

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE QUIMICA



ESCUELA DE QUIMICA  
FAC. DE QUIMICA

EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA DNA GIRASA  
DURANTE LAS ETAPAS INICIALES EN LA  
ESPORULACION DE Bacillus subtilis

T E S I S

DAVID GOVEZENSKY KRUTT

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 3



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.

## I N D I C E

	PÁGS
I N D I C E	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. OBJETIVO	5
2. INTRODUCCION	5
3. GENERALIDADES	6
3.1. Inducción experimental de la esporulación	6
3.2. Etapas de la esporulación	8
3.3. Bioquímica de la esporulación	13
3.4. Relación de la inducción de la esporulación con la replicación del DNA y el ciclo de división celular	21
3.5. La DNA girasa y su relación con la esporulación	25
4. MATERIAL Y METODOS	
4.1. Microorganismos	33
4.2. Crecimiento del cultivo bacteriano y resuspensión en medio de esporulación	33
4.3. Síntesis de DNA, RNA y proteínas	34
4.4. Síntesis de DNA en células colonizadas	35
4.5. Obtención de <u>Bacillus subtilis</u> resistente a novobiocina	37
4.6. Método de transducción mediada por el fago-PBS-1	38
4.7. Mapeo genético	39
4.8. Preparación de extractos proteicos radiactivos de <u>Bacillus subtilis</u> en esporulación	39
4.9. Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y flurografía	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Efecto de la novobiocina sobre el crecimiento vegetativo y en esporulación	43
5.2. Relación entre el efecto de novobiocina y la síntesis de DNA, RNA y proteínas en crecimiento vegetativo de <u>Bacillus subtilis</u>	44
5.3. Efecto de la novobiocina en síntesis de DNA, RNA y proteínas en esporulación de <u>Bacillus subtilis</u> .	47

	Pág.
5.4. Efecto de novobiocina en síntesis de DNA de células en esporulación tratados con tolueno	55
5.5. Obtención de mutantes resistentes a novobiocina y su selección	58
5.6. Efecto de novobiocina en síntesis de DNA, - RNA y proteínas de las mutantes resistentes en crecimiento vegetativo	60
5.7. Efecto de novobiocina sobre síntesis de DNA, RNA y proteínas de las mutantes resistentes, en esporulación	60
5.8. Mapeo genético por transducción mediada por el fago PBS-1	67
5.9. Obtención de patrones electroforéticos de -- NiI y NiI-9, a diferentes tiempos de esporulación en ausencia y presencia de novobiocina.	72
6.0 DISCUSION	77
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

- SDS - Dodecilo sulfato de sodio
- CH - Hidrolizado de caseína
- ME - Medio de esporulación
- BHIB - Caldo de infusión cerebro corazón
- TCA - Acido tricloroacético
- HPUra- 6-(p-hidroxifenilazo)-uracilo
- NOV - Novobiccina
- EMS - Etil metil sulfonato
- EDTA - Acido etilén diamino tetraacético
- PMSF - Fluoruro de fenil metil sulfonilo
- cpm - cuentas por minuto
- CHES - Acido 2(N-ciclohexilamino)etanosulfónico
- Tris - Tris(hidroximetil)-amino metano
- D.O - Densidad óptica
- mamp - miliamperes
- µCi - micro Curie
- nm - nanómetro
- rpm - revoluciones por minuto
- µg - microgramos
- µl - microlitros

No creo en ningún investigador hasta que lo he oído decir tres veces "lo dudó" y dos veces "no lo sé".

Albert Einstein.

"No puede existir vida sin cambio, así como no puede existir desarrollo sin cambio. Temer a lo que es diferente o desconocido es temerle a la vida"

Exposición impresionista  
1913.

## 1) OBJETIVO

Se pretende estudiar el efecto de inhibidores de la DNA girasa sobre la síntesis de macromoléculas durante la esporulación de Bacillus subtilis. A la vez, tratar de relacionar la inhibición del proceso esporulatorio debida a los agentes químicos con cambios cualitativos en los patrones protéicos a diferentes tiempos de la esporulación.

## 2) INTRODUCCION

La esporulación es un ejemplo de diferenciación celular primitiva que es llevada a cabo por ciertos géneros de bacterias Gram positivas, como Bacillus y Clostridium, en condiciones inadecuadas de nutrición.

Las endosporas son formas latentes, células especializadas que no presentan actividad metabólica aparente y cuya característica principal es la de resistir agentes externos, - tales como la desecación, sustancias tóxicas, las radiaciones y el calor.

La espora difiere de la célula madre en morfología y en constituyentes bioquímicos. La longevidad de las esporas y su gran resistencia a condiciones adversas están acopladas con la capacidad de germinar muy rápidamente en un ambiente-

adecuado. El hecho de que algunas especies esporulantes sean patogénicas, mientras que otras causan la putrefacción de alimentos, las han hecho de interés médico y en la industria alimenticia.

La formación de esporas es vista como una forma primitiva de diferenciación celular dado que presenta ciertos puntos en común con el desarrollo celular de organismos primitivos - tales como levaduras, mohos, Acetobularia y erizos de mar (revisados por Mandelstam, 1971).

En condiciones adecuadas, casi cada célula en la población produce una espora, pero generalmente el índice obtenido experimentalmente está lejos de ser cuantitativo.

### 3) GENERALIDADES

El modelo más utilizado para el estudio de la esporulación ha sido Bacillus subtilis, aunque se asume que gran parte de las características del proceso son comunes a muchos o quizás a todos los formadores de esporas.

#### 3.1. Inducción experimental de la esporulación.

La formación de esporas es iniciada por inanición de una fuente de carbono o nitrógeno y a veces, de fosfatos. Experimentalmente se utilizan dos métodos para inducir la esporula-



ción. En el primero, un procedimiento de agotamiento de nutrientes, en el cual las bacterias crecen hasta que algún nutriente se vuelve limitante y entonces esporulan. El tiempo al cual el crecimiento cesa su fase exponencial es considerado como el tiempo de inducción ( $t_0$ ) y períodos de una hora -- después de él son denominados  $t_1, t_2$ , etc.

El método de agotamiento tiene la ventaja de la simplicidad pero tiene desventajas considerables. El  $t_0$  no está claramente definido y el crecimiento vegetativo puede avanzar -- lentamente por algún tiempo. Además cuando las células empiezan a esporular, se encuentran en un ambiente químico complejo que sufre cambio continuo, ya que existirán metabolitos residuales de la primera etapa que complican la medición e interpretación de los cambios bioquímicos que acompañan a la esporulación.

Para evitar algunas de estas dificultades, Sterlini y Mandelstam (1969) introdujeron una técnica de resuspensión. Un cultivo en crecimiento exponencial en un medio rico sin glucosa es centrifugado y las células son transferidas a un medio de resuspensión que contiene un sustrato carbonado apropiado, como glutamato (no fácilmente aprovechado por la célula).

Este método elimina grandemente las complicaciones de tener presentes en el medio de cultivo un gran número de metabo

litos cuyas identidades y concentraciones son desconocidas. - El método también da un tiempo preciso para  $t_0$  y una mejor -- sincronía de la esporulación. Aún así, existen dificultades -- debido a que al tiempo de la resuspensión la población celu-- lar contiene cromosomas en todos los estados de replicación, -- lo que causa una asincronía celular inevitable. Este método -- a pesar de ello, es el más apropiado para experimentos de mag -- caje radiactivo dado que se desarrolla en un medio definido.

El método de agotamiento es más conveniente para experi-- mentos a largo plazo y es más comparable al proceso tal y co -- mo ocurre naturalmente o en medio sólido.

Aunque el orden general de los eventos de la esporula -- ción es igual con ambas técnicas, el tiempo preciso al cual -- sucede un evento particular puede diferir ligeramente.

Incubando a 37°C cultivos de Bacillus subtilis, se ha -- visto que aparecen esporas resistentes al calor de 7 a 9 ho -- ras después del punto de inducción (Caves et al 1969).

### 3.2. Etapas de la esporulación

La secuencia de los cambios morfológicos que resultan en -- la formación de una spora se ha elucidado por microscopía -- electrónica y es similar para todas las especies de Bacillus -- y Clostridium que han sido estudiados. Los eventos morfoló --

gicos han sido estudiados por diversos autores. Las últimas revisiones que han sido publicadas al respecto son las de - - Piggot y Coote (1976) y Young y Mandelstam (1980).

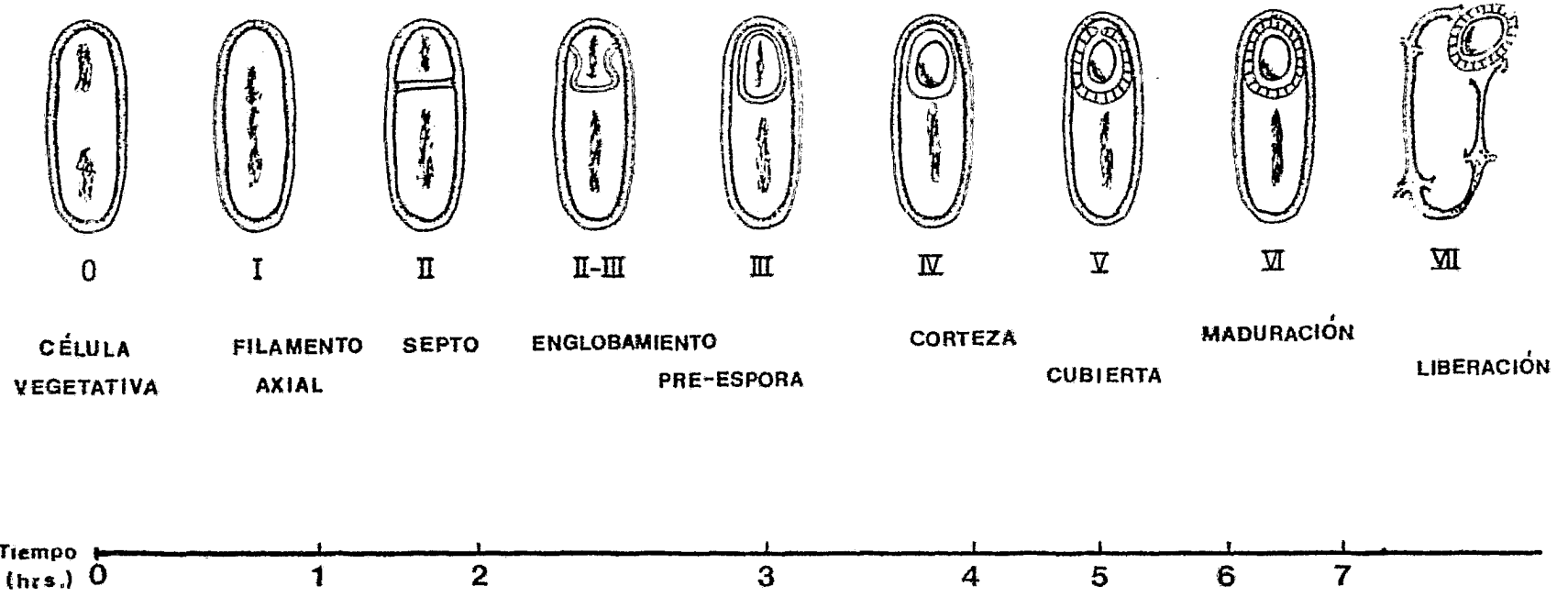
Los eventos son representados en un diagrama basado en - los estudios realizados por microscopía electrónica (Fig. I).

Aunque el proceso es continuo, por acuerdo se ha dividido en etapas, las cuales fueron definidas por Ryter, (1965) y son representadas por números romanos.

Etapa 0 y I ( $t_0 - t_{1.0}$ ).- La etapa 0 se refiere a la célula vegetativa. Esta contiene 2 o más horquillas de replicación del cromosoma. Los cromosomas se ven como cuerpos discretos, compactos y ligeramente esféricos en el citoplasma. Después de la transferencia al medio de resuspensión se fusionan éstos para formar un filamento axial al que se designa -- por conveniencia, como etapa I de esporulación. Estos filamentos axiales pueden ser vistos en especies bacterianas no - esporulantes, en condiciones adversas de nutrición, por lo -- que se piensa que representa una respuesta no específica del-DNA cuando las células se encuentran en un medio pobre.

Los cromosomas se separan subsecuentemente y uno de ellas migra a una posición cercana a uno de los polos de la célula. En micrografías electrónicas pueden verse pequeños mestomas- en posiciones subpolares en esta etapa.

FIGURA I



Los cambios físicos que se han llevado a cabo y los cambios bioquímicos que los han causado son críticos en el sentido que han colocado a los cromosomas en la posición correcta para la división asimétrica de la célula, por medio de la formación del septo y que es la base del desarrollo total subsecuente (Mandelstam, Sterlini y Kay, 1971; Dawes, Kay y Mandelstam, 1971). Miyakawa et al, (1982), han reportado que la iniciación de la formación del septo requiere la terminación de la replicación del DNA del ciclo celular previo.

Etapa II ( $t_{1.0} - t_{1.5}$ ). - Formación del Septo. Un septo-membranoso se forma en una posición subpolar y su posición es determinada por el hecho de que el cromosoma se halla en un extremo de la célula con su mesosoma acompañante. El septo es formado por la invaginación de la membrana celular en una manera similar a la que normalmente se lleva a cabo durante la división celular (Miyakawa et al 1982,) pero difiere del septo de división en dos aspectos importantes: primero, es subpolar, no central. Segundo, tiene consigo material de la pared celular, aunque después ya no presente deposición de material de la pared al crecer el septo. Existe evidencia de la presencia del peptidoglicanos en el septo, posiblemente para dirigir el crecimiento de la membrana al formarse el septo, además la penicilina inhibe la formación del septo.

Etapa II-III. ( $t_{1.5} - t_{2.5}$ ). - Englobamiento. Al terminar -

la etapa II hay dos células de desigual tamaño. La célula mayor engloba a la más pequeña. Los dos puntos de cercanía del septo a la pared celular parecen moverse hacia el polo. Aparentemente es necesaria la síntesis de membrana en la célula-madre para llevarla a cabo.

Etapa III ( $t_{2.5} - t_{3.0}$ ).-- El englobamiento culmina en la fusión membranal en el polo de la célula y la estructura completamente englobada se desprende de la membrana de la célula madre. El proplasto de espora se forma en este momento.

Etapa IV ( $t_3 - t_4$ ) Formación de la corteza.-- Para formar la corteza se deposita peptidoglicano entre las membranas del protoplasto. La enzima diaminopimelato ligasa aparece durante la esporulación, y parece sintetizarse en la célula madre solamente. Esto implica que la biosíntesis de la corteza se lleva a cabo en la membrana externa de la espora y que es dirigida por el cromosoma de la célula madre.

En esta etapa, las esporas se vuelven visibles como - - áreas refráctiles de la célula al verse en microscopio de contraste de fase.

Etapa V ( $t_4 - t_{5.5}$ ). Formación de la cubierta. Se depositan capas sucesivas de proteína alrededor de la corteza, grandes cantidades de cisteína se incorporan dentro de ella y la espora se vuelve resistente al octanol y a otros solventes orgánicos.

Etapa VI ( $t_{5.5} - t_7$ ) Maduración. - La espora se encoge ligeramente y se vuelve resistente a temperaturas altas y -- otras condiciones físicas adversas. Se ha demostrado que ocurre una deshidratación de la espora, que la hace más resistente al calor (Bradbury et al 1981, Beamon et al 1982). Esta etapa representa el fin de la diferenciación.

Etapa VII. Liberación de la espora. - La célula madre se lisa y se libera la espora madura. No es ya una etapa de la esporulación realmente.

### 3.3. Bioquímica de la esporulación.

Las actividades bioquímicas que aparecen durante la esporulación pueden ser necesarias y específicas para el proceso o no serlo.

Mandelstam (1969, 1971, 1976), Piggot y Coote (1976) y Young y Mandelstam (1980) entre otros han dividido los eventos bioquímicos en cuatro categorías:

1.- Eventos que son esenciales y específicos de la esporulación. Aparición de componentes que no surgen en el estado vegetativo de crecimiento y que se encuentran únicamente en células esporulantes y que son necesarias para la formación de la espora.

2.- Eventos que son específicos de la esporulación pero no son esenciales. Serían los efectos colaterales disparados por la secuencia primaria de eventos pero que no tienen una función en el proceso.

3.- Eventos que son esenciales pero no específicos de esporulación. Cambios en funciones vegetativas que son necesarias para la esporulación, como el aumento de actividad de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, lo cual mantiene niveles adecuados de ATP bajo las condiciones de inactivación que promueven al proceso.

4.- Eventos irrelevantes. Cambios que suceden debido a la variación nutricional utilizada para inducir la esporulación pero que no están conectados con ella.

El estudio de mutantes asporógenas (Spo-) ha sido muy útil para intentar colocar los eventos bioquímicos en alguna de las categorías anteriores. Mutaciones en eventos no necesarios no afectan la esporulación y mutaciones en eventos esenciales sí lo hacen. Si el evento es específico del proceso no afectará el crecimiento vegetativo. Análogamente, eventos bioquímicos asociados con la esporulación no deberían expresarse en mutantes incapaces de esporular.

Dancer y Mandelstam (1975) sugirieron un criterio adicional para distinguir eventos de la primera y la segunda categorías de otros eventos. Como se verá más adelante la induc-



ción de la esporulación depende de la replicación del DNA. --  
 Partiendo de ese hecho ellos propusieron que sólo los eventos  
 bloqueados en su aparición por la inhibición de síntesis de -  
 DNA fueran considerados parte de la secuencia primaria de es-  
 porulación o como efectos colaterales del proceso.

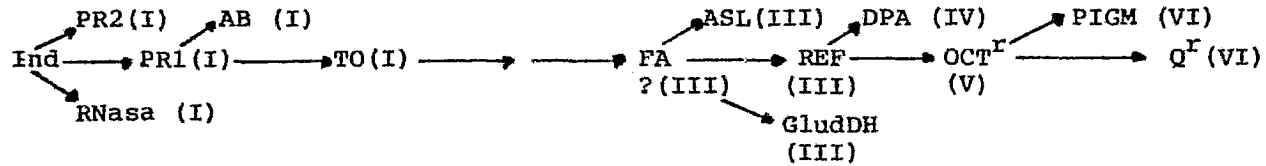
Actualmente se acepta que la esporulación consiste de --  
 una secuencia ordenada de cambios estructurales acoplados a -  
 una secuencia ordenada de eventos bioquímicos, en la que la -  
 aparición de cualquier evento depende de la aparición exitosa  
 de aquellos eventos que suceden en primera instancia.

La esporulación puede verse, entonces, como una secuen--  
 cia dependiente de eventos, esto es, una secuencia en la cual  
 una falla en cualquier punto causará el fracaso de toda la se-  
 cuencia. Este fenómeno se define como pleiotropía.

Desde un punto de vista a priori, uno puede inferir la -  
 existencia de una secuencia primaria de eventos dependientes.  
 Cada evento en esta secuencia actuaría directa o indirectamen-  
 te como un gatillo, un inductor del evento siguiente. Desa--  
 fortunadamente, ninguno de estos efectores se han podido ais-  
 lar o identificar. Cualquiera que sea su identidad, alguno -  
 de esos efectores primarios inducirán la producción de otras-  
 sustancias que no forman parte de la secuencia principal. Es-  
 tas sustancias producidas colateralmente están relacionadas -  
 con la esporulación y son útiles como eventos marcadores. - -  
 (Fig.II).

FIGURA II

SECUENCIA PRIMARIA DE EVENTOS Y SECUENCIA COLATERAL



Ind - Inducción

Marcadores de Etapa I (I)

- PR 1 \* Serina proteasa
- PR 2 \* Metaloproteasa
- TO \* Recambio de proteínas
- AB \* Producción de antibiótico

Marcadores de Etapa III

- FA \* Fosfatasa alcalina
- ? (se duda que sea parte esencial del proceso)
- ASL \* Acido sulfoláctico
- Glu DH\* Glucosa deshidrogenasa

Marcadores de Etapa IV

- REF \* Refractilidad de la espora
- DPA \* Acido dipicolínico

Marcadores de Etapa V

- OCT<sup>r</sup> \* Resistencia a octanol

Marcadores de Etapa VI

- Q<sup>r</sup> \* Resistencia al calor
- PIGM \* Producción de pigmento

El estudio de las mutantes asporógenas ha demostrado la pleiotropía del proceso. La morfología y la bioquímica son interdependientes. Si la etapa en la cual una mutante es bloqueada se determina por microscopía electrónica, se encuentra que los eventos bioquímicos están bloqueados en el punto correspondiente.

Al trabajar con una doble mutante asporógena, una cepa que contenía 2 mutaciones de diferente etapa del proceso, e induciéndola a esporular, el fenotipo observado en ese organismo indicaba que la secuencia de eventos se expresaba normalmente hasta llegar a la etapa de la primera mutación, dándole a la célula el comportamiento de esa etapa. La etapa donde se encontraba la siguiente mutación no llegaba a expresarse (Coote y Mandelstam 1973). Esto demostraba el modelo pleiotrópico del proceso.

Una de las preguntas que con más insistencia se hacen -- respecto de la esporulación es ¿Cuál es la señal metabólica que desencadena el proceso? ya que debe de existir un sistema que altere el metabolismo celular completamente, reestructurando por tanto la expresión de la información genética.

No existe duda de que la esporulación es una respuesta a una privación nutricional. Con una buena fuente de carbono y nitrógeno, las bacterias crecen vegetativamente y la esporulación está reprimida. La deficiencia en cualquiera de ellos -

permitirá la formación de esporas.

Los estudios actuales han sugerido que la probabilidad - de que una célula siga la vía de la esporulación de preferencia al crecimiento vegetativo está gobernada por dos factores diferentes:

Uno, el estado nutricional del cultivo, lo que está presumiblemente reflejado en la concentración de un efector bioquímico intracelular y ésto a su vez determina la proporción de células en la población que serán inducidas a esporular. - Otro, es la probabilidad de que en cualquier momento una célula estará en la condición fisiológica correcta para responder al efectos bioquímico.

Los estudios de Schaeffer y sus colaboradores (1965) han sugerido la hipótesis de que la esporulación es reprimida por metabolitos nitrogenados (derivados del metabolismo de glucosa) cuyas concentraciones dependen de la velocidad del metabolismo de las fuentes de carbono y nitrógeno. Como la esporulación puede también ser iniciada por inanición de fosfatos, se sugirió que los metabolitos represores podrían estar fosforilados.

Donohue y Bernlohr (1978) mostraron que ni la concentración de iones amonio, ni la glutamina, ni la glutamina sintetasa tienen una función directa en el control de la esporulación, al estudiar la relación entre represión catabólica de -

fuentes de carbono y nitrógeno con la esporulación de Bacillus licheniformis.

Existen reportes (Ochi et al 1981, Dhariwal et al 1982 y Ikehara et al 1982), en los que se planteó la relación de metabolitos fosforilados y la inducción de la esporulación en Bacillus subtilis.

Ikehara (en 1982) mostró que la desaparición de ppGpp - - (guanosina tetrafosfato), está relacionada con la iniciación de la esporulación, al trabajar con decoyinina, un antibiótico inhibidor de la síntesis de GMP, que inducía la esporulación - en cultivos tratados.

En contradicción con el reporte anterior Ochi, (1981) en un estudio en el cual se trabajó con privación parcial de aminoácidos, observó que la iniciación de la esporulación en Bacillus subtilis era debida a una respuesta rigurosa a la falta - parcial de aminoácidos. Reportó que los niveles de ppGpp se - elevaban en condiciones de falta de aminoácidos y bajaba la -- concentración de GTP, al inducirse la esporulación (datos que confirmaban evidencias anteriores).

Dhariwal (1982) reportó asimismo, que la limitación parcial de nucleótidos induce a la fosfodiesterasa I y a la 5-nucleotidasa en Bacillus subtilis. Esto provoca que al existir limitación de guanina, la esporulación se induzca, lo que ocurre similarmente con adenina. Al existir limitación de uraci-

lo, la esporulación no se inicia.

Esta evidencia ha ido mostrando una interrelación entre niveles de aminoácidos y niveles de nucleótidos en la inducción de la esporulación y una participación notoria de GTP y metabolitos relacionados como ppGpp en la inducción a la esporulación lo que concuerda con el modelo de metabolitos nitrogenados fosforilados como efectores positivos o negativos del proceso (Schaeffer et al 1965, Donohue y Bernlohr (1978).

Dawes y Mandelstam (1970) mostraron, en cultivos continuos de Bacillus subtilis en quimiostato, que existía un rango continuo de probabilidad de que se produjera formación de esporas, y que la incidencia de formación de esporas estaba en función de la velocidad de crecimiento utilizando para ello diferentes limitantes nutricionales.

La incidencia de esporas fue máxima en las velocidades de crecimiento más bajas pero en todas las velocidades se encontró cierto grado de esporulación.

Los resultados fueron consistentes con la hipótesis de que la esporulación es un fenómeno represible y que el represor está en altas concentraciones cuando las células crecen en un medio conteniendo buenas fuentes de carbono y nitrógeno. Aún así, hasta que se sepa a ciencia cierta si el control de la esporulación es positivo o negativo, y hasta que se haya elucidado el funcionamiento del primer operón concerniente --

con la esporulación, es difícil que el efector catabólico sea identificado (Young y Mandelstam 1980).

De cualquier forma, es razonable suponer que el estímulo de desnutrición resulte ya sea en la producción de un inductor o la remoción de un represor de la esporulación.

#### 3.4. Relación de la inducción de la esporulación con la replicación del DNA y el ciclo de división celular.

La inducción de la esporulación requiere replicación del DNA. Este hecho distingue claramente a la esporulación de -- otras funciones controladas por represión catabólica de Bacillus subtilis.

Cuando Bacillus subtilis fue cultivado en un quimiostato con fuentes de carbono o nitrógeno limitante, se produjo -- una población mixta de células vegetativas, células esporulantes y esporas (Dawes y Mandelstam 1970). Si células creciendo rápidamente se exponían a períodos repetidos de inanición-- (al cambiar la velocidad de dilución del medio de cultivo, de rápida a lenta, por una fracción del tiempo de generación) só lo una proporción de la población celular era inducida durante cada etapa de inanición. Por ello parecía que algunas células en la población eran sensibles al estímulo de inanición, mientras que otras no lo eran.

Ellos concluyeron que las células adquirían sensibilidad

para esporular sólo en una etapa específica del ciclo celular.

Cuando células vegetativas de Bacillus subtilis son transferidas al medio de esporulación, las células hermanas tienden a permanecer unidas. Dawes et al (1971) estudiando ese sistema, reportaron que ambas células siguen, ya sea un ciclo de crecimiento vegetativo juntas o proceden a esporular casi en perfecta sincronía. Estas observaciones también sugieren que el estímulo de inducción es efectivo sólo en un período crítico durante el ciclo celular.

El hecho de que una división celular debe ocurrir después de la inducción a la esporulación también explica por qué esporas germinando no pueden reesporular hasta que un segundo ciclo de replicación se ha iniciado, esto es, hasta que el potencial de replicación del DNA de la espora en germinación fuera suficiente para generar dos células hijas, cada una con teniendo dos cromosomas (Keynan et al 1976).

Estos experimentos sugirieron que la esporulación en Bacillus subtilis no ocurre en las células inducidas sino que es expresada en la siguiente generación:

Existen evidencias muy claras de que:

1) Las células sólo pueden ser inducidas a esporular durante un tiempo muy limitado del ciclo de crecimiento y este período parece ser determinado por el estado de la replica-



ción del cromosoma (Mandelstam y Higgs, 1974).

2) Aún cuando la esporulación haya sido inducida (y las células estando en cualquier etapa de la replicación cromosomal son capaces de expresar eventos tempranos de esporulación) la secuencia de eventos se detendrá en el momento en que se impida la terminación de la replicación del cromosoma (Dunn et al 1978, Clarke y Mandelstam 1980).

Mandelstam, Sterlini y Kay (1971) trabajando con una cepa de Bacillus subtilis auxótrofa a timina observaron que si células de esa cepa eran transferidas a un medio de esporulación y eran privadas de timina la esporulación no ocurría. Reportes posteriores indicaban que aún el evento más temprano asociado a la esporulación como es la producción de serina---proteasa extracelular era bloqueada a menos que se suplementara el medio con timina (Dancer y Mandelstam 1975). Esto ocurrió en esa cepa particular de Bacillus subtilis.

Por tanto, se concluyó que era requerida la síntesis de-DNA, pues los ciclos de replicación del cromosoma debían ser terminados para permitir que la esporulación prosiguiera.

Presumiblemente, la segregación de los cromosomas de la célula madre y de la presunta preespora, depende de la terminación del cromosoma como sucede con la segregación del cromosoma durante la división celular normal (Miyakawa et al 1982).

La inducción de la esporulación parece ocurrir solamente mientras una región crítica del genoma, bastante cercana al origen, está siendo replicada, en condiciones inadecuadas de nutrición (Mandelstam y Higgs, 1974). Ellos usaron una mutante de Bacillus subtilis (ts-134) que era sensible a la temperatura para la iniciación de la replicación del DNA, para obtener cultivos en los cuales la población llevara a cabo un ciclo sincrónico de replicación del DNA, en medio rico. A intervalos durante esa replicación se transfirieron muestras de células a un medio pobre para inducir la esporulación. Los resultados mostraron que la capacidad de esporular fue baja - en las muestras iniciales, llegó a un pico a los 15 minutos - después de que la síntesis de DNA había empezado y después declinó. La esporulación llegó a un nuevo pico de inducción sólo hasta el siguiente ciclo de replicación, a los 15 minutos - de iniciado.

En estos experimentos la frecuencia de esporulación fue baja, y se pensó que quizás los resultados fueron artefactos - debidos a los cambios de temperaturas utilizados para obtener la sincronía. Por ello, se abordó el problema desde otro punto de vista.

Cuando se agregó HPUra, inhibidor específico de la DNA-polimerasa III (replicasa) y por tanto, inhibidor específico de síntesis de DNA, a intervalos, a porciones de un cultivo - asincrónico inducido a esporular, la población celular empezó

a escapar del efecto inhibitorio de la droga en ME (Dunn et al 1978). Dado que el tiempo de replicación del cromosoma de Bacillus subtilis bajo estas condiciones de cultivo era de 55 minutos, y las células escapaban del efecto a los 35-40 minutos de inducidas a esporular, esto implicaba que las primeras células que escapaban habían completado los primeros 15-20 minutos de la replicación del cromosoma al momento en que la -- falta de nutrientes fue impuesta. La afirmación de que la esporulación no puede ocurrir sin la terminación del cromosoma-- fue confirmada por análisis de frecuencia de genes que corroboraba estudios genéticos anteriores de Oishi et al (1964).

Los resultados obtenidos por Dunn et al (1978) confirmaban por medio de un método totalmente diferente, que existía un punto crítico en la región del cromosoma situado a los 15-20 minutos del origen de replicación.

### 3.5. La DNA girasa y su relación con la esporulación.

El requerimiento de síntesis de DNA para la esporulación fue estudiado más profundamente al utilizarse inhibidores de la DNA girasa, enzima necesaria para que se lleve a cabo la -- replicación cromosomal. A la vez, la función de esta enzima-- en un proceso tan especializado como la esporulación fue considerada.

La enzima DNA girasa es una topoisomerasa, esto es, afec

ta directamente la superhelicidad del DNA (Gellert et al, - - 1976a). Entre las actividades que se han encontrado que efectúa la girasa están:

- 1) Cataliza el superenrollamiento del DNA de doble hélice en presencia de ATP (Gellert et al, 1976a, Sugino et al, 1978).
- 2) Cataliza el relajamiento del DNA enrollado en ausencia de ATP, por medio de una reacción de rompimiento y unión (Sugino et al, 1977; Gellert et al, 1977, - - Liu y Wang, 1978; Peebles et al, 1979; Sugino y Bott, 1980).
- 3) Presenta actividad de ATPasa dependiente de DNA y - - unión específica de sitio al DNA.(Peebles et al 1979).
- 4) Efectúa ruptura de la doble hélice del DNA inducida - por ácido oxolínico en presencia de SDS (Snyder y - - Drlica, 1979; Peebles et al, 1979).

La DNA girasa debe ser, por tanto, una enzima esencial para la replicación, recombinación, reparación y transcripción del DNA, a juzgar por sus actividades.

En E. coli la girasa consta de 2 subunidades, la A y la-B, codificadas por los genes nal A y cou, de peso 105000 y -- 93000 respectivamente (Peebles et al, 1979).

En Bacillus subtilis, la subunidad A, codificada por el-

gene nalA, tiene un peso de 100000 y la subunidad B, codificada por el gene novA, de 85000. (Orr y Staudenbauer, 1982).

La holoenzima de girasa se considera que existe como un tetramero  $A_2B_2$  (Peebles et al, 1979; Sugino y Bott, 1980; Orr y Staudenbauer, 1982).

La proteína Gyr A, constituye el blanco para ácido oxolínico ( $K_i = 10$  mM) y ácido nalidíxico (Gellert et al, 1977; Sugino et al 1977), mientras que la proteína Gyr B es el blanco para novobiocina ( $K_i = 0.002$  M) y coumermicina ( $K_i$  similar) - (Gellert et al, 1976; Mizuuchi et al, 1978; Sugino et al -- 1978; Peebles et al, 1979).

La girasa se ha aislado de E. coli (Gellert et al 1976;- 1977), de B. subtilis (Sugino y Bott, 1980; Orr y Staudenbauer, 1982) y M. luteus (Liu y Wang, 1978), siendo enzimas con características estructurales similares, funciones y actividades específicas comparables, así como similares requerimientos de cofactores (ATP,  $Mg^{2+}$ ) y la misma sensibilidad a los antibióticos utilizados. Una similitud muy notable es la especificidad de los sitios de unión con el DNA, ya que la especificidad de los sitios de corte de la girasa de E. coli y la de B. subtilis, inducidas por ácido oxolínico fue casi idéntica. (Sugino y Bott, 1980).

In vitro, la girasa convierte a un DNA circular cerrado-relajado en DNA superenrollado negativamente, lo cual es una-

actividad dependiente de ATP, estado que facilita la unión de un número de enzimas al DNA (Wang, 1978). Además, la girasa puede aliviar la tensión de enrollamiento que es generada por el desenrollamiento de una doble hélice durante la síntesis de DNA. El quitar el superenrollamiento positivo es una función deseable para una topoisomerasa. El superenrollamiento positivo se genera en DNA forzado rotacionalmente por la replicación y ello prevendría la continuación de la síntesis.

Al estudiar el efecto de los inhibidores de la DNA girasa sobre células de B. subtilis en esporulación y comparar los resultados obtenidos con HPUra, Vázquez y Mandelstam (1982) mostraron que la inhibición rápida y completa de la síntesis de DNA en células creciendo exponencialmente debida a los inhibidores de la girasa no ocurría en células inducidas a esporular en ME. Allí la síntesis de DNA no era detenida sino que sólo era retrasada por los inhibidores, aunque la esporulación fuera totalmente inhibida.

Ellos efectuaron la medición de los tiempos de escape de la esporulación a los efectos de los inhibidores. El tiempo de escape, es definido como el tiempo al cual, a pesar de agregar el inhibidor, las células inducidas a esporular terminan el proceso en forma normal.

Los tiempos de escape medidos para los inhibidores de la DNA girasa fueron diferentes al tiempo de escape obtenido con

HPura (35-40 minutos, véase pag 25) (Dunn et al, 1978). Dichos tiempos resultaron ser de 15 minutos para ácido oxolínico y 90 minutos para novobiocina.

Concluyeron que la inhibición de la esporulación por inhibidores de girasa no estaba correlacionada con su efecto sobre síntesis de DNA, es decir, con la terminación de la replicación del cromosoma. Presentaron evidencia de que la inhibición de la esporulación resultaba del efecto sobre síntesis de proteínas, al medir la síntesis total de proteínas. Esta se veía bloqueada parcialmente. También mostraron que el efecto de los inhibidores de girasa sobre la aparición de enzimas individuales ligadas al proceso (serina-proteasa, fosfatasa alcalina, amilasa) era errático pero reproducible, y existía inhibición preferencial de la síntesis de algunas de esas enzimas pero no de otras, lo que sugería que la actividad de la girasa era necesaria para la transcripción de algunos genes pero no de otros.

Finalmente, Vázquez y Mandelstam (1982) especularon con la posibilidad de que ambas subunidades de la girasa tuvieran diferentes funciones en la esporulación, ya que los dos inhibidores de girasa utilizados afectaban de forma diferente a la síntesis de enzimas ligadas al proceso y de que el tiempo de escape de la esporulación para cada inhibidor fuera muy distinto. Así, un gene cuya transcripción fuera seriamente decrecida por un inhibidor podría ser insensible al otro.

Existe mucha evidencia que apunta hacia el involucramiento de la girasa en la transcripción.

En E. coli, existe modulación de la expresión genética - con inhibidores de girasa, utilizando genes catabolito sensibles como modelo de estudio (Sanzey 1979).

Smith, Kubc e Imamoto (1978) han estudiado transcripción in vitro en presencia de inhibidores de girasa, y han obtenido evidencia de que la girasa está comprometida en la transcripción del operón trp utilizando como sistemas a E. coli y a  $\phi 80$  trp.

Lang-Yang et al (1979), estudiando la sensibilidad diferencial de la expresión genética in vitro en E. coli a inhibidores de girasa también mostraron que el superenrollamiento del DNA puede incrementar la transcripción en ciertos promotores.

Gómez E, C. (1981), observó en minicélulas de E. coli -- conteniendo pBR322, que la síntesis de algunos polipéptidos - fue reducida en presencia de inhibidores de girasa, mientras la síntesis de otros fue incrementada. Allí se decía que los inhibidores de girasa aparentemente modificaban la interacción de la RNA polimerasa con algunos promotores ya sea decreciendo la densidad de superhelicidad del DNA del plásmido o alterando la constante de asociación de la girasa al DNA.



Pugsley et al (1981) reportaron que la transcripción del operón *cia-lacZ* se estimuló inhibiendo la actividad de girasa con ácido nalidíxico, aunque esto no ocurrió con novobiocina.

Oostra et al (1981) mostraron que es requerida una girasa funcional para la síntesis de RNA, en E. coli. La estimulación para la síntesis de RNA requería aparentemente otra proteína aparte de la girasa.

Herrero et al (1982) mostraron que al inactivar la subunidad B de la girasa en E. coli, ya sea con inhibidor o utilizando una cepa *gyrB-ts*, la división celular era inhibida, - así como reducida la velocidad de síntesis de la proteína externa de membrana.

Ginsberg y Keynan (1976) así como Gottfried et al (1979) mostraron que la novobiocina inhibe la germinación de esporas de Bacillus subtilis, un proceso que es independiente de la síntesis de DNA, lo que también sugiere un efecto sobre transcripción.

Ogasawara et al (1979) mostraron el efecto que tiene la novobiocina sobre la iniciación de la replicación en Bacillus subtilis. Observaron que la síntesis de DNA era casi instantáneamente bloqueada por la presencia del inhibidor a una distancia de algunas bases del origen de replicación.

Speck et al (1982) reportaron la inhibición de síntesis-

se DNA acompañada de la estimulación de síntesis de proteínas en células en desarrollo de erizo de mar tratadas con novobiocina. Esto constituye una de las primeras evidencias de inhibición de síntesis de DNA inducidas por novobiocina en un eucariote superior.

En general, la evidencia sugiere que la inhibición de la esporulación por inhibición de la DNA girasa puede ser debida a la parcial transcripción de genes asociados al proceso.

#### 4. MATERIAL Y METODOS

##### 4.1. Microorganismos.

Bacillus subtilis NiI, derivada de la cepa 168 trpC2 - fue utilizada en todos los experimentos. Es auxotrófica para timina y triptofano y lleva un fago PBSX defectuoso integrado en su genoma el cual no induce lisis celular.

##### 4.2. Crecimiento del cultivo bacteriano y resuspensión en medio de esporulación.

Las bacterias fueron crecidas en un medio conteniendo - (por litro): Hidrolizado de caseína 8.6g; ácido L-glutámico - 3.16g; DL-alanina 2.14g; L-asparagina monohidrato 1.2g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.36 g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.107 g;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.6 mg;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.535g; --  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.096g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0986g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.022g; L-triptofano 0.02g; timidina 0.02 g. El pH fue - ajustado a 7.1 con NaOH.

El medio de hidrolizado de caseína (CH) se inculó con - una colonia de la cepa correspondiente proveniente de un me-- dio sólido (Agar nutritivo + timidina + triptofano), incuban-- do con agitación a 37°C por toda la noche (aproximadamente 12 Hrs). A la mañana siguiente se diluyó ese cultivo en matra-- ces con CH nuevo y se incubó en las mismas condiciones hasta-- que la densidad óptica del cultivo (a 600nm) llegó a 0.8. En

ese momento, se centrifugó el cultivo a 3000 rpm por 5 minutos, y las células se resuspendieron en medio de esporulación (Sterlini y Mandelstam 1969) que contenía (por litro):

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.023 mg;  $\text{MgSO}_4$  4.8 g;  $\text{MnCl}_2$  12.6 mg;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.535 g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.106 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.068g;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.0965 g;  $\text{CaCl}_2$  0.219 g; ácido L-glutámico 2g; L-triptofano 0.02 g; timidina 0.02g; El pH se ajustó a 7.1 con NaOH.

Se incubó a 37°C en agitación y se midió la incidencia de esporas a las 6, 7 y 8 horas de resuspensión.

La incidencia de esporas fue medida, fuera por tinción de Gram sin safranina, o por cuenta de esporas refráctiles en un microscopio de contraste de fases con filtro verde. Se contaron 400 células para cada determinación.

#### 4.3. Síntesis de DNA.

Esta fue seguida midiendo la incorporación de ( $^3\text{H}$ ) metil-timidina al DNA. Las células fueron crecidas en medio de CH o de esporulación contenido timidina radiactiva (0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) y timidina acarreadora (20  $\mu\text{g/ml}$ ), para medir la síntesis en crecimiento vegetativo o en esporulación respectivamente.

Para cada caso se tomaron muestras (1 ml) a intervalos.

Dichas muestras fueron fijadas en ácido tricloroacético (TCA) (1 ml, 10% v/v), se dejaron reposar por 30 minutos en

hielo/agua y fueron filtradas con succión, por filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A 2.4 cm, 1.2 micras de poro). Los filtros fueron lavados con TCA (10 ml, 5% p/v) y con etanol (10 ml, 96%), secados por una hora a 80°C y transferidos a -- viales de vidrio conteniendo líquido de centelleo (Permafluor en tolueno, 5 ml). La radiactividad se contó en un contador de centelleo líquido Packard TriCarb 3255 utilizando el módulo para tritio.

#### Síntesis de RNA.

Esta fue seguida de una manera similar a la anterior, utilizando 0.5  $\mu$ Ci/ml de  $^3\text{H}$  uridina en uridina acarreadora -- (20  $\mu$ g/ml, , ya sea en CH o en ME.

#### Síntesis de proteínas.

Fue llevada a cabo similarmente, utilizando ( $^3\text{H}$ )-metionina (0.5  $\mu$ Ci/ml) en metionina acarreadora (20  $\mu$ g/ml) y ( $^{14}\text{C}$ )--leucina en leucina acarreadora (20  $\mu$ g/ml), tanto en CH como - en ME.

#### 4.4. Síntesis de DNA en células toluenizadas.

El método es el descrito por Matsushita y Sueoka (1974).

El cultivo (10 ml) de células a estudiar (en estado vegetativo o en proceso de esporulación) se centrifugó, se suspend

dió en solución amortiguada de fosfatos (1 ml, 70 mM pH = 7.4) y se le agregó tolueno (10  $\mu$ l). La suspensión de células se agitó levemente por 10 minutos y se dejó reposar 5 minutos a 4°C.

Con estas células así tratadas se estudió la replicación del DNA en presencia del inhibidor, colocando 0.1 ml de la suspensión celular en 0.4 ml de mezcla de reacción, quedando la mezcla final en solución amortiguadora de fosfatos (70 mM, pH = 7.4);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (13 mM); ATP (1.3 mM); dGTP, dCTP, dATP (33  $\mu$ M); 2-mercaptoetanol (2mM) y 2  $\mu$ Ci/ml de ( $^3H$ )dTTP.

El sistema se utilizó tomando muestra (50 microlitros) cada 10 minutos por 30 minutos.

La reacción se paró agregando DNA de esperma de salmón (200 mg) y de TCA frío (2 ml, 10% p/v). Se dejó reposando en hielo por 30 minutos y cada muestra fue filtrada con succión por filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A). Se lavaron los filtros con TCA (5 ml, 5%) y etanol (5 ml, 96%). Se secaron los filtros a 80°C por 60 minutos y se contaron por radiactividad en viales de vidrio que contenían Permafluor en tolueno (5 ml), utilizando el contador de centelleo líquido Packard TriCarb 3225, utilizando el módulo para tritio.

#### 4.5. Obtención de *Bacillus subtilis* resistente a novobiccina.

Se inoculó una colonia de *Bacillus subtilis* NIT en BHIB- (3 ml) y se incubó a 37°C con agitación hasta obtener una densidad óptica (a 600 nm) de 0.8 y se le añadió entonces EMS -- (45  $\mu$ l). Se dejó incubando a 37°C con agitación por 2 horas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se lavó con ME (3 ml) y se resuspendió en nuevo ME (1 ml) que contenía glucosa (0.2%).

Se incubó por 3-4 horas a 37°C y posteriormente alícuotas de esta resuspensión fueron plaqueadas (0.1 ml) en cajas petri con Agar nutritivo conteniendo triptofano (20  $\mu$ g/ml), - timidina (20  $\mu$ g/ml) y novobiccina (10  $\mu$ g/ml). Las cajas se incubaron por 48 horas a 37°C. Las colonias obtenidas se sembraron en cajas con Medio Mínimo (ME + 0.2% glucosa + 2% - agar), Medio mínimo con triptofano (20  $\mu$ g/ml) y timidina - - (20  $\mu$ g/ml) y Agar Nutritivo con novobiocina (10  $\mu$ g/ml), para probar los marcadores auxotróficos de la cepa silvestre.

Las colonias que crecieron en medio mínimo con ambos factores de crecimiento, en Agar Nutritivo con novobiccina y que no crecieron en Medio Mínimo sin aditamentos, fueron probadas en su capacidad de esporular y se seleccionaron las que mostraron alto índice de esporulación en presencia del inhibidor. Dichas cepas fueron liofilizadas.

#### 4.6. Método de transducción mediada por el fago PBS-1.

Los lisados transductantes se prepararon como se reportó en Coote (1972), adaptado de Karamata y Gross (1970). Para la transducción se empleó el método de Takahashi (1963).

##### 1) Obtención de lisados.

Se sembró una colonia de la cepa a analizar en BHIB (10-ml), se dejó crecer toda la noche en agitación a 37°C. A la mañana siguiente se observó al microscopio hasta que presentaron movilidad las bacterias. Se tomó una porción del cultivo (0.3 ml) y se incubó en nuevo BHI (10 ml) a 37°C, con agitación por una hora; se añadió entonces una solución del fago (0.05 ml) incubando por 6-8 horas con agitación para finalmente dejar reposar a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Entonces se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, se tomó el sobrenadante al que se le agregó cloroformo (0.5 ml) y se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

#### 4.7 Mapeo genético por transducción mediada por el fago PBS-1. Cepas de Bacillus subtilis utilizadas: QB 944 (cysA purA trpC2) BD 112 (cysA) GSY 1021 (purA his B).

Se hizo crecer cualesquiera de las cepas en BHIB (5 ml) - tomando una colonia a partir de agar BHI, se incubó a 37°C con agitación por 6-8 horas y se observó al microscopio hasta que presentara movilidad. Se tomó una porción del cultivo --



(2 ml), y se le agregó el lisado de la cepa a analizar --- (0.2 ml), tomando además otra porción del cultivo (2 ml) como testigo de esterilidad y de marcadores auxotróficos.

Se incubó en agitación por 30 minutos a 37°C, se centrifugó y lavó 2 veces con ME (3 ml cada vez). Se resuspendió el botón en ME (1 ml) y se plaqueó en cajas de medio mínimo (0.1 ml) con los factores de crecimiento adecuados para la selección. Las cajas se incubaron por 24-48 horas a 40°C. Las colonias obtenidas se volvieron a resembrar en el medio mínimo con los mismos factores, para comprobar su estabilidad genética; se volvieron a incubar las cajas 24 horas a 40°C y se resembraron en Agar nutritivo conteniendo novobiocina (104µg/ml). Se incubaron las cajas por 24-48 horas a 40°C y se contó el número de transductantes resistentes a novobiocina, para determinar el % de cotransducción entre los marcadores seleccionados y la resistencia a la novobiocina, en el cromosoma de las cepas resistentes.

#### Inhibidores.

Se utilizó novobiocina de la marca Sygma. El ácido oxolínico fue donado por Warner Lambert Co. U.S.A.

#### 4.8. Preparación de extractos protéicos radiactivos de *Bacillus subtilis* en esporulación. (Adaptado de Jenkinson, 1981).

Una porción de un cultivo esporulante (con y sin inhibi--

bidor, (1 ml) se incubó a 37°C en agitación con (35 S)-metionina (10 microCi) por 15 minutos en los períodos de 10-25 minutos, de 60-75 minutos y 120-130 minutos después de la resuspensión. Las células fueron centrifugadas, lavadas con NaCl 1M y resuspendidas a 40°C por 20 minutos en buffer de lisis (0.08 ml) que contenía Tris/HCl (50 mM, pH-8.2; EDTA (2mM); -- PMSF (0.3 mg/ml); lisozima (2 mg/ml). La suspensión fue entonces calentada a 80°C por 15 minutos agregando "cracking -- buffer" (0.012 ml) con CHES/NaOH (5mM, pH = 9.8), SDS (2%, p/v), 2-mercaptoetanol (60 mM), glicerol (15%, v/v) y azul de bromofenol (0.005%, p/v), se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos y una porción (5 ml) fue contada por radiactividad, mientras -- que se determinó la cantidad de proteína presente a una porción (10 µl) del extracto por el método de Lowry modificado.

#### 4.9 Electroforésis en gel de SDS-poliacrilamida y fluorografía.

Las proteínas fueron separadas por electroforésis vertical en gel de SDS-poliacrilamida por el método de Laemmli y Favre (1973). El gel separador contenía 15% (p/v) de acrilamida y 0.4% de N, N-metilenbisacrilamida, el gel concentrador contenía 5% y 0.13% respectivamente. Las muestras fueron calentadas a 60 °C por 1 minuto antes de ser colocadas en el -- gel (para la cantidad de muestra agregada, se igualó la cantidad de cpm por muestra).

El gel concentrador fue preparado con Tris/HCl (62 mM, - pH = 6.8), el gel separador con Tris/HCl (187.6 mM, pH = 8.8). El buffer de electrodo contenía Tris (0.6%). L-glicina - - (0.288%) y SDS (0.1%) p/v. La corrida se llevó a cabo por 12 horas a una intensidad de 2 mamp/carril. Se utilizaron como estándares de peso molecular, Albúmina sérica bovina (67000), Inhibidor de Tripsina (24000), pepsina(34700) y Lisozima - - (14000). Los geles fueron teñidos y fijados con azul brillante de Coomasie (0.25% p/v) en metanol (45.4% v/v) y ácido acético glacial (9.2% v/v) en agua destilada, por 1 hora y desteñidos toda la noche en etanol (30%) y ácido acético y (10%) en agua.

Las bandas protéicas marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, se observaron por fluorografía utilizando Película de Rayos X (Kodak X-Omat K xK-1) colocando el gel secado en contacto con la película por 1 semana o más cuando fue requerido. La película fue revelada y fijada con líquido para revelado de películas de Rayos X (Kodak).

## 5.- RESULTADOS

Los experimentos de Mandelstam y colaboradores (1971) -- con bacterias auxótrofas a timina, establecieron la relación-existente entre replicación del DNA y la inducción a la esporulación. Mostraron que, en células inducidas a esporular, - la replicación cromosomal debe completarse para permitir que la esporulación prosiga.

Después Dunn et al (1978) mostraron que el HPUra, inhibi dor específico de DNA polimerasa III, detenía la esporulación si el inhibidor se agregaba en el tiempo en que la esporula-- ción era inducida, y la población celular escapaba progresiva<sup>mente</sup> del efecto del inhibidor al tiempo en que las células - terminaban la replicación del cromosoma (a los 35 minutos de inducción).

Se utilizaron posteriormente otros inhibidores que habían mostrado un efecto preferencial sobre la síntesis de DNA, los inhibidores de la DNA girasa.

En estudios comparativos de estos inhibidores y HPUra en la esporulación de Bacillus subtilis, los resultados muestra-- ron que la inhibición de la esporulación por inhibidores de - girasa no era debido a su efecto sobre síntesis de DNA. En - cambio, se sugirió que la inhibición era resultado del efecto sobre síntesis de proteínas, al medir la síntesis general de-

proteína y la actividad de ciertas enzimas ligadas al proceso. Debido a la inhibición preferencial de la aparición de algunas enzimas pero no de otras, se sugirió que la actividad de la girasa era necesaria para la transcripción de algunos genes pero no de otros (Vázquez y Mandelstam 1982).

Por tanto, la evidencia sugiere que la inhibición de la esporulación causada por los inhibidores de girasa podía ser debida a un bloqueo parcial de la síntesis de RNA y como consecuencia, de la síntesis de proteínas. Ello podría explicar que la esporulación sea detenida al no proseguir la secuencia bioquímica de eventos.

Partiendo de estos antecedentes, se continuaron los estudios del efecto de la novobiocina sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de Bacillus subtilis, principalmente sobre síntesis de RNA.

#### 5.1. Efecto de la novobiocina sobre el crecimiento vegetativo y en esporulación.

Células en crecimiento exponencial en Medio de CH fueron expuestas a novobiocina (10  $\mu$ g/ml) cuando se encontraban a una D.O. de 0.1 (a 600 nm). Se tomaron muestras a intervalos de 45 minutos por 4 horas. Los resultados revelaron una drástica inhibición del crecimiento celular en el cultivo tratado. El cultivo sin inhibidor mostró una curva logarítmica de creci-

miento con un tiempo de generación de 33 minutos. (FIGURA 1). Las células tratadas, observadas al microscopio, tenían una apariencia deforme, con pliegues y alargamiento notorio.

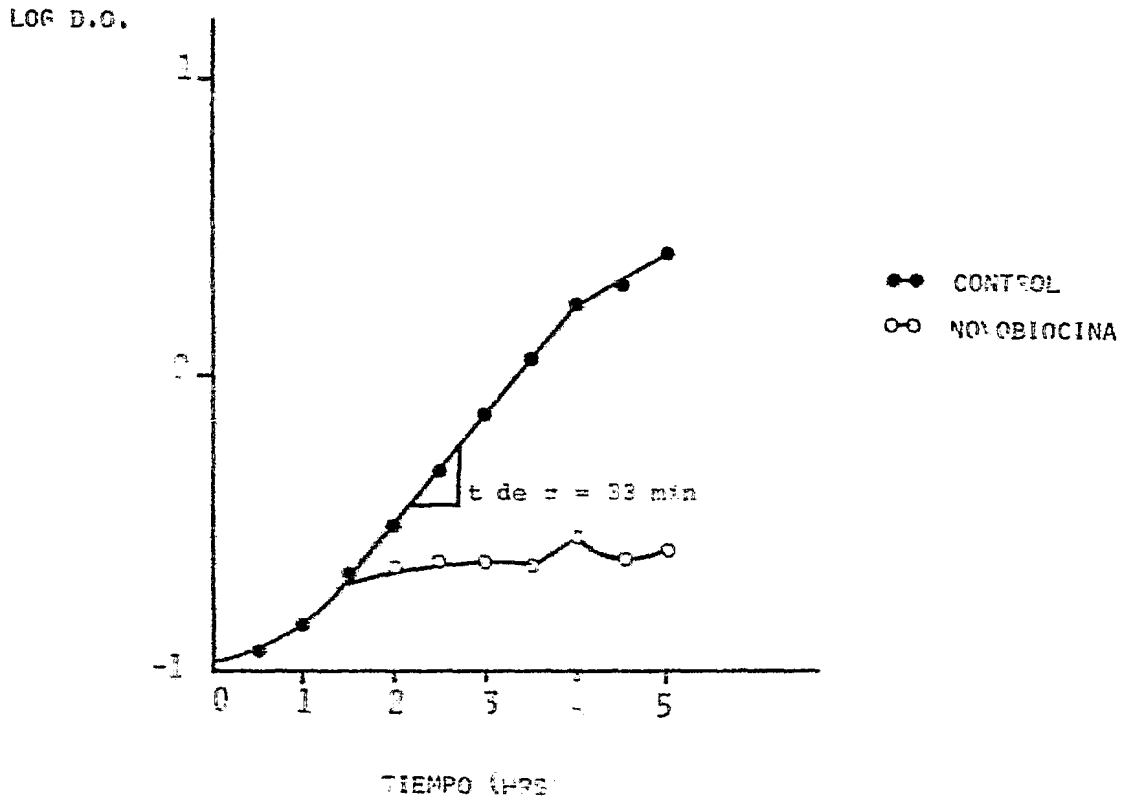
Al agregar novobiocina ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) a un cultivo resuspendido en ME, y midiendo la D.O. del cultivo a intervalos de 1-hora por 8 horas, se observó en las células tratadas una muy leve disminución del crecimiento en relación al control. (FIGURA 2). Al observar el cultivo tratado al microscopio, las células exhibían alargamiento notorio, pliegues y deformidades, así como agrupamientos irregulares. Las células del cultivo control mostraban a las 8 horas de resuspensión en ME un índice de esporulación del 20%. Las células tratadas no mostraban presencia de esporas.

Se procedió a estudiar el efecto de la novobiocina sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en el crecimiento vegetativo de la cepa NiI.

### 5.2. Relación entre el efecto de la novobiocina y las síntesis de DNA, RNA y proteínas en crecimiento vegetativo de *Bacillus subtilis*.

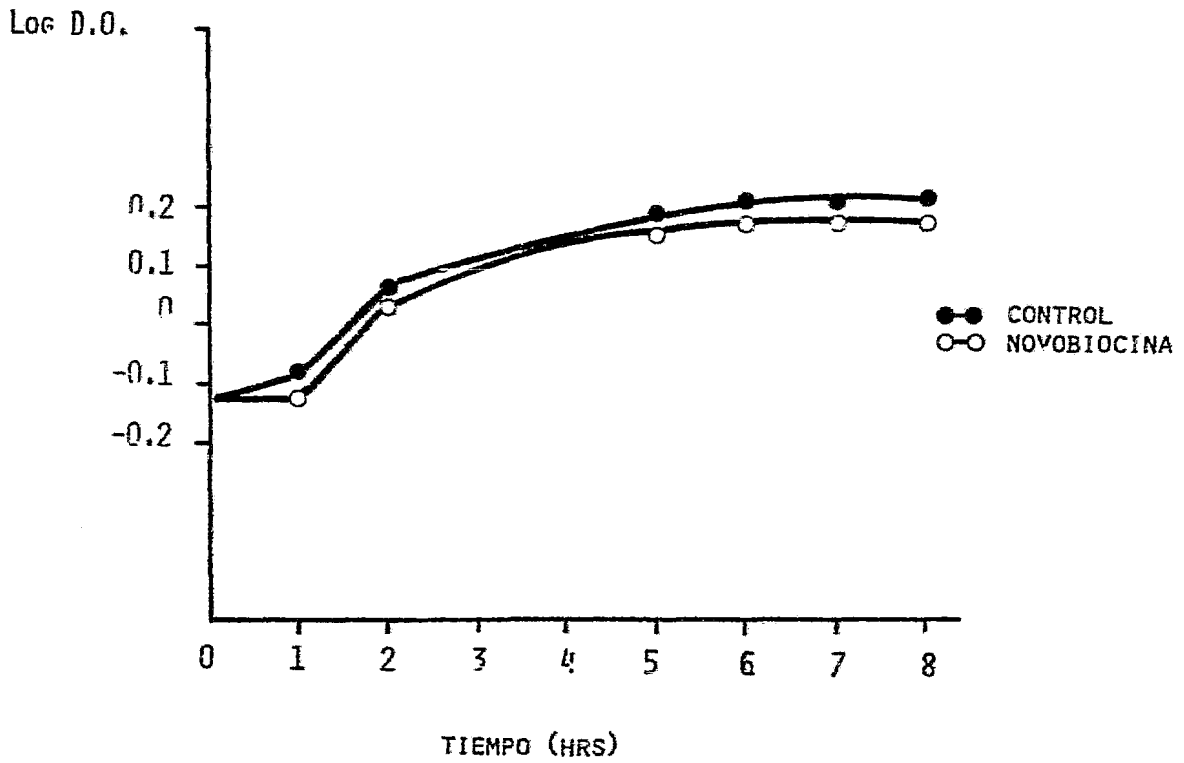
Células en crecimiento exponencial en CH fueron expuestas a novobiocina ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Para medir síntesis de DNA se añadió al cultivo ( $^3\text{H}$ )-metil timidina ( $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ ) en timidina --acarreadora ( $20 \mu\text{g/ml}$ ).

FIGURA 1.



EFFECTO DE NOVOBIOCINA SOBRE EL CRECIMIENTO EXPONENCIAL EN  
BACILLUS SUBTILIS

FIGURA 2



EFFECTO DE NOVOBIOCINA SOBRE EL CRECIMIENTO EN ESPORULACION  
DE BACILLUS SUBTILIS.



Para medir síntesis de RNA, se añadió ( $^3\text{H}$ ) uridina - -  
(0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) en uridina acarreadora (20  $\mu\text{g/ml}$ ).

Para medir síntesis de proteínas, se añadió ( $^3\text{H}$ ) (metioni  
na (0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) en metionina acarreadora (20  $\mu\text{g/ml}$ ).

Los marcadores se añadieron al momento de agregar el in-  
hibidor y se tomaron muestras cada 15 minutos midiendo cada -  
vez la D.O. de los cultivos.

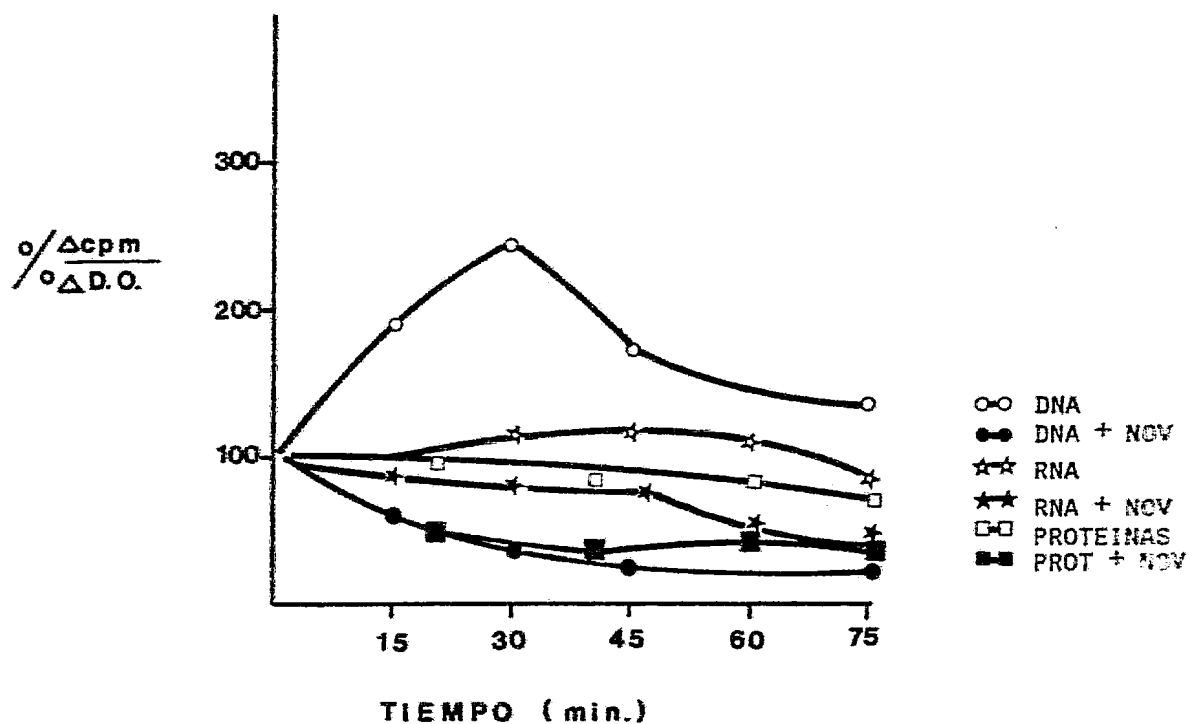
Se relacionó así la actividad específica del inhibidor -  
contra el tiempo (en forma de porcentaje de incremento de - -  
cpm/incremento en crecimiento celular), en crecimiento expo--  
nencial para cada síntesis medida.

La Figura 3 muestra que la síntesis de DNA es la más - -  
afectada por la presencia de la novobiocina en relación al --  
crecimiento celular, dato que corrobora los reportes de novo-  
biocina como inhibidor preferencial de la síntesis de DNA. --  
Las síntesis de RNA y proteínas se ven menos afectadas en re-  
lación al crecimiento celular. Las células tratadas con el -  
inhibidor son incapaces de dividirse aunque llevan a cabo - -  
cierto grado de síntesis de proteínas.

### 5.3. Efecto de la novobiocina en síntesis de DNA, RNA, y proteínas en esporulación de Bacillus subtilis.

El efecto de la novobiocina también se determinó en célu

FIGURA 3



ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL INHIBIDOR SOBRE SINTESIS  
DE DNA, RNA Y PROTEINAS EN CRECIMIENTO EXPONENCIAL  
DE BACILLUS SUBTILIS

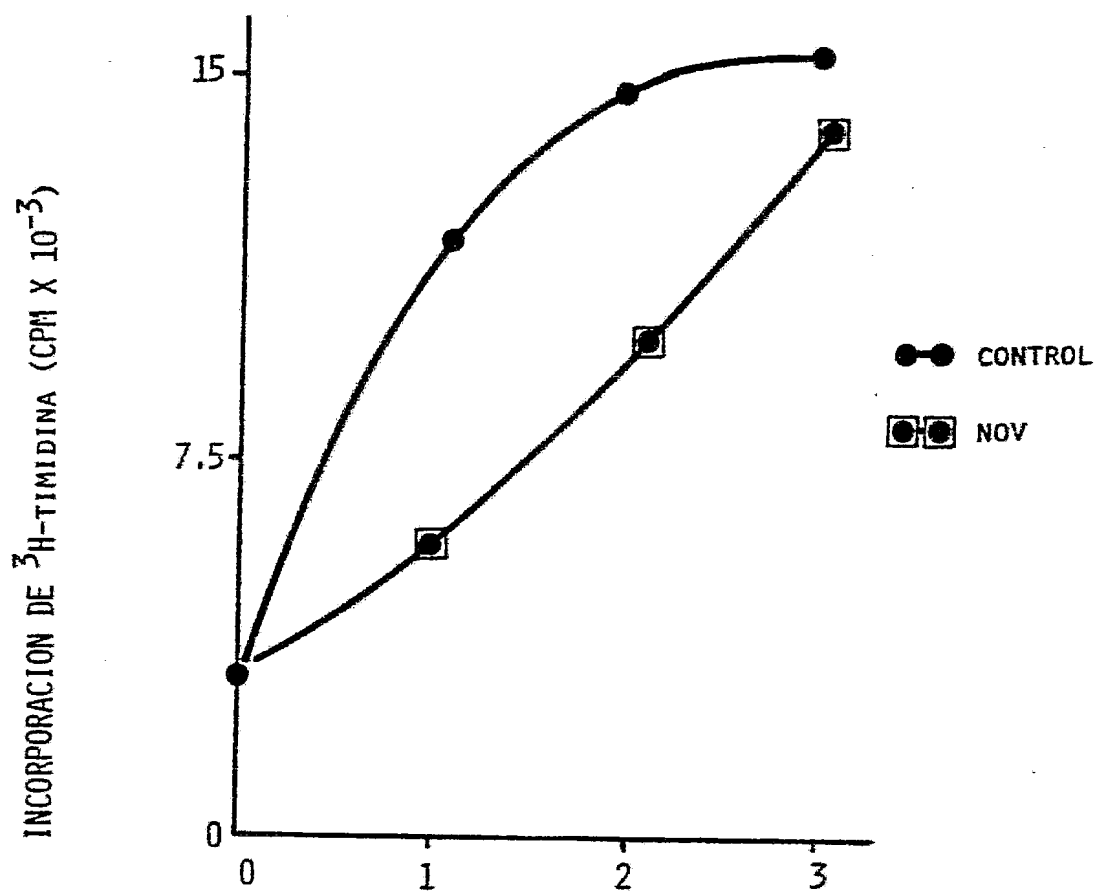
las inducidas a esporulación. Cuando se agregó al inicio del proceso esporulatorio, se observó que la cinética de síntesis de DNA era sólo retrasada, llegando a niveles de cuentas similares el cultivo tratado y el control después de 3 horas (FIGURA 4).

La cinética de síntesis del control fue más activa desde el principio y decreció, mientras que el cultivo tratado mostró una cinética menor inicial, la que después se incrementó. Este resultado es similar al obtenido anteriormente por Vázquez y Mandelstam (1982).

Midiendo síntesis de RNA en las mismas condiciones, se observó una inhibición parcial aunque muy notoria después de 3.5 horas. La cinética de síntesis del control decreció después de 3 horas. La curva del cultivo tratado muestra que la síntesis fue afectada desde su inicio (FIGURA 5)

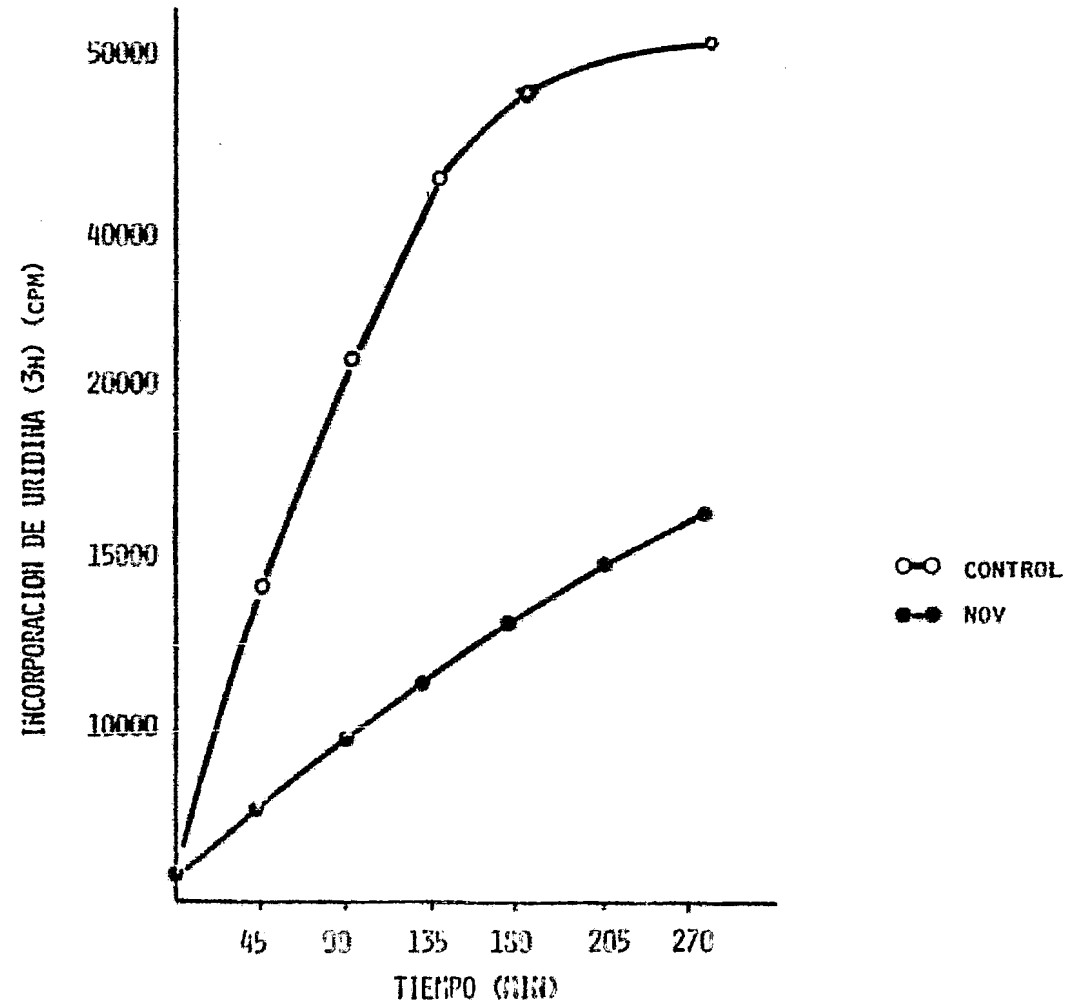
La síntesis de proteínas en esporulación se vio menos -- afectada que la síntesis de RNA. Existió un bloqueo parcial en la síntesis lo que podría explicar que la esporulación sea detenida al no proseguir la secuencia de eventos. (FIGURA 6).

FIGURA 4

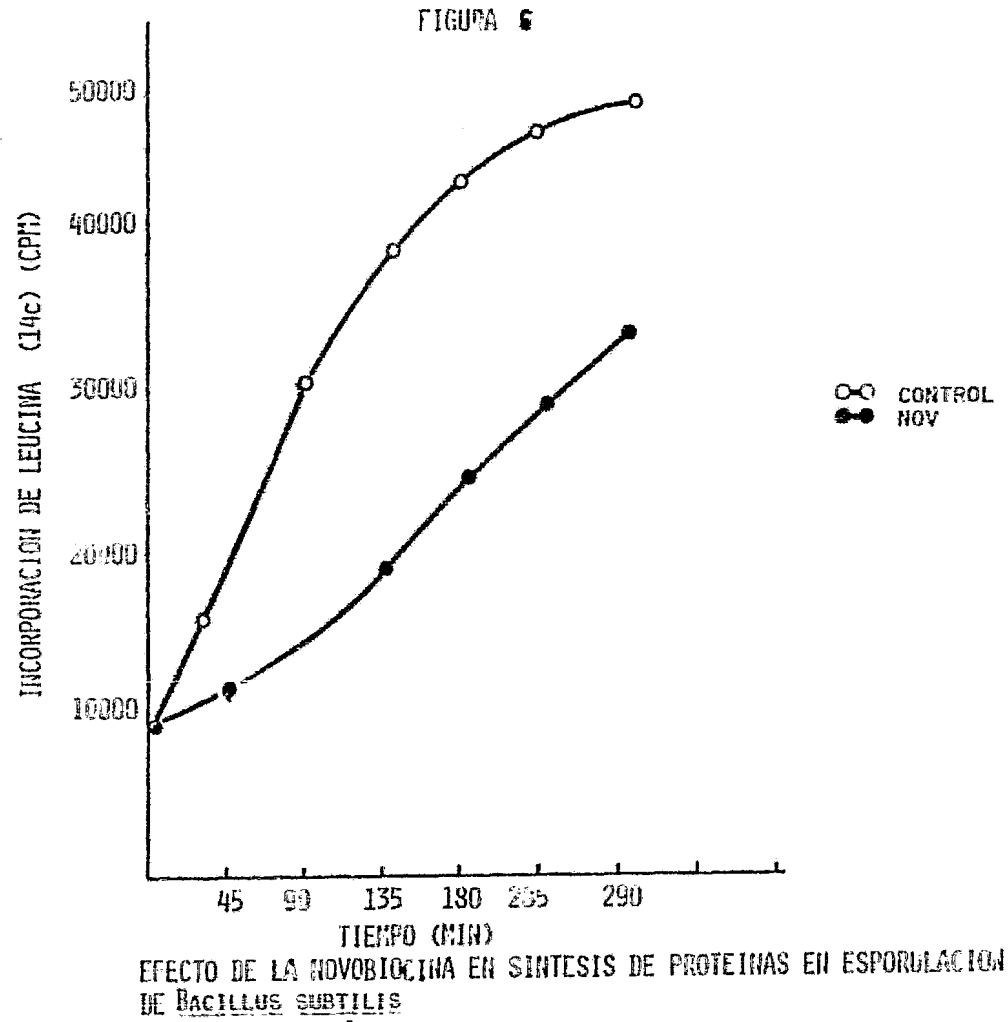


EFFECTO DE NOVOBIOCINA SOBRE SINTESIS DE DNA EN  
ESPORULACION DE BACILLUS SUBTILIS.

FIGURA 5



EFFECTO DE LA NOVOTIICINA SOBRE SINTESIS DE RNA EN ESPORULACION  
DE BACILLUS SUBTILIS



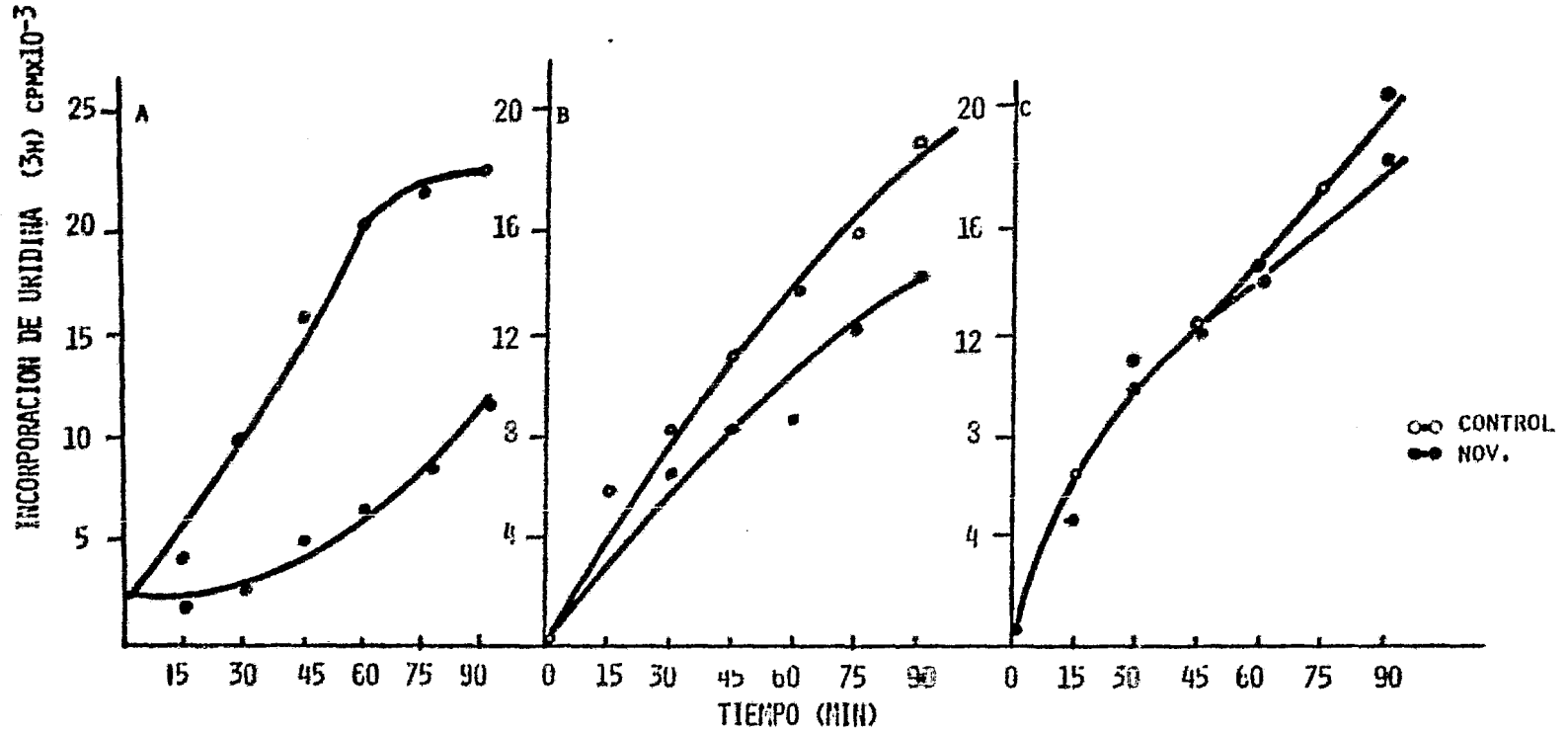
En los estudios realizados por Vázquez y Mandelstam - - (1982) se había determinado el efecto de HPURa, ácido oxolínico y novobiocina sobre la síntesis de proteínas en esporulación, agregando los inhibidores al inicio de la inducción de la esporulación o en los tiempos de escape del proceso a cada inhibidor (ya definidos en la Introducción).

Ellos reportaron que la síntesis de proteínas se vió menos afectada según se agregaban los inhibidores a tiempos más cercanos a sus tiempos de escape respectivos. Particularmente, al agregar novobiocina a  $t_0$ , la síntesis de proteínas se veía inhibida fuertemente, en cambio al agregarla a  $t_{90}$ , el efecto había desaparecido.

Para complementar esos estudios, se efectuó un experimento de medición de síntesis de RNA en esporulación, agregando la novobiocina a 0,30, 60 y 90 minutos de inducida la esporulación y midiendo en cada caso la síntesis por 90 minutos, tomando muestras a intervalos de 15 minutos.

Los resultados revelaron que, conforme se agregó el inhibidor a tiempos más cercanos al tiempo de escape, la inhibición de la síntesis de RNA fue cada vez menor, desapareciendo el efecto de inhibición prácticamente desde  $t_{60}$ . Esto se observa claramente en la Figura 7 a) b) c) en la que se puede comparar la inhibición de la síntesis de RNA a  $t_0$  con las cinéticas de síntesis de  $t_{30}$  y  $t_{60}$ . La curva de  $t_{90}$  no se mues

FIGURA 7



ESCAPE DEL EFECTO DE LA NOVIOBIOTINA EN SINTESIS DE RNA EN ESPORULACION DE BACILLUS SUBTILIS



tra por ser muy similar a la de  $t_{60}$ . El cultivo control y el cultivo tratado llegaron a mostrar cantidades similares de -- cuentas a  $t_{60}$  y  $t_{90}$ . Estos resultados indicaban que el escape al efecto de la novobiocina tendía al comportamiento normal de las células.

Para probar que esta disminución del efecto de la novobiocina no era debida a un efecto causado por cambios de permeabilidad de las células durante el proceso esporulatorio, se utilizó un sistema de síntesis de DNA semi in vitro, con células permeabilizadas por tratamiento con tolueno.

#### 5.4. Efecto de Novobiocina en síntesis de DNA de células en esporulación tratadas con tolueno.

El tolueno disuelve a los lípidos de la membrana celular, creando huecos y permitiendo el paso libre de moléculas en -- las células.

Este sistema utiliza la maquinaria celular de replicación del DNA, cuando se añaden desoxiribonucleótidos, ATP y iones Mg, y permite evaluar el efecto del inhibidor dentro de la célula. En este tipo de sistemas sólo pueden hacerse estudios sobre síntesis de DNA, ya que las macromoléculas involucradas no salen de la célula. No es efectivo para síntesis de RNA y proteínas (Matsushita y Sueoka 1974).

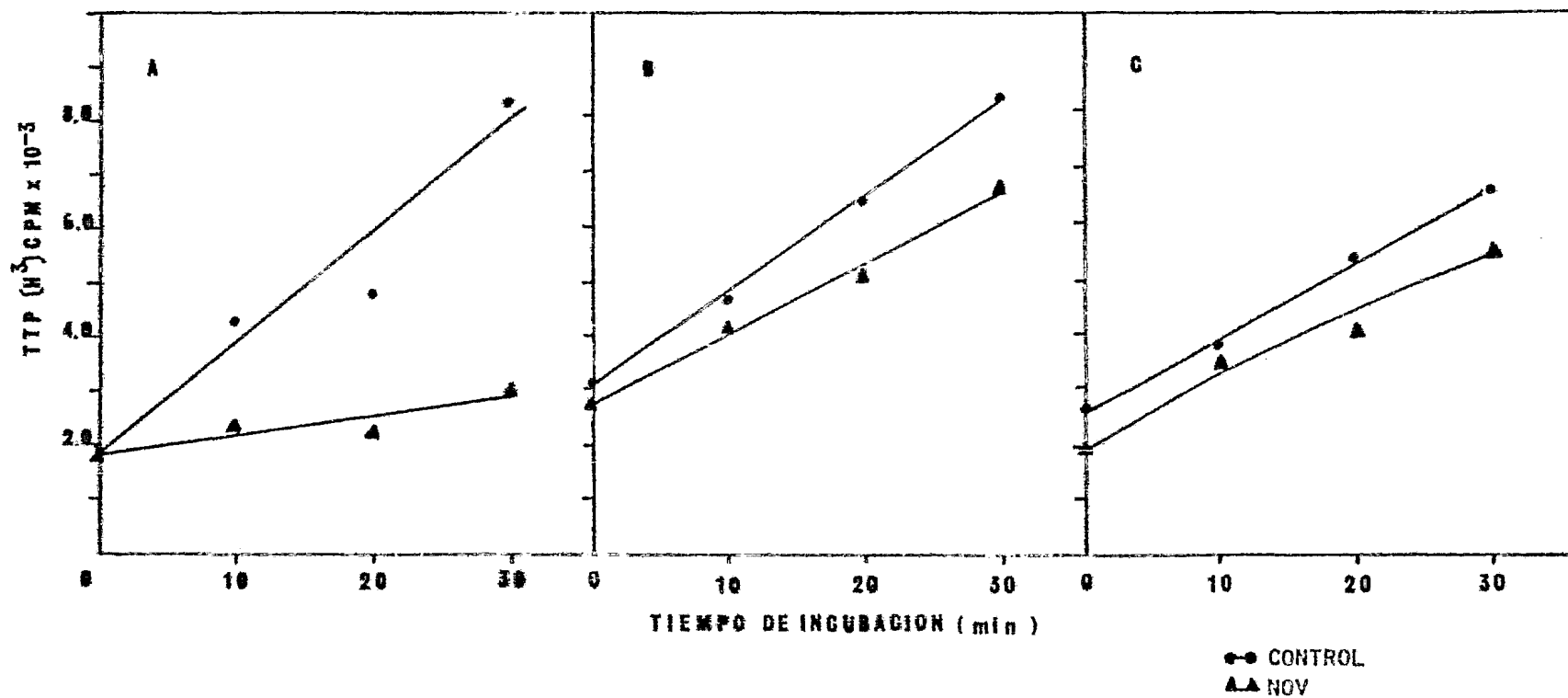
Tomando células de 0, 30 y 60 minutos de inducidas a esporular, tratándolas con tolueno y agregándolas a una mezcla de reacción conteniendo dTTP tritiado, se determinó que el efecto de la novobiocina era menor según transcurría el tiempo de la inducción, independientemente de la permeabilidad celular (Figura 8).

Puede observarse en células de  $t_0$  una inhibición total de la síntesis de DNA en relación con el control (8a) que mostró actividad sintética. Con células de  $t_{30}$  y  $t_{60}$ , existió una cinética de síntesis muy similar, a juzgar por las pendientes ascendentes en ausencia y presencia del inhibidor y una notoria diferencia con las células de  $t_0$ .

Para poder estudiar los posibles cambios en la composición protéica de las células tratadas con inhibidores de girasa, y con fines de comparación, se buscó la manera de aislar mutantes de la cepa silvestre resistentes a la novobiocina. Ello podía ayudar a ampliar nuestra información sobre la posible función de la girasa en la esporulación.

Por tanto, el trabajo se dirigió a la obtención de evidencias más claras de que la DNA girasa podría estar involucrada en la transcripción de genes, algunos de ellos esenciales al proceso de esporulación, utilizando para ello una técnica indirecta, como sería la electroforésis de extractos protéicos de la cepa silvestre y de mutantes resistentes a la no

FIGURA 8 SINTESIS DE DNA EN CELULAS NI TOLUENIZADAS A 0, 30 Y 60 min DE INICIADA LA ESPORULACION. EFECTO DE NOVIOBIICINA.



vobiocina derivadas de la cepa silvestre, inducidas a esporular en ausencia y presencia del inhibidor.

#### 5.5. Obtención de mutantes resistentes a novobiocina y su selección.

Esta parte del trabajo experimental, así como la de mapeo genético (vista más adelante) se hizo en colaboración con la Profra. Biserka Sveshtarova Pekarkova.

La obtención de mutantes resistentes a novobiocina a partir de la cepa NiI se realizó poniendo en contacto un cultivo de ésta con el agente mutagénico EMS (Etil-metil sulfonato), agente alquilante de bases nitrogenadas. Posteriormente, se lavaron las células y fueron transferidas a ME con 0.2% de glucosa para permitir la expresión del nuevo fenotipo. Finalmente se plaqueó de una suspensión de esas células en Agar Nutritivo adicionado de novobiccina (10 µg/ml).

Se obtuvieron varias colonias resistentes a novobiocina. Esas colonias también crecieron en medio mínimo adicionado de timidina y triptofano (20 µg/ml) y no crecían en medio mínimo sin esos factores.

Se seleccionaron varias colonias por 2 criterios principales:

- 1) Índice de esporulación similar al control pero en pre

sencia de novobiocina (Control = cepa silvestre).

- 2) Síntesis de DNA en crecimiento vegetativo en presencia de novobiocina.

Finalmente se seleccionaron a 2 de las mutantes aisladas, pues fueron las de comportamiento más estable considerando los criterios anteriores. Se denominaron NiI-5 y NiI-9.

Esas cepas mostraron una velocidad de crecimiento similar al control, en CH sin inhibidor (33 minutos tiempo de generación). Su tiempo de generación se vio retrasado en presencia de novobiocina (10 µg/ml) siendo en estas condiciones de 45 minutos. Ambas cepas, al ser inducidas a esporular en presencia del inhibidor presentaron índices de esporulación de 15% contra 20% reportado ya para NiI sin inhibidor.

La presencia de ácido oxolínico (100 µg/ml) inhibió la esporulación de la cepa silvestre y de las mutantes resistentes a novobiocina en forma total, viéndose las células al microscopio en agrupamientos irregulares y lisadas, en los tres casos.

La resistencia a la novobiocina y la sensibilidad al ácido oxolínico comprobó la especificidad de acción de cada inhibidor de girasa.

5.6. Estudio del efecto de la novobiocina sobre la síntesis de DNA, RNA y proteínas de las mutantes resistentes a novobiocina, en crecimiento vegetativo.

Este estudio, comparativo con el realizado con la cepa - NiI fue efectuado de igual manera (ver página 44 de Resultados).

Las curvas de síntesis de DNA, RNA y proteínas en presencia de novobiocina en las mutantes resistentes a la novobiocina fueron diferentes a las observadas en la cepa silvestre, esto es, la inhibición fue mucho menor en las mutantes.

En la Tabla I se muestran los % de inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas de la NiI, NiI-5 y NiI-9.

5.7. Efecto de novobiocina sobre síntesis de DNA, RNA y proteínas en esporulación de las mutantes resistentes.

La cinética de síntesis de DNA se vio similarmente afectada en la mutante NiI-5 y en el control (NiI). La mutante - NiI-9 no mostró ningún efecto sobre síntesis de DNA en presencia del inhibidor. (Figura 9).

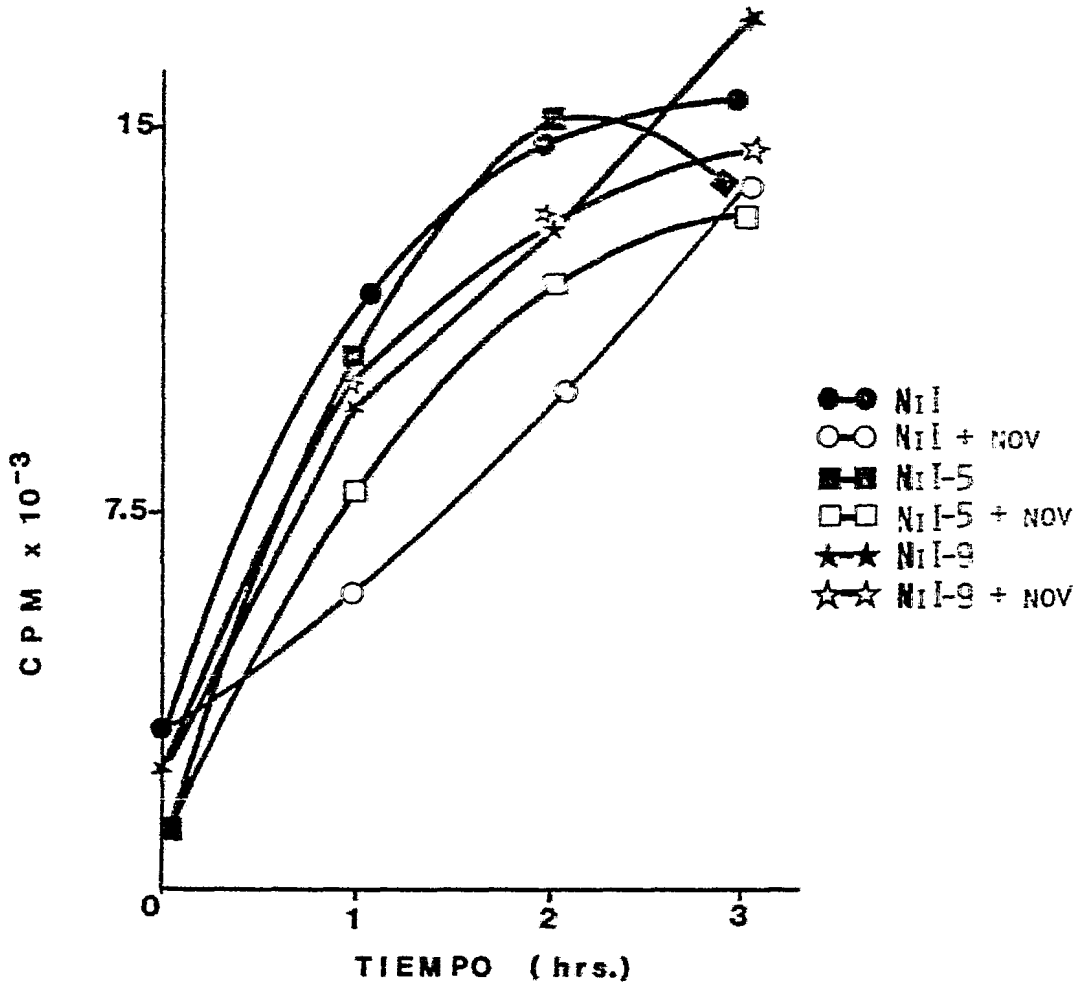
En síntesis de RNA, las mutantes presentaron una inhibición parcial pero no tan severa a la sufrida por la cepa silvestre, en presencia de novobiocina. (Figura 10). La mutante NiI-5 mostró una pequeña inhibición durante el inicio de la -

TABLA I.

**% DE INHIBICION POR NOVOBIOCINA EN SINTESIS  
DE PROTEINA, RNA, Y DNA EN CRECIMIENTO  
EXPONENCIAL DE Nil, Nil - 9 nov Y Nil - 5 nov**

	<b>PROTEINA</b>	<b>RNA</b>	<b>DNA</b>
<b>Nil</b>	<b>56.9</b>	<b>59.2</b>	<b>91.0</b>
<b>Nil - 5 nov</b>	<b>37.6</b>	<b>23.7</b>	<b>&lt;10</b>
<b>Nil - 9 nov</b>	<b>27.7</b>	<b>21.3</b>	<b>29.9</b>

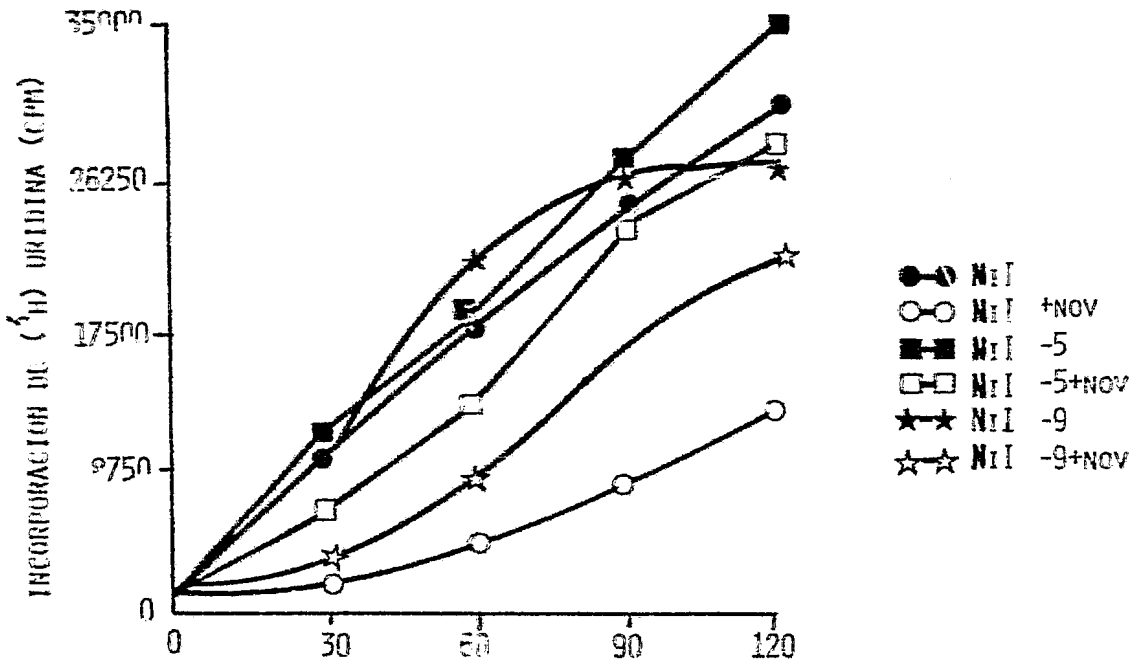
FIGURA 9



SINTESIS DE DNA DE MUTANTES RESISTENTES A NOVOBIOCINA  
EN ESPOLUCION EN PPESENCIA DE NOVOBIOCINA



FIGURA 20



SINTESIS DE RNA EN MUTANTES RESISTENTES A NOVBIOCINA  
 EN ESPORULACION EN PRESENCIA DE NOVBIOCINA.

esporulación, y la cepa NiI-9 pareció recuperarse aproximadamente a partir de los primeros 60 minutos.

En cultivos en esporulación de las mutantes resistentes, el control NiI mostró mayor sensibilidad al inhibidor que las mutantes, en síntesis de proteínas (Figura 11), siendo similares estas gráficas a las obtenidas para síntesis de RNA en -- las mismas condiciones (Figura 10).

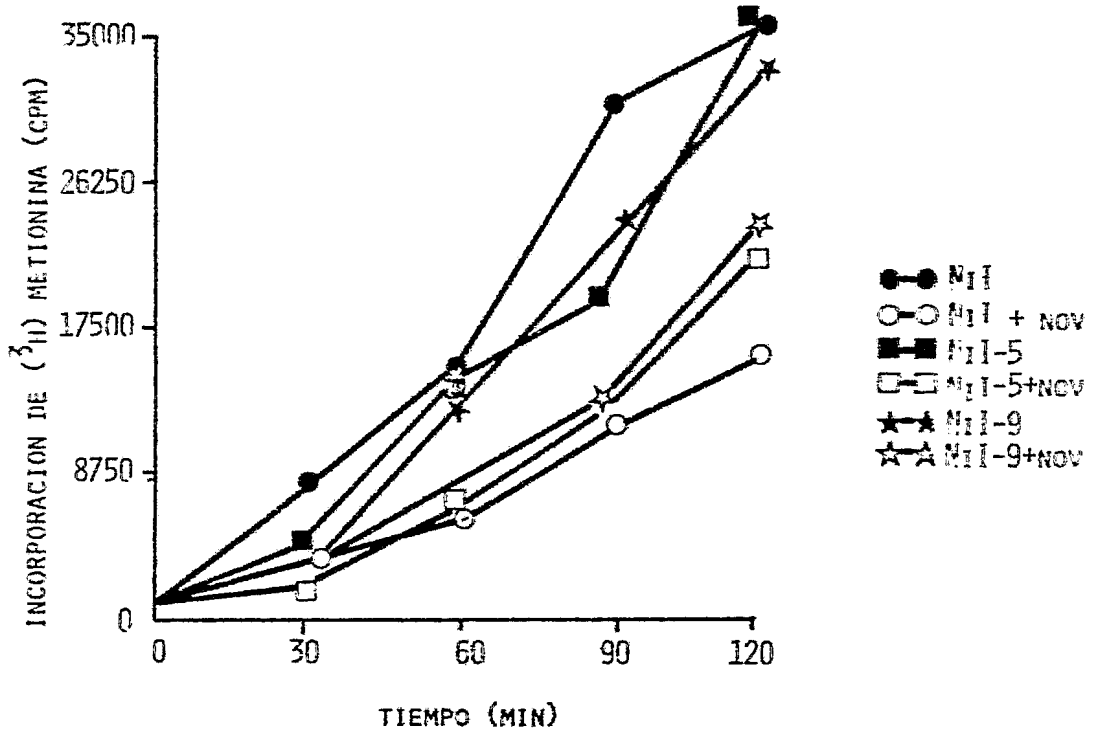
Se decidió probar que la resistencia al inhibidor en las mutantes no era debida a posibles cambios en la permeabilidad celular, o sea, a una mutación en la permeabilidad. Por esto, se realizó una vez más, el estudio de síntesis de DNA en presencia de la novobiocina en células toluenizadas, ahora de -- las mutantes resistentes creciendo vegetativamente.

Los resultados, ilustrados en la Figura 12, mostraron -- una clara resistencia de las mutantes a la novobiocina.

Con esto se tenía un indicio muy bueno de que la resis-- tencia de las mutantes seleccionadas era una resistencia constitutiva expresada por el gene codificante para la subunidad-B de la girasa. Esto habría de comprobarse por medio del mapeo genético de la resistencia a novobiocina de las mutantes- (véase más adelante).

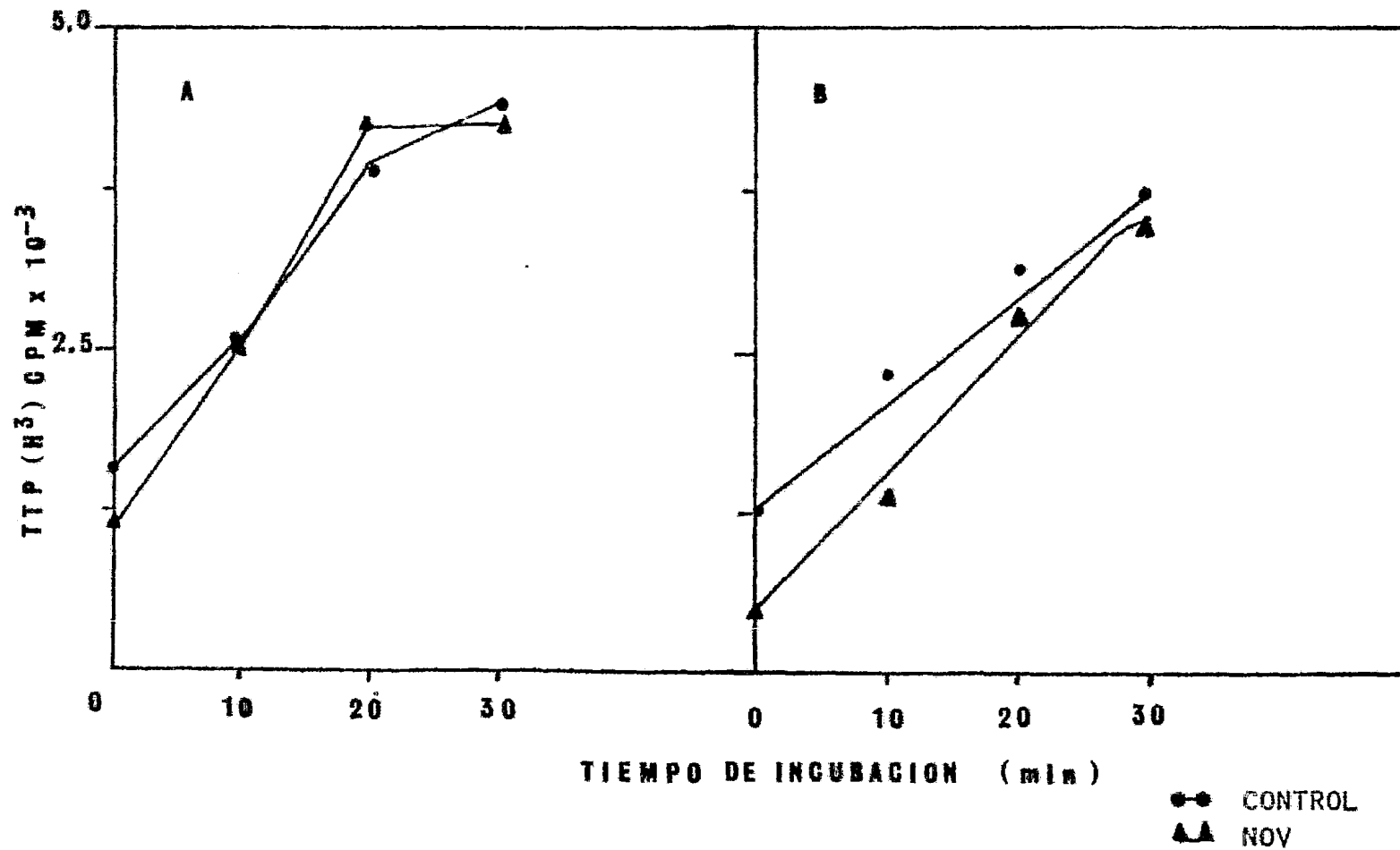
Para mostrar que la novobiocina y el ácido oxolínico - - afectan diferentemente la actividad de la girasa, se efectua-

FIGURA 11



SINTESIS DE PROTEINAS EN MUTANTES RESISTENTES A NOVOBICICINA EN ESPORULACION EN PRESENCIA DE NOVOBICICINA.

FIGURA 12 SINTESIS DE DNA EN CELULAS TOLUENIZADAS DE LAS MUTANTES  
N<sup>o</sup> 5 Y N<sup>o</sup> 9 . EFECTO DE NOVOBIOGINA.



ron algunos experimentos usando el ácido oxolínico.

Ya mencionamos el efecto que sobre la esporulación de la cepa silvestre y las mutantes tiene el ácido oxolínico. En todas ellas, se observó una inhibición total del proceso esporulatorio.

La síntesis de RNA en crecimiento vegetativo fue drásticamente inhibida por el ácido oxolínico (10 µg/ml) en la cepa NiI. En cambio, en esporulación, la síntesis de RNA se vio sólo parcialmente inhibida.

En síntesis de DNA en esporulación de la NiI y la NiI-9 se observó el mismo grado de inhibición, mayor al 50%, después de 3 horas. (No se muestran gráficas). Estos resultados indican que la subunidad A de la girasa y la subunidad B aparentemente tienen funciones diferentes en crecimiento vegetativo y en esporulación.

#### 5.8. Mapeo genético por transducción mediada por el fago PBS-1.

Uno de los métodos más utilizados para el mapeo genético de bacterias es el que aprovecha el fenómeno de transducción, así llamado pues involucra el transporte de DNA de un organismo a otro por un agente intermediario.

Algunas cepas de bacteriófagos, como el PBS-1 en Bacillus

subtilis producen una transducción generalizada en la cual -- puede ser transferido cualquier gene bacteriano.

La célula donadora es infectada y lisada por el fago. - En algunos casos la cápside del fago engloba parte del cromosoma bacteriano, generalmente del mismo tamaño del cromosoma del fago. Esta partícula transductora se libera junto con -- la demás progenie del fago y es capaz de infectar a una segun da bacteria. El DNA de esa partícula, que comparte una se - cuencia homóloga con una porción del cromosoma de la célula - infectada (receptora) puede ser insertado en el cromosoma re - ceptor. Por tanto, la transducción generalizada permite a ge - nes de la cepa donadora reemplazar genes en el cromosoma de - la cepa receptora.

Si 2 marcadores son cotransducidos (transportados) con - alta frecuencia, se considera que están cercanos en distancia, en cambio si nunca cotransducen o lo hacen con mínima frecuen - cia, están separados probablemente por una longitud de DNA -- tan larga como el cromosoma del fago o mayor.

La frecuencia de cotransducción está inversamente rela - cionada a la distancia entre los genes. Así, si los marcado - res están muy cercanos, serán transducidos juntos casi siem - pre y su frecuencia de cotransducción se aproximará al 100%. - Si, por el contrario 2 marcadores no son incluidos en el mis - mo fragmento del DNA transductante, su frecuencia de cotrans -

ducción será de 0%. (Goodenough 1980).

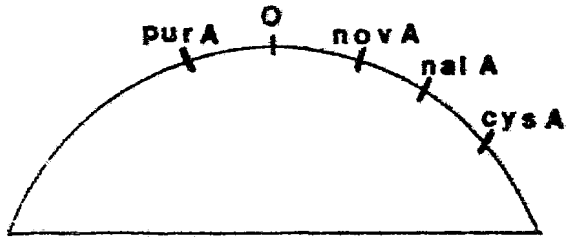
El gene novA, que codifica para la subunidad B de la DNA-girasa, ha sido mapeado en la región del cromosoma de Bacillus subtilis entre los genes cysA y purA. (Canosi, U-Mazza G. 1974, referido por Sugino et al 1980 y Vázquez-Mandelstam 1982). - - (Figura 13).

Se efectuó la transducción con las mutantes NiI-5 y NiI-9 como donadoras y cepas receptoras auxótrofas para los marcadores cisteína y purina (en los genes cysA y purA) para determinar aproximadamente la distancia entre la mutación sufrida en el gene novA y esos marcadores, si es que la mutación se localizaba en el gene novA.

El mapeo confirmó que la resistencia a la novobiocina en las mutantes estaba localizada en el gene novA, que codifica para la subunidad B de la girasa, la que debía haber sufrido una modificación que la hacía resistente al inhibidor.

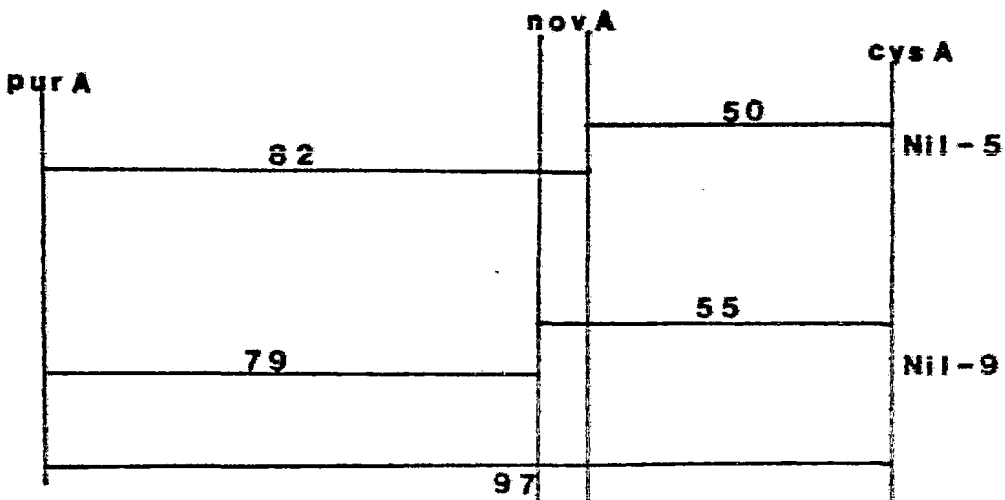
La Tabla II resume la información de cepas utilizadas como donadoras y receptoras, la selección por marcadores y los valores de cotransducción obtenidos. La figura 14 muestra las distancias aproximadas determinadas para el gene novA resistente de las mutantes.

FIGURA 13



CROMOSOMA DE BACILLUS SUBTILIS: REGION DONDE SE MAPEA A NOV A.

FIGURA 14



DISTANCIAS APROXIMADAS DE LOS GENES NOV A DE LAS MUTANTES.



TABLA II

CEPA DONADORA	RECEPTORA	SELECCION DE MARCADORES	% COTRANSDUCCION
	Q B 944 ( <u>CYSA</u> , <u>PUR<sup>A</sup></u> <u>TRPC2</u> )	PUR <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	18
		PUR <sup>+</sup> CYS <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	97
NiI-5	BD 112 ( <u>CYS A</u> )	CYS <sup>+</sup> NOV <sup>+</sup>	50
(THY <sup>-</sup> TRP <sup>-</sup> NOV <sup>R</sup> )	GSY 1021 ( <u>PUR<sup>A</sup></u> <u>HISB</u> )	PUR <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	20
<hr/>			
	Q B 944 ( <u>CYSA</u> , <u>PUR<sup>A</sup></u> , <u>TRPC2</u> )	PUR <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	21
		PUR <sup>+</sup> CYS <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	97
NiI-9	BD112 ( <u>CYS<sup>A</sup></u> )	CYS <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	45
(THY <sup>-</sup> TRP <sup>-</sup> NOV <sup>R</sup> )	GSY 1021 ( <u>PUR<sup>A</sup></u> <u>HISB</u> )	PUR <sup>+</sup> NOV <sup>R</sup>	18
<hr/>			

5.9. Obtención de patrones electroforéticos de la cepa NiI y la mutante NiI-9 a diferentes tiempos de inducción de la esporulación en ausencia y presencia de novobiocina.

Para poder estudiar los posibles cambios en la composición protéica de células en esporulación tratadas con novobiocina, se hicieron extractos protéicos de las cepas NiI y NiI-9 a diferentes tiempos de inducida la esporulación mediante pulsos de 10-15 minutos con  $^{35}\text{S}$ -metionina. Los pulsos fueron entre los períodos 10-20, 60-70 y 120-130 de inducida la esporulación, en ausencia y presencia de novobiocina (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

Se buscaba la aparición o desaparición de alguna o algunas proteínas preferencialmente afectadas por la presencia de la novobiocina en la cepa silvestre, sensible al inhibidor.

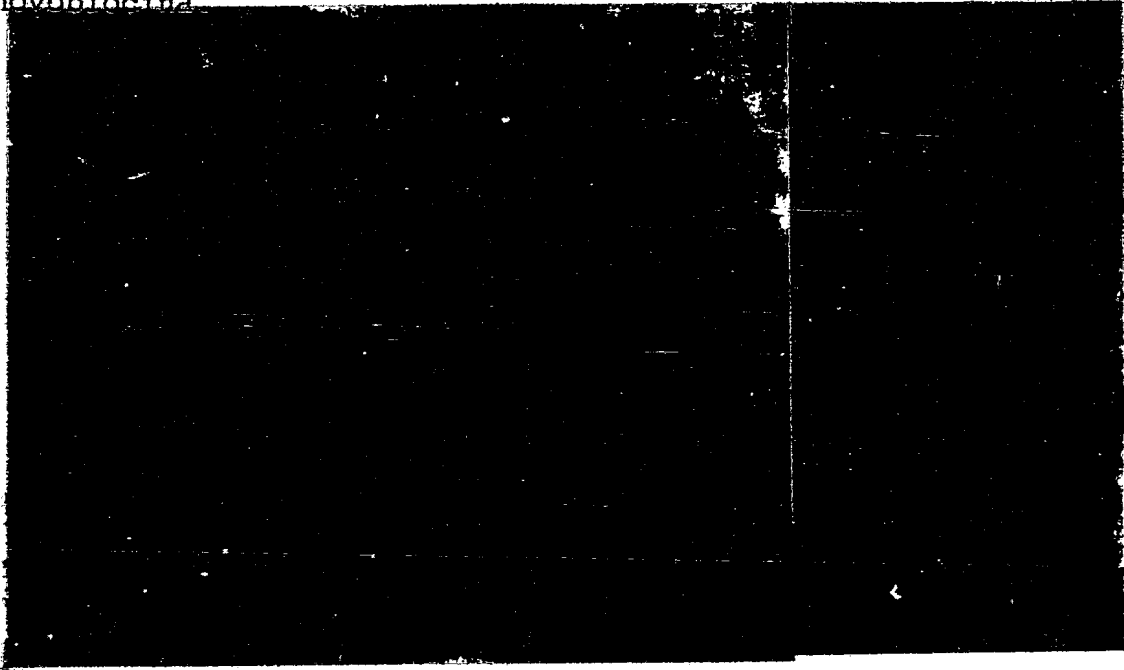
La Fotografía 1 contiene las siguientes muestras por carriles:

- |                    |                      |
|--------------------|----------------------|
| a) NiI 10-20       | e) NiI-9 10 - 20     |
| b) NiI + NOV 10-20 | f) NiI-9 + NOV 10-20 |
| c) NiI 60-70       | g) NiI-9 60-70       |
| d) NiI + NOV 60-70 | h) NiI-9 + NOV 60-70 |

El carril d) muestra la desaparición de por lo menos 5 - proteínas que se encuentran en todos los demás carriles del mismo tiempo y la aparición de una doble banda que se ve muy tenue en el carril c).

## FOTOGRAFIA 1

Patrones proteicos de N.I. y N.I-9, de 10-20 y 60-70 minutos de inducción de la esporulación, en ausencia y presencia de novobiocina.



Carril	cepa	Inhibidor	Tiempo
a)	N.I		10-20
b)	N.I +	NOV	10-20
c)	N.I		60-70
d)	N.I +	NOV	60-70
e)	N.I-9		10-20
f)	N.I-9 +	NOV	10-20
g)	N.I-9		60-70
h)	N.I-9 +	NOV	60-70

La Fotografía 2 muestra en los carriles las siguientes -  
muestras:

- a) NiI 10-20
- b) NiI 120-130
- c) NiI + NOV 120-130 .
- d) NiI-9 120-130
- e) NiI-9 + NOV 120-130
- f) NiI 60-70
- g) NiI + NOV 60-70

El carril a) muestra varias proteínas que no fueron sintetizadas 2 horas después (comparando con el carril b), pero no tiene varias proteínas que son sintetizadas en gran cantidad posteriormente. (Proteínas que deben ser esporulación es específicas, ya que también se presentan en los carriles d) y e). El carril c) de células bloqueadas para la esporulación, muestra la falta de algunas proteínas y la menor síntesis de otras.

El carril f) muestra varias proteínas que no se ven en b), por lo que puede pensarse en proteínas que aparecen en la Etapa I que después ya no se sintetizan, asimismo el carril g) muestra la ausencia de proteínas, lo que podría explicar que no puedan proseguir el proceso esas células.

Se intentó un cálculo aproximado de los Pesos Molecula--



res de las proteínas que más comúnmente desaparecían en las - células tratadas con novobiocina, utilizando estándares de pesos moleculares conocidos.

- i) 430000;    ii) 370000;    iii) 294000;    iv) 165000
- v) 79000;    vi) 47000

Debido a problemas técnicos no se pudo establecer más categóricamente el P.M. de proteínas que aparecen o desaparecen durante el transcurso del proceso esporulatorio.

## 6. DISCUSION

Se ha visto que la síntesis de DNA es un requerimiento esencial para que la esporulación se lleve a cabo. Esto se ha demostrado en células auxótrofas a timina inducidas a esporular, privadas de ésta (Mandelstam et al 1971), y utilizando HPURA, inhibidor específico de síntesis de DNA (Dunn et al -- 1978).

Para ampliar el estudio del efecto de otros inhibidores de síntesis de DNA, Vázquez y Mandelstam utilizaron a los inhibidores de girasa.

En su estudio del efecto de estos inhibidores sobre la esporulación, mostraron que la inhibición del proceso debida a estos inhibidores no estaba relacionada con el bloqueo de síntesis de DNA. La evidencia apuntaba hacia un efecto en la síntesis de RNA, es decir, sobre transcripción.

Este trabajo experimental sugiere un mecanismo similar.

La síntesis de RNA se vió bloqueada parcialmente al agregar la novobiocina desde el inicio de la esporulación, al igual que la síntesis de proteínas. Esto explicaría el efecto inhibitorio sobre la esporulación, ya que no permitiría la continuación de la secuencia primaria de eventos bioquímicos, al afectar al azar proteínas específicas del proceso.

Sin embargo, al agregar el inhibidor a diferentes tiempos de inducida la esporulación, se observó una progresiva resistencia a su efecto sobre la síntesis de RNA y proteínas. - Esto no era debido a alguna alteración de permeabilidad celular, ya que se obtuvo similar resultado con células de diferentes tiempos de inducción tratadas con tolueno.

La evidencia obtenida de que conforme transcurre el proceso las células son menos sensibles a los inhibidores de girasa sugiere que 1) la función de la DNA girasa es diferente en células en crecimiento vegetativo y en células en esporulación, al comparar los diferentes efectos de los inhibidores - en cada caso ó

2) Podría existir una girasa diferente a la encontrada - en células vegetativas, menos sensible al inhibidor, que pudiera ser sintetizada en las etapas iniciales del proceso esporulatorio, lo que sugeriría un mecanismo por el cual la actividad de girasa estuviera implicada en la regulación de la esporulación.

La obtención de mutantes resistentes a la novobiocina -- permitió la comparación de los resultados obtenidos con la cepa sensible. Estas mutantes sirvieron también para la comparación de los cambios en composición protéica sufridos por células en esporulación en presencia y ausencia de novobiocina.

Se comprobó que las mutantes resistentes a novobiocina -



debían su resistencia a la modificación de la subunidad B de la girasa (Proteína "blanco" del inhibidor) al mostrarse que

1) La síntesis de DNA en células en fase vegetativa permeabilizadas con tolueno no sufría ninguna inhibición en presencia de novobiocina y

2) El gene que confería la resistencia a la novobiocina en las mutantes estaba localizado en la región del cromosoma de Bacillus subtilis en donde se ha reportado la posición del gene nov A codificante para la subunidad B de la girasa.

El mapeo genético realizado, modifica ligeramente los reportes anteriores de la localización del gene nov A, ya que aquí se reporta más cercano al gene marcador cysA que a pur A.

La aparición de proteínas específicas del proceso esporulatorio tanto en células silvestres como en mutantes inducidas a esporulación, y la no aparición de esas proteínas en células silvestres tratadas con novobiocina refuerzan la sugerencia de que la girasa está involucrada en la transcripción de genes esenciales al proceso. Esto indicaría la posible función de regulación de expresión genética por la DNA girasa en las etapas iniciales de la esporulación.

## 7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1) Beamon, T.C., Greenemyre, J. T., Corner, T.C., Pankranz, H. S. y Gerhardt P. (1982). J. Bacteriol. 150: 870-877.
- 2) Bradbury, J. H., Foster, J.H., Hammer, B., Lindsay, J. y Murrel, W. (1981) Biochem. Biophys. Acta 678: 157-164
- 3) Canosi, U. y Mazza, G. (1980) Int. Res. Commun. Syst. 2: 1679.
- 4) Clarcke, S. y Mandelstam, J. (1980) J. Gen. Microb. 121: 487-490
- 5) Coote, J. G. (1972) J. Gen. Microb. 71: 17-27
- 6) Coote, J. G. y Mandelstam, J. (1973) J. Bacteriol. 114: 1254-1263
- 7) Dancer, B. N. y Mandelstam, J. (1975) J. Bacteriol. 121: 411-415
- 8) Dawes, I. W., Kay, D. y Mandelstam, J. (1969) J. Gen. -- Microb. 56: 171-179
- 9) Dawes, I. W., Jay, D. y Mandelstam, J. (1971) Nature - 230: 567-569
- 10) Dawes, I. W. y Mandelstam, J. (1970) J. Bacteriol. 103: 529-535.

- 11) Dhariwal, K. R., Vasantha, N. y Freese, E. (1982). J. Bacteriol. 149: 1146-1149.
- 12) Donohue, T.J. y Bernlohr, R. W. (1978) Spores VII (G. Chambliss, J.C. Vary eds) págs. 293-298
- 13) Dunn, G., Jeffs, P., Mann, N. H., Torgerson, D. H. y - - Young, M. (1978) J. Gen Microb. 108: 189-195
- 14) Gellert, M., Mizuuchi K, O'Dea, M., Nash, H.A. (1976a) Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 3872-3876
- 15) Gellert, M., O'Dea, M., Itoh, T.J., Tomizawa, J. (1976b) Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 4474-4478
- 16) Gellert, M., Mizuuchi K., O'Dea M., Itoh T y Tomizawa, J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4772-4776
- 17) Ginsberg, D. y Keynan, A. (1978) J. Bacteriol. 136: 111-116
- 18) Gómez E, C. (1981) J. Bacteriol. 138: 314-319
- 19) Gottfried, M., Orrego, C., Keynan, A. y Halvorsen, H. O.- (1979) J. Bacteriol. 148: 745-752
- 20) Goodenough U. y Levine R.P. Genetics. Holt, Rinehart and Winston, Inc. 1974.
- 21) Herrero, E., Fairweather, M. F., Hillard F. E. (1982) J. Gen. Microb. 128: 361-370.

- 22) Ikehara, K., Okamoto, M., Sugae, K.I. (1982) J. Biochem.  
(Tokyo) 91: 1089-1092
- 23) Jenkinson, H. (1981) J. Gen. Microb. 127: 81-91
- 24) Karamata, D. y Gross, J. D. (1970) Mol. Gen. Genet. 108:  
277-287
- 25) Keynan, A., Berns A.A., Dunn G., Young M., Mandelstam J. -  
(1976) J. Bacteriol. 128: 8-14
- 26) Laemmli, U. K. y Favre M. (1973) J. of Molec. Biol. 80: -  
575-599
- 27) Lang, Yang H., Heller K, Gellert M. y Zubay G. (1979) Proc.  
Natl. Acad. Sci. 76: 3304-3308
- 28) Liu, L. F. y Wang J. C. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:  
2098
- 29) Mandelstam, J. (1969) Symp. Soc. Gen. Microb. 19: 377-402
- 30) Mandelstam, J. (1971) Symp. Soc. Exp. Biol. 25: 1-26
- 31) Mandelstam, J. (1976) Proc. R. S. London. Ser. B. 193: -  
89-106
- 32) Mandelstam, J. y Higgs S. A. (1974) J. Bacteriol. 120: -  
38-42
- 33) Mandelstam, J., Sterlini J. M., Kay D. (1971) Biochem. J.  
125: 635-641

- 34) Matsushita, Y., Sueoka, N. (1974) J. Bacteriol. 118: 974-979.
- 35) Miyakawa, Y., Teruya, K., Mariyama, Y. (1982) J. Bacteriol. 149: 673-680
- 36) Mizuuchi, J., O'Dea M., Gellert, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 5960-5963
- 37) Ochi, K., Kandala J. C., Freese E. (1981) J. Biol. Chem. 256: 6866-6875
- 38) Ogasawara, N., Seiki, M. y Yoshikawa, H. (1979) Nature 281: 702-704
- 39) Oishi, M., Yoshikawa H., Sueoka N. (1964) Nature 204: -- 1069-1073
- 40) Oostra, B.A., Van Viet A.J., Geert, A. B., Gruber M. (1981) J. Bacteriol. 148: 782-787
- 41) Orr, E., Staudenbauer, W. (1982) J. Bacteriol. 151: 524-527
- 42) Peebles, C. L., Higgins, N. P., Kreuzer, K. N., Morrison A. y Brown, P. O., Sugino, A. y Cozzarelli, N. R. (1979) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 41-52
- 43) Piggot, P. J., Coote J. G. (1976) Bact. Rev. 40: 908-952
- 44) Pugsley A. P. (1981) Mol. Gen. Genet. 183: 522-527

- 45) Ryter A.- (1965) Annales de l'Institut Pasteur, Paris -  
108: 40
- 46) Sanzey B. (1979) J. Bacteriol. 138: 40-47
- 47) Schaffer P., Millet J., Aubert J. P. (1965) Proc. Natl.-  
Acad. Sci. 54: 704
- 48) Smith C. L., Kubo M., Imamoto F. (1978) Nature 275: 420-  
422
- 49) Snyder M., Drlica K. (1979) J. Mol. Biol. 131: 287-302
- 50) Speck W, T, Rosenkranz P. G., Rosenkranz H. S. (1982) Mu--  
tat. Res. 104: 125-130
- 51) Sterlini, J. M., Mandelstam, J. (1969) Biochem. J. 113:  
29-37
- 52) Sugino A., Bott K. (1980) J. Bacteriol. 141: 1331-1339
- 53) Sugino A., Higgins P., Brown P. O., Peebles C. L., Cozza-  
relli N. R. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4838-4842
- 54) Sugino A., Peebles, C.L., Kreuzer, K. N., Cozzarelli, N.-  
R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4767-4771
- 55) Takahashi I.A. (1963) J. Gen. Microb. 31: 211-217
- 56) Vázquez, R., J. M., Mandelstam, J. (1982) J. Gen. Microb.-  
127: 11-22

- 57) Wang, J. C. (1978) DNA Synthesis (Plenum Press N. Y.), -  
referida en Fochles et al (1979)
- 58) Young, M., Mandelstam, J. (1980) Adv. in Microb. Phys. -  
20: 103-162