumentar el volumen (V) más rápido que la tasa de entrada de antibiótico, la cual depende de la superficie de área (SA). Eventualmente la célula llega a su longitud máxima y vuelve a acumular antibiótico, y si el estrés no cesa a tiempo, ocurre muerte celular (T_{kill}). En gris se muestra la consecuencia de no presentar filamentación.

Además del aumento en el número de beta-lactamasas, TEM-1, que inactivan a ampicilina en las células que forman filamentos, nosotros pensamos que, las células al alargarse, disminuyen la concentración de antibiótico intracelular al aumentar su volumen más rápido que la tasa de entrada de antibiótico que depende de la superficie de área (**Figura 19**):



$$\text{Longitud celular}(L) = l + 2r$$

$$\text{Área superficial (AS)} = 2\pi r l + 4\pi r^2$$

$$\text{Volumen (V)} = \pi r^2 l + \frac{4\pi r^3}{3}$$

A esta propuesta le falta validación experimental en un proyecto futuro.

- **Estimación de la distribución de tiempos de filamentación en respuesta a un pulso de ampicilina.**

En complemento, realizamos otro experimento de microfluídica usando una población homogénea, una cepa que porta una sola copia/célula del gen de resistencia, bla_{TEM-1} , en el cromosoma. La razón de este experimento es la comparación de una población homogénea contra una intrínsecamente heterogénea.

El experimento fue equivalente e igualmente consistió en 3 fases: una fase de crecimiento libre de antibiótico, seguida de pulso breve de ampicilina y finalmente retorno al medio sin antibiótico. En este caso, esperábamos una coordinación temporal en el momento de detonación de la filamentación debida a la falta de variabilidad en la población.

A partir de los datos de los experimentos de microfluídica y usando procesamiento de imágenes, estimamos el tiempo transcurrido entre el inicio del pulso de ampicilina y el momento en que cada célula se filamta (**figura 20**).

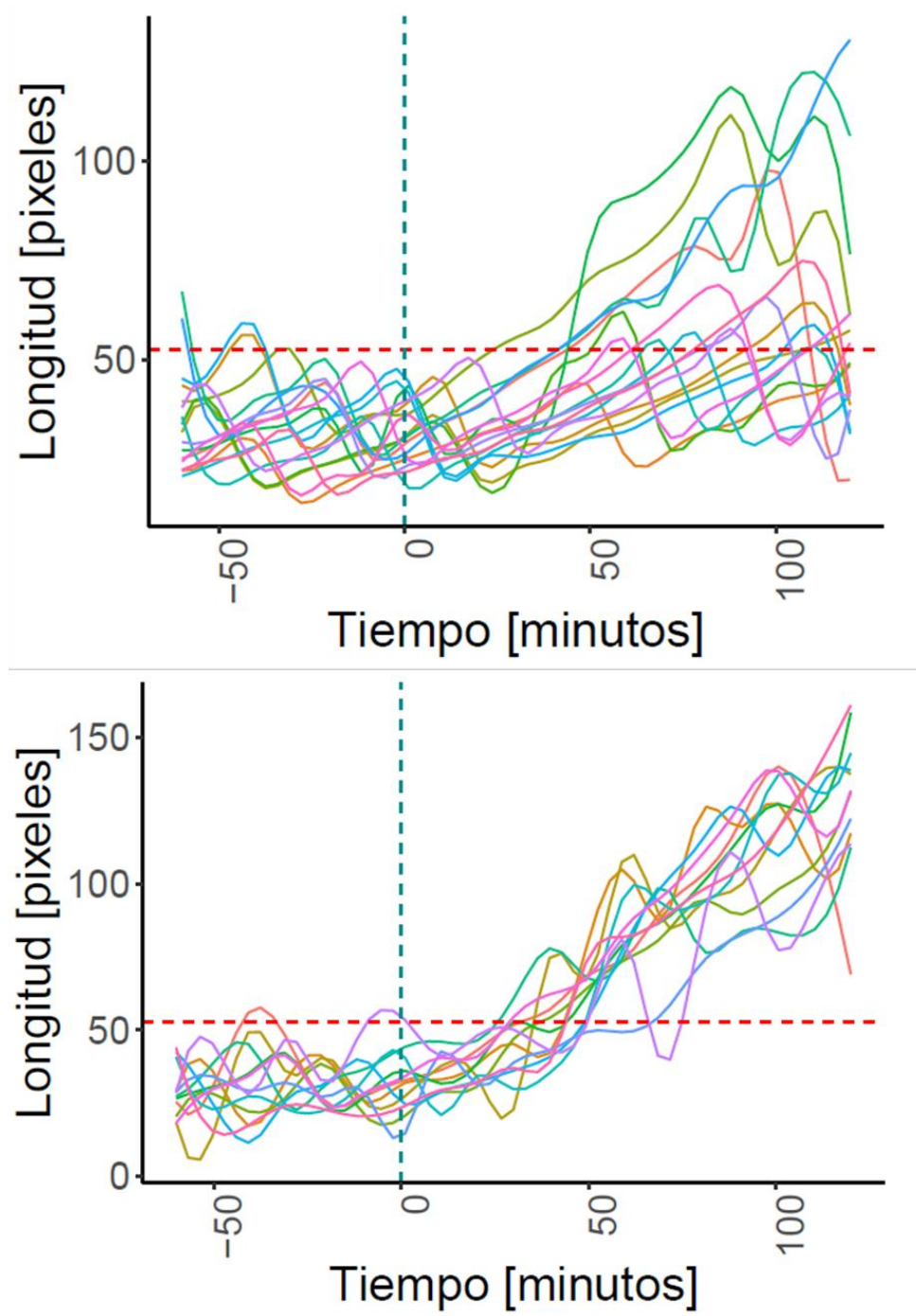


Figura 20. Eventos de filamentación a nivel de células individuales. Eventos de filamentación a través del tiempo tras el inicio (0 min) de un pulso de ampicilina. Arriba se muestra el comportamiento de la población que porta el gen de resistencia en un plásmido multicopia, mientras que abajo se representa el comportamiento al portarlo en el cromosoma. Cada línea continua indica la longitud de una célula a través del tiempo. La línea punteada roja indica el umbral a partir del cual la longitud de la bacteria se considera como un evento de filamentación.

De acuerdo a nuestro resultado, a nivel de células individuales, la población que porta el gen de resistencia en un plásmido multicopia presenta mayor variabilidad en el momento en que se detona la filamentación, en comparación con portarlo en el cromosoma.

- **Células portadoras de plásmidos multicopia presentan activación asíncrona de la respuesta SOS**

Las bacterias han desarrollado respuestas al estrés, cuyo objetivo es aumentar temporalmente los límites de tolerancia. Estas respuestas son a menudo específicas.

Estudios previos han demostrado que, tras el daño por antibióticos beta-lactámicos, específicamente por ampicilina, la filamentación no se suscita si la respuesta SOS o uno de los pasos previos a su activación, es interrumpido. Siendo precisamente el daño a la pared de peptidoglicano (la unión de ampicilina a PBP3) el estímulo que desata la respuesta (Miller et al. 2004).

Existe un estudio que demuestra que a nivel individual las células activan la respuesta SOS con una coordinación temporal precisa, esto es, tras un daño existe sincronía en el momento de activación (Friedman et al. 2005). Sin embargo, en dicho estudio no se consideró una población heterogénea.

Nosotros argumentamos que, portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia produce heterogeneidad en los perfiles de susceptibilidad de la población y, por consiguiente, la detonación asíncrona de la respuesta SOS que conduce a la filamentación a nivel de células individuales (**Figura 21**).

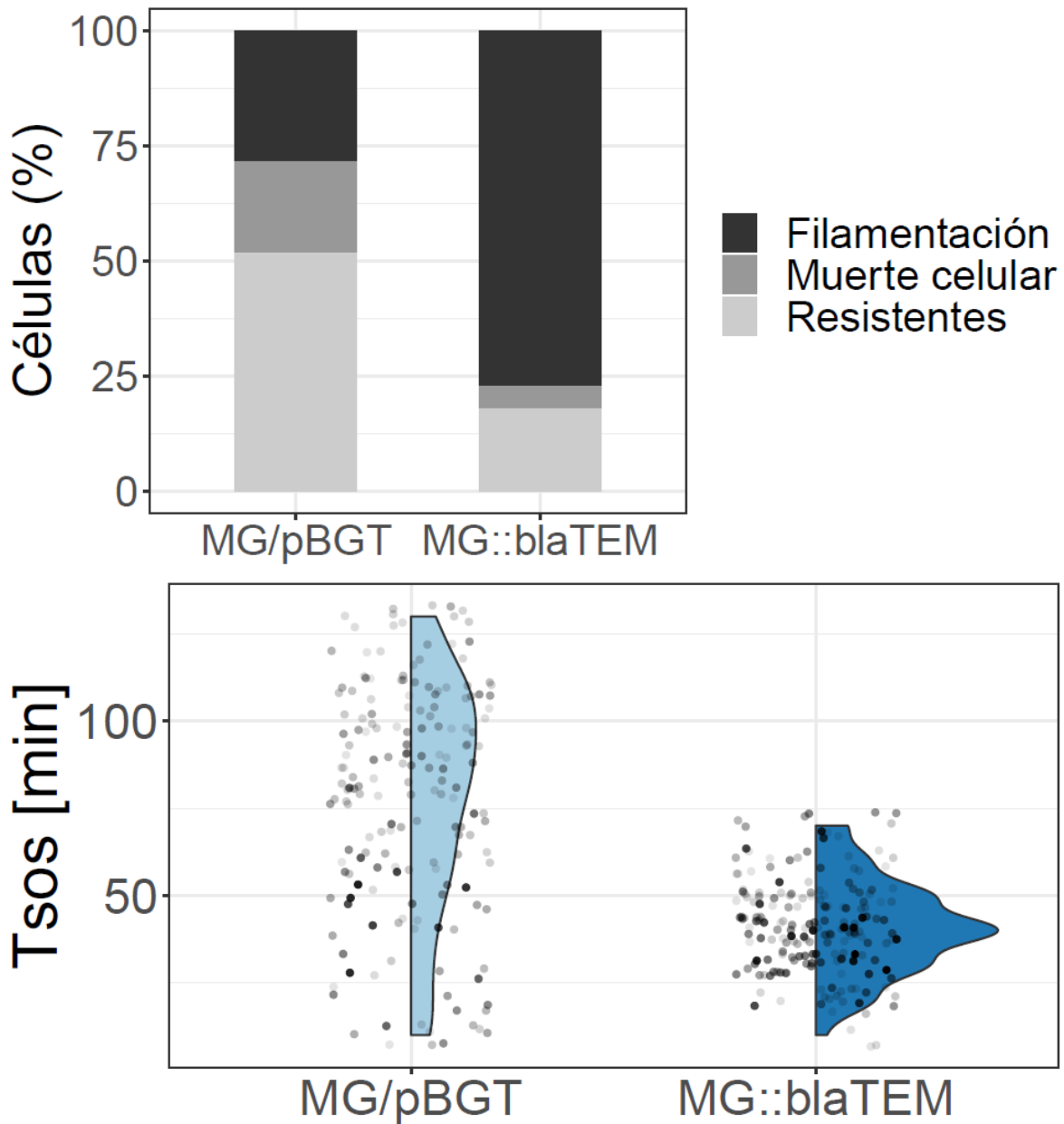


Figura 21. Asincronía en los tiempos de activación de la respuesta SOS debida a la variabilidad producida por los plásmidos multicopia. Los eventos de filamentación en la población portadora del gen de resistencia, bla_{TEM-1} , en el plásmido multicopia (MG/pBGT) presenta una distribución de tiempo (T_{sos}) amplia en comparación con portarlo en el cromosoma (MG:: bla_{TEM}).

Encontramos un comportamiento homogéneo con coordinación temporal en la población que porta el gen de resistencia, bla_{TEM1} , en el cromosoma en comparación con portarlo en un plásmido.

La población portadora del gen de resistencia en el plásmido multicopia muestra una distribución de tiempo amplia en que ocurre la filamentación. Portar diferente número de copias del gen, bla_{TEM1} , implica una dosis de antibiótico correspondiente para causar el mismo daño. Entonces, tras la exposición al antibiótico, coexisten 3 estados en la población:

- Individuos que sufren lisis celular.
- Individuos no son afectados al instante debido a su perfil de resistencia.
- Individuos en estado de filamentación, donde el tiempo de exposición al antibiótico es un factor de riesgo.

En cambio, al portar el gen de resistencia en el cromosoma, los estados son secuenciales, siendo un destino celular casi simultáneo para la población. Por lo que, si un ambiente empeora abruptamente, esta población tendría menores posibilidades de supervivencia al tener una menor cobertura ante diversas situaciones (**Figura 22**).

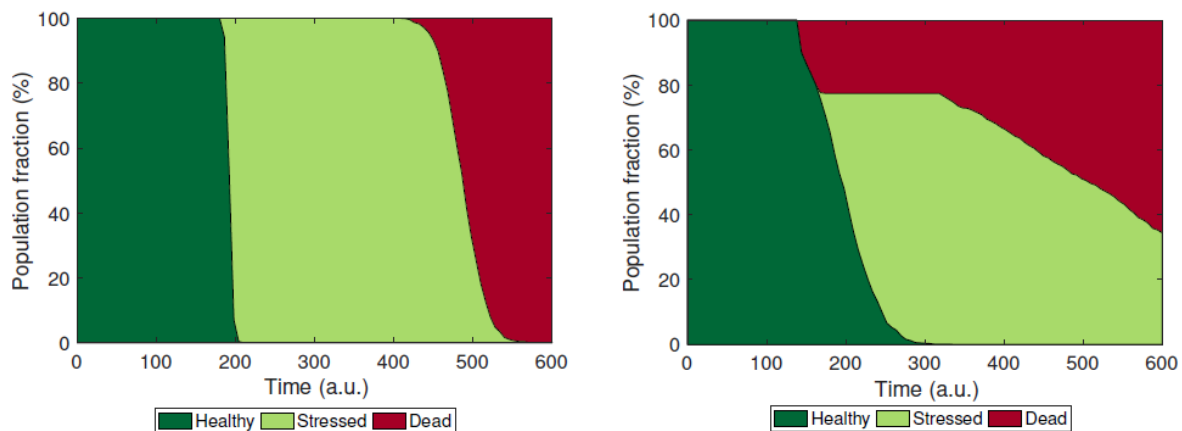


Figura 22. Variabilidad en el número de copias de un gen de resistencia produce diferentes comportamientos en la población. Representación del comportamiento general de una población ante una perturbación dependiendo de la variabilidad del número de copias de un gen de resistencia. A la izquierda se representa una población homogénea, mientras que, a la derecha se muestra una población heterogénea. Esta figura fue realizada a partir de un modelo hecho por el estudiante Jesús Vélez de la LCG.

Nosotros realizamos diversos experimentos de microfluídica, además de los ya mencionados. En dichos experimentos también observamos la existencia de los 3 estados (susceptible, resistente y estresado) en la población ante diferentes dosis y duración de la exposición a ampicilina (AMP):

MG::blaTEM	MG/pBGT
<p>a) 500 mg/L/1:15 hr Observamos eventos de filamentación simultáneos a nivel de células individuales y, al retirar el antibiótico las células reanudaban su fenotipo, esto es: las células se dividían, regresaban a su largo pre-pulso de antibiótico y generaban progenie viable.</p>	<p>b) 22 g/L AMP/1:45 hr Observamos algunos eventos de filamentación, sin embargo, la mayoría de las bacterias salieron de las trampas y, además, no se retiró el antibiótico a tiempo por lo que, las células que aún estaban retenidas sufrieron lisis celular.</p>
<p>c) 2000 mg/L/50 min Nuevamente observamos coordinación temporal en los eventos de filamentación y, al retirar el antibiótico las tenían la capacidad de resolverse (reanudar su fenotipo).</p>	<p>d) 15 g/L AMP/1 hr Intentamos bajando la dosis y la duración de pulso de antibiótico. Observamos eventos de filamentación, sin embargo, la dosis/duración seguía siendo letal.</p>
<p>e) 600 mg/1:45 hr Observamos muerte celular en población.</p>	<p>f) 8 g/L AMP/1:15 hr Se presentaron eventos de filamentación y se retiró el antibiótico, obteniendo evidencia experimental del momento en que células que forman filamentos se resuelven, reanudan su fenotipo y generan progenie viable.</p>
	<p>g) 8 g/L AMP/3:30 hr Nuevamente observamos eventos de filamentación y la capacidad de las células de reanudar su fenotipo una vez retirado el antibiótico.</p>

Tabla 1. Experimentos de microfluídica. Realizamos diversos experimentos de microfluídica para las cepas que usamos en este estudio.

Posteriormente, en un proyecto futuro, planeamos realizar experimentos con distintos agentes tóxicos causantes de filamentación (ejemplo, metales pesados) que no tengan como objetivo directo daño a la pared celular, para dar mayor robustez a nuestro trabajo.

Los experimentos realizados en este trabajo nos generaron más preguntas. En concreto, en un experimento de microfluídica la población que porta el gen *bla*_{TEM1} en el cromosoma se expuso a un segundo pulso de ampicilina de mayor duración después de la recuperación al previo. Observamos nuevamente eventos de filamentación pero se requirió un tiempo mayor para presentarse. Entonces nos preguntamos, “¿la dinámica de regulación del sistema SOS depende de la intensidad y duración del estímulo, así como su exposición previa al mismo?”.

CONCLUSIONES

Nosotros iniciamos este proyecto con las siguientes preguntas: ¿de dónde podría provenir la heterogeneidad que detona la respuesta SOS en diferentes tiempos y que conduce a una plasticidad fenotípica?, ¿cuál es el beneficio funcional de presentar variabilidad temporal en la filamentación?

Con los resultados obtenidos concluimos que:

- Portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia produce variabilidad en los perfiles de susceptibilidad de la población y, por consiguiente, la detonación asíncrona de la respuesta SOS que produce la filamentación a nivel de células individuales.
- Portar un gen de resistencia en un plásmido multicopia produce heterogeneidad en la población, misma que incrementa la resiliencia ante ambientes fluctuantes.
- La heterogeneidad fenotípica es un mecanismo que aumenta la resiliencia en una población. En particular, la filamentación atenúa el efecto que tiene el antibiótico al aumentar la tolerancia.
- La distribución de plásmidos se reestablece después de un pulso de antibiótico, debido a la variabilidad intrínseca del sistema de control de número de copias del plásmido.

PERSPECTIVAS

- **La regulación del sistema SOS presenta histéresis**

En uno de los experimentos de microfluídica realizados en este trabajo se observó un fenómeno potencialmente interesante: el tiempo de respuesta del sistema SOS es considerablemente mayor en células que han estado previamente expuestas a ampicilina. En sistemas dinámicos este fenómeno se conoce como histéresis y ha sido estudiado en diversos sistemas físicos y biológicos.

Nosotros proponemos estudiar la dinámica de regulación del sistema SOS en respuesta a estímulos de distinta intensidad y duración. En específico, proponemos identificar genes clave de la red de activación del sistema SOS y cuantificar su dinámica temporal de expresión para evaluar si, al eliminar el inductor, se forma un ciclo de histéresis que podría modificar la respuesta a estímulos posteriores. Es decir, evaluar si la regulación transcripcional presenta *memoria*.

El sistema experimental propuesto se fundamenta en un catálogo de cepas de *Escherichia coli* K12 con marcadores fluorescentes fusionados a genes clave del sistema SOS (ejemplo: *recA*, *sulA*, *lexA*) portados en el cromosoma. Estas construcciones genéticas nos permitirán obtener, mediante microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes, series de tiempo de la expresión genética en células individuales de la red de regulación genética del sistema SOS en respuesta a condiciones ambientales fluctuantes.

A su vez, esto nos permitirá evaluar la siguiente hipótesis: la dinámica de la regulación transcripcional del sistema SOS depende de la duración e intensidad del estímulo, así como su exposición previa al mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, E. P., and E. CHAIN. 1940. "An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin." *Nature* 146 (3713): 837–837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>.
- Andrews, Jennifer M. 2001. "Determination of Minimum Inhibitory Concentrations." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (suppl_1): 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- Baharoglu, Zeynep, and Didier Mazel. 2014. "SOS, the Formidable Strategy of Bacteria against Aggressions." *FEMS Microbiology Reviews* 38 (6): 1126–45. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>.
- Baker-Austin, Craig, Meredith S. Wright, Ramunas Stepanauskas, and J.V. McArthur. 2006. "Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance." *Trends in Microbiology* 14 (4): 176–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>.
- Bos, Julia, Qiucen Zhang, Saurabh Vyawahare, Elizabeth Rogers, Susan M Rosenberg, and Robert H Austin. 2015. "Emergence of Antibiotic Resistance from Multinucleated Bacterial Filaments." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (1): 178–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420702111>.
- Brauner, Asher, Ofer Fridman, Orit Gefen, and Nathalie Q. Balaban. 2016. "Distinguishing between Resistance, Tolerance and Persistence to Antibiotic Treatment." *Nature Reviews Microbiology* 14 (5): 320–30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>.
- Chung, Hak Suk, Zhizhong Yao, Nathan W. Goehring, Roy Kishony, and Jon Beckwith. 2009. "Rapid β -Lactam-Induced Lysis Requires Successful Assembly of the Cell Division Machinery." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21872–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911674106>.
- Couce, A., A. Rodriguez-Rojas, and J. Blazquez. 2015. "Bypass of Genetic Constraints during Mutator Evolution to Antibiotic Resistance." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282 (1804): 20142698–20142698. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2698>.
- Delcour, Anne H. 2009. "Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794 (5): 808–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>.
- Friedman, Nir, Shuki Vardi, Michal Ronen, Uri Alon, and Joel Stavans. 2005. "Precise Temporal Modulation in the Response of the SOS DNA Repair Network in Individual Bacteria." Edited by Bénédicte Michel. *PLoS Biology* 3 (7): e238. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030238>.
- Janion, Celina. 2008. "Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia Coli." *International Journal of Biological Sciences* 4 (6): 338–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18825275>.
- Justice, Sheryl S., Chia Hung, Julie A. Theriot, Daniel A. Fletcher, Gregory G. Anderson, Matthew J. Footer, and Scott J. Hultgren. 2004. "Differentiation and Developmental Pathways of Uropathogenic Escherichia Coli in Urinary Tract Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (5): 1333–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308125100>.
- Justice, Sheryl S., David A. Hunstad, Lynette Cegelski, and Scott J. Hultgren. 2008a. "Morphological Plasticity as a Bacterial Survival Strategy." *Nature Reviews Microbiology* 6 (2): 162–68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>.
- . 2008b. "Morphological Plasticity as a Bacterial Survival Strategy." *Nature Reviews Microbiology* 6 (2): 162–68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>.
- Kaiser, Matthias, Florian Jug, Thomas Julou, Siddharth Deshpande, Thomas Pfohl, Olin K. Silander, Gene Myers, and Erik van Nimwegen. 2018. "Monitoring Single-Cell Gene

- Regulation under Dynamically Controllable Conditions with Integrated Microfluidics and Software.” *Nature Communications* 9 (1): 212. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02505-0>.
- Katayama, Nami, Hiroyoshi Takano, Motoji Sugiyama, Susumu Takio, Atsushi Sakai, Kan Tanaka, Haruko Kuroiwa, and Kanji Ono. 2003. “Effects of Antibiotics That Inhibit the Bacterial Peptidoglycan Synthesis Pathway on Moss Chloroplast Division.” *Plant Cell Physiol* 44 (7): 776–81.
https://watermark.silverchair.com/pcg096.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAZ4wggGaBgkqhkiG9w0BBwagggGLMIIBhwIBADCCAYAGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMA4Gz9AHMkb-OT6x_AgEQgIIBUcII8Ao21frgi9cEj9GXV7FZyXCUhTiPSfwwIMSuiFjzmFGScY92LedYBlcCSAQRnQh6McBvThu1xkCAyluyOE1t90tzyrUr95SK28hrtrI88bGm7-qWNCbESK3noE_jBD9Cw20eDKJbs0Fr-ELy9J72sfUtZfFPVJedps-BIKt3cop56_dmZqEayHOtC0FXGEGhTBRaVmbDHyRqmhDBz32UAOWojEgN_J6rEMbnNBobmIQi4oEL9qSHQ75uUEElvPvGkmZvxpZY2gp1_9I4q-BPpUtVaySVTdcvXmpDDgkZFJvungwqWu0UnuY-K5d5sL58UsA98RIwLH0v-COT-mnmH6yIW4OcvSRlgd6bVGYuBDe5pE3AIn-5R0I25yTmjLqqApGo0AR2IGRaapcaCxdJOCbl_8gcGJofmCtnFh1YaCpG-C-Ut_Cxr7x6BRkg.
- Kong, Kok-Fai, Lisa Schneper, and Kalai Mathee. 2010. “Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology.” *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 118 (1): 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>.
- Laat, W L de, N G Jaspers, and J H Hoeijmakers. 1999. “Molecular Mechanism of Nucleotide Excision Repair.” *Genes & Development* 13 (7): 768–85.
<https://doi.org/10.1101/gad.13.7.768>.
- LAMBERT, P. 2005. “Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1471–85. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>.
- Landers, Timothy F, Bevin Cohen, Thomas E Wittum, and Elaine L Larson. 2012. “A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential.” *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)* 127 (1): 4–22.
<https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.
- Latorre, A, R Gil, F J Silva, and A Moya. 2005. “Chromosomal Stasis versus Plasmid Plasticity in Aphid Endosymbiont Buchnera Aphidicola.” *Heredity* 95 (5): 339–47.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800716>.
- Millan, Alvaro San, Jose Antonio Escudero, Danna R. Gifford, Didier Mazel, and R. Craig MacLean. 2016. “Multicopy Plasmids Potentiate the Evolution of Antibiotic Resistance in Bacteria.” *Nature Ecology and Evolution* 1 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>.
- Miller, C., Line Elnif Thomsen, Carina Gaggero, Ronen Mosseri, Hanne Ingmer, and Stanley N Cohen. 2004. “SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality.” *Science* 305 (5690): 1629–31.
<https://doi.org/10.1126/science.1101630>.
- Million-Weaver, Samuel, and Manel Camps. 2014. “Mechanisms of Plasmid Segregation: Have Multicopy Plasmids Been Overlooked?” *Plasmid* 75: 27–36.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.002>.
- Pisabarro, A G, R Prats, D Vázquez, and A Rodríguez-Tébar. 1986. “Activity of Penicillin-Binding Protein 3 from Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 168 (1): 199–206.
<https://doi.org/10.1128/JB.168.1.199-206.1986>.
- Ramalho, Tiago, Andrea Meyer, Andrea Mückl, Korbinian Kapsner, Ulrich Gerland, and Friedrich C. Simmel. 2016. “Single Cell Analysis of a Bacterial Sender-Receiver

- System.” Edited by Michael M. Meijler. *PLOS ONE* 11 (1): e0145829.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145829>.
- Rodriguez-Beltran, Jeronimo, J. Carlos R. Hernandez-Beltran, Javier DelaFuente, Jose A. Escudero, Ayari Fuentes-Hernandez, R. Craig MacLean, Rafael Peña-Miller, and Alvaro San Millan. 2018. “Multicopy Plasmids Allow Bacteria to Escape from Fitness Trade-Offs during Evolutionary Innovation.” *Nature Ecology & Evolution* 2 (5): 873–81. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0529-z>.
- San Millan, Alvaro, Jose Antonio Escudero, Danna R. Gifford, Didier Mazel, and R. Craig MacLean. 2016. “Multicopy Plasmids Potentiate the Evolution of Antibiotic Resistance in Bacteria.” *Nature Ecology & Evolution* 1 (1): 0010. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>.
- Schoemaker, J M, R C Gayda, and A Markovitz. 1984. “Regulation of Cell Division in Escherichia Coli: SOS Induction and Cellular Location of the SulA Protein, a Key to Lon-Associated Filamentation and Death.” *Journal of Bacteriology* 158 (2): 551–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327610>.
- Simmons, Lyle A, James J Foti, Susan E Cohen, and Graham C Walker. 2008. “The SOS Regulatory Network.” *EcoSal Plus* 2008 (July).
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.3>.
- TUOMANEN, E., R. COZENS, W TOSCH, O. ZAK, and A. TOMASZ. 1986. “The Rate of Killing of Escherichia Coli by β -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth.” *Microbiology* 132 (5): 1297–1304.
<https://doi.org/10.1099/00221287-132-5-1297>.
- Valen, David A. Van, Takamasa Kudo, Keara M. Lane, Derek N. Macklin, Nicolas T. Quach, Mialy M. DeFelice, Inbal Maayan, Yu Tanouchi, Euan A. Ashley, and Markus W. Covert. 2016. “Deep Learning Automates the Quantitative Analysis of Individual Cells in Live-Cell Imaging Experiments.” Edited by Martin Meier-Schellersheim. *PLOS Computational Biology* 12 (11): e1005177.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005177>.
- Webber, M. A., and L J V Piddock. 2003. “The Importance of Efflux Pumps in Bacterial Antibiotic Resistance.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (1): 9–11.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.
- WRIGHT, G. 2005. “Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1451–70.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>.
- Wu, Ling Juan, and Jeff Errington. 2012. “Nucleoid Occlusion and Bacterial Cell Division.” *Nature Reviews Microbiology* 10 (1): 8–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2671>.
- Xiao, Jie, and Erin D. Goley. 2016. “Redefining the Roles of the FtsZ-Ring in Bacterial Cytokinesis.” *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.008>.