

00322

# Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Ciencias

32

## El Superenrollamiento del DNA y el Regulador Transcripcional $\sigma^S$ en la Fase Estacionaria de *Escherichia coli*

**T E S I S**  
Que para obtener el título de:  
**B I Ó L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
**LUIS GABRIEL CONTRERAS FERRAT**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo de tesis.  
NOMBRE: Luis Gabriel Contreras Ferrat  
FECHA: 10 junio 2003  
FIRMA: [Firma]



Directora de Tesis: Dra. Ma. del Carmen Gómez Escheleman



2003

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

El Superenrollamiento del DNA y el Regulador Transcripcional  $\sigma^s$  en la Fase Estacionaria de *Escherichia coli*.

realizado por Luis Gabriel Contreras Ferrat

con número de cuenta 09432400-0 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann

Propietario

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Propietario

Dr. Jesús Ramírez Santos

Suplente

Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

Dr. René de Jesús Cardenas Vázquez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann la oportunidad de trabajar bajo su dirección.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos, por sus críticas y orientación en todo aspecto del desarrollo de este trabajo.

Al Sr. Miguel Paez Silva, por el apoyo técnico.

Agradezco la revisión de esta tesis a mis sinodales, la Dra. Rosa Laura Camarena Mejía, el Dr. Jesús Ramírez Santos, el Dr. Víctor Manuel Valdés López y el Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez.





## Índice

<b>Resumen</b>	11
<b>Introducción</b>	13
<b>1. El Superenrollamiento del DNA en <i>Escherichia coli</i></b>	13
1.1 Conceptos generales sobre el superenrollamiento del DNA	13
1.2 El superenrollamiento y la compactación del DNA en <i>Escherichia coli</i>	15
1.3 Las topoisomerasas y el control del superenrollamiento del DNA en <i>E. coli</i>	17
Topoisomerasas tipo 1	17
Mecanismo de catálisis de TopI	18
Topoisomerasas tipo 2	18
Mecanismo de catálisis de Girasa	19
Funciones biológicas de las topoisomerasas	22
1.4 Regulación del superenrollamiento del DNA y su efecto sobre la expresión génica	23
<b>2. La Fase Estacionaria en <i>Escherichia coli</i></b>	26
2.1 La respuesta de la fase estacionaria dependiente de <i>rpoS</i>	27
Caracterización de <i>rpoS</i> y $\sigma^S$	27
Genes regulados por $\sigma^S$	29
Regulación de la actividad de $E\sigma^S$	29
Regulación de la expresión de $\sigma^S$	33
Control a nivel transcripcional	34
Control a nivel traduccional	35
Control post-traduccional de los niveles de $\sigma^S$	37
<b>Objetivos</b>	39
<b>Materiales y Métodos</b>	41
1. Cepas bacterianas y plásmido	41
2. Medios y condiciones de crecimiento	41
3. Construcción de cepas <i>rpoS::Tn10 (Tc<sup>R</sup>)</i> por transducción generalizada mediada por el bacteriófago P1 <i>vir</i>	42

4. Verificación del fenotipo mutante <i>rpoS</i>	42
5. Transformación con el plásmido pMS01 (Ap <sup>R</sup> )	43
6. Determinación del nivel de superenrollamiento del plásmido pMS01	44
7. Determinación de la cantidad de las proteínas Gyr con anticuerpos	45
8. Medición de la expresión de los genes <i>gyr</i> en mutantes <i>rpoS</i> durante la fase estacionaria	47
<b>Resultados</b>	49
1. Construcción de mutantes <i>rpoS</i>	49
2. Implicación de $\sigma^S$ en la tensión helicoidal del DNA en la fase estacionaria	51
3. Efecto de $\sigma^S$ sobre la capacidad celular para generar superenrollamiento en el período de recuperación del crecimiento	53
4. La ausencia del gen <i>relA</i> no afecta la tensión helicoidal del DNA en la fase estacionaria	54
5. $\sigma^S$ y el superenrollamiento del DNA tras un período prolongado de fase estacionaria	56
6. La expresión de Girasa en las mutantes <i>rpoS</i>	57
<b>Discusión</b>	61
<b>Conclusiones</b>	69
<b>Perspectivas</b>	71
<b>Referencias</b>	73

## Resumen

En *Escherichia coli*, la tensión helicoidal o superenrollamiento del DNA depende principalmente del balance de las actividades de las Topoisomerasas I y II (o Girasa), y varía en respuesta a diversos estímulos ambientales. Esta variación influye en la transcripción de diferentes genes, posiblemente sirviendo como un mecanismo de regulación de la expresión génica en respuesta al estrés celular.

El superenrollamiento del DNA disminuye en la fase estacionaria. En un trabajo previo de este laboratorio se observó que la distribución de topoisómeros de un plásmido reportero de células en fase estacionaria difiere en los medios LB y LB adicionado con amortiguador MOPS. En medio LB se establece una distribución bimodal de plásmidos relajados y superenrollados, mientras que en LB-MOPS se observa una distribución de plásmidos relajados. Asimismo, en LB-MOPS el superenrollamiento del DNA se incrementa rápidamente al disponerse nuevamente de nutrientes. El uso de inhibidores de la transcripción, traducción, y de la actividad de la Girasa sugirieron que este incremento depende de las moléculas de Girasa existentes en la célula. La medición de la expresión de los genes de la Girasa, *gyrA* y *gyrB*, confirma esta suposición.

En la fase estacionaria, la expresión génica se reorganiza en forma dependiente del regulador transcripcional  $\sigma^S$ , codificado por *rpoS*. Entre los genes regulados por  $\sigma^S$  se encuentran genes para el metabolismo y la resistencia al estrés. Asimismo, se encuentran genes que afectan la topología y la estructura del DNA, i.e., *topA*, *dps* y *gyrI*. En este trabajo se determinaron el nivel de superenrollamiento de un plásmido reportero y la expresión de los genes *gyrA* y *gyrB* de mutantes *rpoS* en la fase estacionaria y en el período de recuperación del crecimiento por la adición de nutrientes. Además, se evaluó el efecto del gen *relA*, implicado en la regulación de la expresión de *rpoS*, en el superenrollamiento del plásmido.

En LB-MOPS, las mutantes *rpoS* exhibieron una distribución bimodal de topoisómeros similar a la de las células silvestres cultivadas en LB. Esta distribución se mantiene tras una fase estacionaria prolongada. La mutación de *rpoS* también afecta la capacidad para incrementar la tensión helicoidal del plásmido en el período de recuperación del crecimiento en LB-MOPS. Esta capacidad disminuye tras una fase estacionaria relativamente corta, y se pierde completamente al término de 72 horas en esta etapa. La distribución de topoisómeros de las células *rpoS* y silvestres son similares en medio LB. Los efectos observados fueron independientes de *relA*. Por otra parte, las cepas silvestres y *rpoS* mostraron niveles similares de transcripción de los genes *gyr*, y de las subunidades de la Girasa, a lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados indican que  $\sigma^S$  influye en el superenrollamiento del DNA en la fase estacionaria y en la transición al crecimiento exponencial. Aunque  $\sigma^S$  no afecta la expresión de los genes *gyr*, no se descarta un efecto sobre el ensamblaje de Girasa. Se propone que el efecto de  $\sigma^S$  en el superenrollamiento del DNA es el resultado de la influencia global de este regulador en la fisiología y en la supervivencia durante la fase estacionaria.

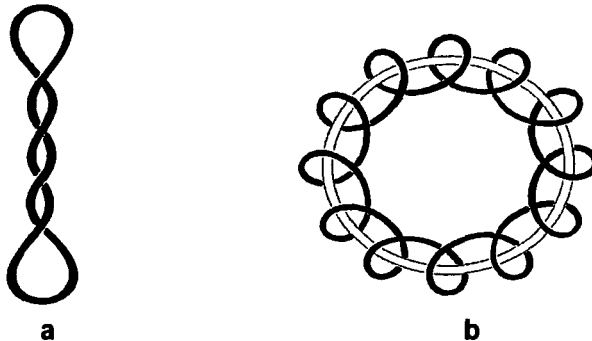


## Introducción

### 1. El Superenrollamiento del DNA en *Escherichia coli*

#### 1.1 Conceptos generales sobre el superenrollamiento del DNA

La tensión helicoidal o superenrollamiento del DNA es literalmente la revolución del eje de la doble hélice en el espacio. Existen dos formas básicas de superenrollamiento: plectonómico y toroidal. El superenrollamiento plectonómico implica el entrecruzamiento de la molécula sobre sí misma; es decir, el eje helicoidal describe a su vez una hélice en el espacio (Fig. 1a). Si el eje helicoidal describe una espiral alrededor de un eje cilíndrico, como lo es una proteína, el superenrollamiento es de tipo toroidal (Fig. 1b) (Cozzarelli & Wang, 1990; Gómez-Eichelmann & Camacho Carranza, 1995a).

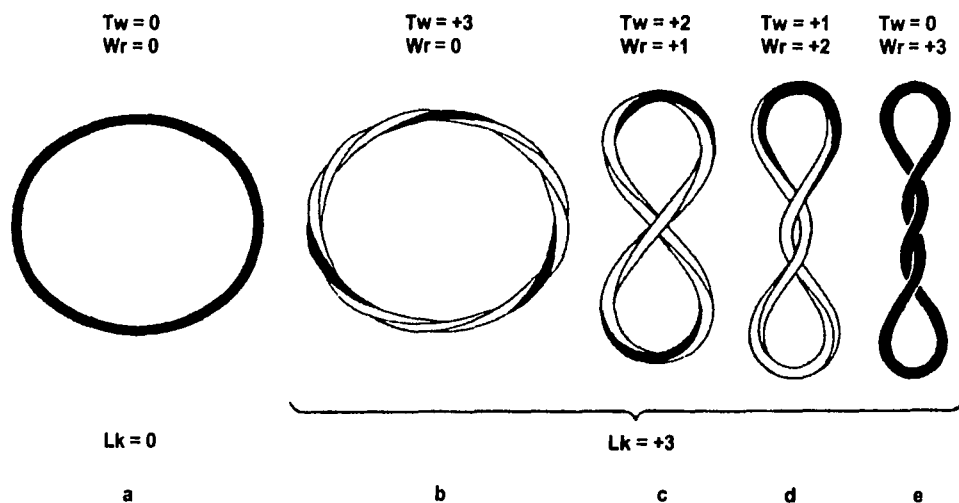


**Figura 1. Tipos de superenrollamiento plectonómico (a) y toroidal (b).** La doble hélice se representa como una línea sólida. En (a), una molécula de DNA circular se enrolla sobre sí misma; en (b), la misma molécula, pero describiendo una espiral en torno a un eje cilíndrico imaginario (Calladine & Drew, 1997).

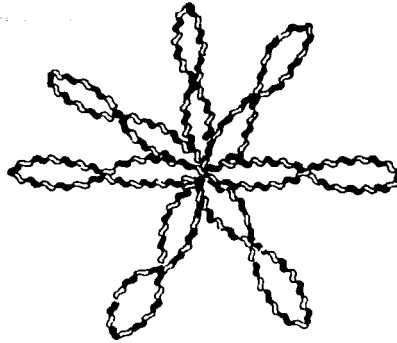
El nivel de superenrollamiento del DNA puede expresarse mediante la siguiente relación:  $Lk = Tw + Wr$ .  $Tw$  (twist) representa el número de revoluciones helicoidales en una conformación determinada; en el caso del B-DNA relajado, equivale al número de pares de bases de la molécula dividido entre 10.4.  $Wr$  (Writhe number) es el número de veces que la doble hélice pasa sobre sí misma en el espacio.  $Lk$  (Linking number) representa el exceso ó déficit de revoluciones helicoidales *in toto* (Calladine & Drew, 1997). La ecuación indica que los cambios en el número de revoluciones de una cadena sobre la otra ( $Lk$ ) equivale a la suma de los cambios en las revoluciones del DNA en el espacio ( $Wr$ ) y en las revoluciones de la doble hélice en su propio eje ( $Tw$ ).

La Figura 2 muestra esta relación en una molécula circular de B-DNA en la que se generó superenrollamiento plectonómico. En (a) la molécula se encuentra sin tensión helicoidal. Si se corta la doble hélice, se introducen 3 vueltas en el sentido de su rotación espacial, y se sella el corte, la molécula tendrá un exceso de tres revoluciones helicoidales, de manera que  $Tw = +3$  (Fig. 2b). En este estado la molécula es inestable y compensa la tensión estructural cruzando sobre sí misma, adquiriendo superenrollamiento plectonómico positivo (Figs. 2c, d, y e).  $Wr$  expresa el número de entrecruzamientos de la molécula en (c), (d) y (e); la molécula pierde una revolución helicoidal por cada entrecruzamiento, por lo que  $Lk$ , o la suma de  $Tw$  y  $Wr$ , permanece constante.

$Wr$  corresponde intuitivamente al concepto de superenrollamiento, pero la definición cuantitativa de este parámetro corresponde a  $Lk$ . Esto se debe a que  $Wr$  y  $Tw$  sólo especifican la forma y el tamaño de la molécula. Dado que son propiedades geométricas, su valor cambia ante la deformación. En cambio,  $Lk$  es un valor inalterable en cualquier molécula de DNA covalentemente intacta, *i.e.*, es una propiedad topológica (Cozzarelli & Wang, 1990).  $Lk$  puede expresarse mediante distintas combinaciones de  $Tw$  y  $Wr$ , pero su suma sólo cambiará si se rompen las cadenas del DNA.  $Lk$  refleja los cambios en la continuidad de la estructura, los cuales se generan por la actividad de las topoisomerasas.



**Figura 2. Formas relacionadas de una molécula de DNA circular con superenrollamiento. (a)** La molécula en ausencia de tensión helicoidal. **(b), (c), (d) y (e)** La molécula con un exceso de revoluciones helicoidales. **(c), (d) y (e)** La molécula con superenrollamiento plectonómico (Calladine & Drew, 1997).



---

**Figura 3. Organización del nucleóide de *Escherichia coli* en topodominios.** El DNA circular de 4,700 kpb se distribuye en regiones de superenrollamiento plectonómico delimitadas por barreras que impiden que la tensión helicoidal de una región altere la distribución de las regiones adyacentes (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995a) .

El superenrollamiento del DNA tiene dos implicaciones biológicas generales. Primero, es un medio para la compactación, la protección y la distribución ordenada del DNA dentro de la célula. Segundo, es un estado termodinámico favorable para los procesos que requieren la separación de la doble hélice, como la replicación y la transcripción. La transcripción genera tensión helicoidal local que, a su vez, afecta la expresión de genes aledaños. Esta observación, junto con el hecho de que el ambiente induce alteraciones en los patrones de transcripción y en la topología del DNA, trae a consideración una tercer implicación. Ésta es que el superenrollamiento del DNA posiblemente participa en la regulación de la expresión génica.

### **1.2 El superenrollamiento y la compactación del DNA en *Escherichia coli***

En eucariontes, el DNA se compacta mediante superenrollamiento toroidal. Segmentos de ~146 pb envuelven octámeros de proteínas denominadas histonas, formando nucleosomas. Éstos se yuxtaponen en filamentos espirales o solenoides de ~30 nm de diámetro, que contienen 6 nucleosomas por vuelta. La apariencia típica de los cromosomas en metafase se debe a la condensación de los solenoides a lo largo de un esqueleto de proteínas no-histónicas.

El DNA bacteriano no se organiza en arreglos nucleoproteicos distribuidos regularmente, sino en una estructura denominada nucleóide. En este arreglo la tensión helicoidal es de tipos plectonómico y toroidal (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995a). El nucleóide de *E. coli* es una molécula de DNA circular de ~4,700 kpb distribuidas en ~50 regiones topológicamente independientes de superenrollamiento plectonómico (*i.e.*, topodominios) (Fig. 3).



Se ha sugerido que una molécula central de RNA determina la estabilidad de los topodominios *in vivo*. Sin embargo, en los nucleoides purificados sólo se encuentran moléculas de mRNA naciente, y la rifampicina no modifica el número de topodominios en la célula. También se propuso que la membrana contribuye en la organización de los topodominios. Por ejemplo, la RNAP podría restringir la rotación del DNA y establecer un topodominio al acoplarse la transcripción y la traducción de proteínas que se insertan en la membrana (Pettijohn, 1996; Drlica & Woldringh, 1998; Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995b). Las contribuciones reales del RNA, la membrana celular y la transcripción en el establecimiento de estas barreras topológicas no se determinan aún.

Por otro lado, diversas proteínas interactúan con el DNA de *E. coli*, incidiendo simultáneamente en su organización y en la regulación de la expresión génica. Las proteínas del nucleoide más relevantes son Fis, HU, Hfq, H-NS, IHF y Dps (Pettijohn, 1988; Ali Azam & Ishihama, 1999; Ali Azam *et al.*, 1999).

**Fis** (factor for inversion stimulation) es un homodímero de 11.2 kDa que se identificó como un factor para la recombinación sitio-específica. Fis induce el doblamiento del DNA y actúa como regulador transcripcional de genes necesarios para el crecimiento y la replicación.

**HU** (heat unstable nucleoid protein) es un heterodímero de unidades HU-1 (9.2 kDa) y HU-2 (9.5 kDa). *In vitro*, tetrámeros de HU interactúan con segmentos de 58 pb y disminuyen la altura del DNA; pero no hay evidencia de la existencia de estos complejos en la célula. HU exhibe afinidad por estructuras cruciformes de DNA; la similitud de estas estructuras con los nodos plectonémicos sugiere que HU podría delimitar topodominios.

**Hfq** (host factor for phage  $Q_{\beta}$  replication) es una proteína de 11.2 kDa descrita originalmente como un factor para la replicación del bacteriófago  $Q_{\beta}$ . Hfq interactúa con RNA y DNA, exhibe fuerte afinidad por el DNA con curvatura, y regula la traducción de diversos transcritos (incluyendo el mRNA que codifica a  $\sigma^S$ ).

**H-NS** (histone-like nucleoid structuring protein) forma homodímeros de 15.4 kDa con afinidad por el DNA con curvatura; funge como regulador transcripcional global negativo, y es capaz de compactar y organizar el DNA. H-NS impide directamente la formación del complejo abierto, aunque también podría modular el nivel de superenrollamiento requerido para la transcripción (Tupper *et al.*, 1994; Pettijohn, 1996).

**IHF** (integration host factor) es un heterodímero constituido por IHF  $\alpha$  e IHF  $\beta$ , de 11.2 y 10.7 kDa, respectivamente. IHF se une al sitio *att* del nucleoide de *E. coli*, induce el doblamiento del DNA, y promueve la recombinación integrativa del bacteriófago  $\lambda$ . Además, es un regulador transcripcional global positivo con 30 % de homología con HU.

**Dps** (DNA-binding protein from starved cells), un monómero de 19 kDa, aumenta en la fase estacionaria hasta un nivel de ~200,000 moléculas por célula. Esta proteína se involucra en la protección del DNA contra el daño oxidativo (Martínez & Kolter, 1997), y en la depresión general de la transcripción mediante la conversión del nucleoide en una estructura cuasi-cristalina (Wolf *et al.*, 1999; Almirón *et al.*, 1992).

### 1.3 Las topoisomerasas y el control del superenrollamiento del DNA en *E. coli*

La variación del superenrollamiento plectonómico es función de las topoisomerasas, enzimas que cortan el DNA, translocan un segmento de éste a través del corte, y vuelven a ligarlo. Las topoisomerasas intervienen en todos los procesos del DNA de eucariontes y procariontes, y se han encontrado codificadas en genomas de bacteriófagos y virus (Champoux, 2001). La clasificación de estas enzimas depende del tipo de corte que introducen. Las topoisomerasas tipo 1 generan cortes de cadena sencilla, y modifican la tensión helicoidal en una supervuelta por ciclo de reacción. Las topoisomerasas tipo 2 cortan ambas cadenas, y modifican la tensión helicoidal en dos supervueltas en forma dependiente de la hidrólisis de ATP (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995b; Wang, 1996; Champoux, 2001).

*E. coli* posee cuatro topoisomerasas: las Topoisomerasas I y III, del tipo 1, y las Topoisomerasas IV y II (o Girasa), del tipo 2. Por su relevancia para la supervivencia celular, la Topoisomerasa I y la Girasa han sido objeto de una investigación exhaustiva. Los modelos de actividad catalítica de este par de enzimas parecen ser paradigmas del funcionamiento general de las otras dos topoisomerasas existentes en esta bacteria.

#### Topoisomerasas tipo 1

La **Topoisomerasa I** (Top I) es un monómero de 102 kDa cuyo gen estructural, *topA*, se sitúa en el minuto 28 del mapa genético de *E. coli*. *In vitro*, cataliza la relajación de DNA superenrollado negativamente y, en ciertas condiciones, la resolución de nudos intramoleculares en DNA circular y la encadenación-desencadenación de círculos de DNA en forma dependiente de  $Mg^{2+}$ . La delección de *topA* es tolerada sólo en presencia de mutaciones compensatorias en los genes que codifican a Girasa.

La Figura 4a resume la organización de TopI. El dominio de corte y pasaje se encuentra en los primeros 582 aa del extremo N-terminal; la reacción de corte depende del residuo Tyr389. Este residuo se encuentra en una región cuyo plegamiento es similar a la región de unión al DNA de CAP (catabolite activator protein). La región de 582 aa es sucedida por otra de 162 aa; ésta contiene tres dominios de unión a  $Zn^{2+}$ , de los cuales el primero es necesario para la reacción de relajación. Los últimos 121 aa del extremo C-terminal incrementan la estabilidad del complejo DNA:Top I, aunque son dispensables para la actividad *in vitro* (Champoux, 2001; Wang, 1996).

La **Topoisomerasa III** (Top III) es una proteína de 75 kDa codificada por *topB* (minuto 38.7 del mapa genético de *E. coli*). *In vitro*, TopIII resuelve nudos en moléculas de DNA circular y encadena-desencadena DNA circular de manera más eficiente que Top I (pero no es esencial para la supervivencia). Además de  $Mg^{2+}$ , requiere  $K^{+}$  para su actividad. Las estructuras cristalinas de los dominios de corte y pasaje de Top III y Top I son similares, pero Top III carece de los dominios de unión  $Zn^{2+}$ . Sin embargo, su extremo C-terminal también contribuye a la unión al DNA. Esta región posiblemente promueve la actividad de encadenación-desencadenación (Champoux, 2001; Wang, 1996).

### **Mecanismo de catálisis de Top I**

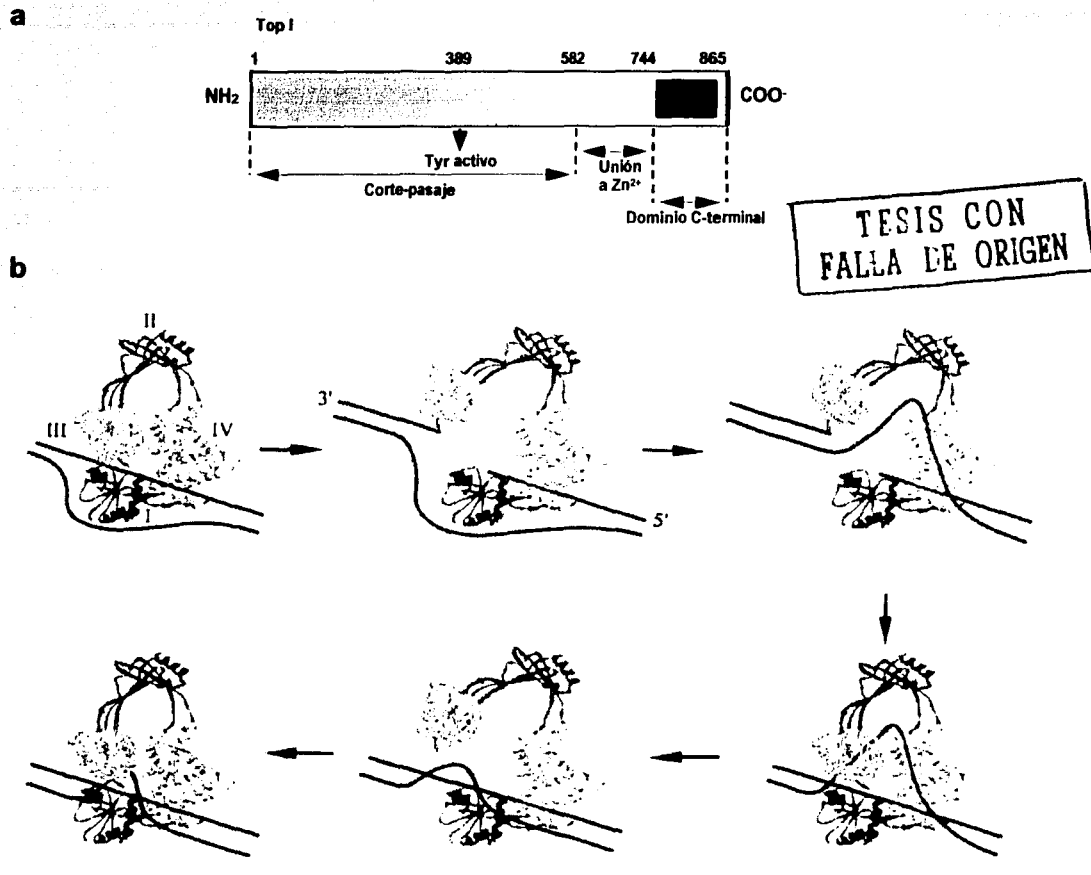
El modelo de funcionamiento de Top I es congruente con la estructura cristalina de un fragmento N-terminal de 67 kDa que retiene la capacidad de corte (Fig. 4b) (Champoux, 2001). Un segmento de cadena sencilla contacta una hendidura que se extiende entre los dominios I y IV. Un cambio conformacional en el dominio III sitúa al residuo Tyr389 cerca de este segmento. Mediante una reacción de trans-esterificación, Tyr389 corta y permanece unido al fosfato 5' de uno de los extremos de la cadena. Simultáneamente, el dominio III se eleva y abre un pasaje a la cavidad central, permitiendo la translocación de la cadena intacta, el cierre del pasaje, y la ligación del corte. El pasaje se abre y cierra por segunda vez, permitiendo la liberación de la cadena intacta y la disociación del complejo DNA:TopI.

### **Topoisomerasas tipo 2**

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

La estructura primaria de Girasa se esquematiza en la Figura 5a. GyrA exhibe las actividades de corte y ligación; el sitio activo Tyr122 se encuentra en una región estructuralmente parecida al sitio de unión de DNA de CAP. La porción terminal contiene una región en la que el sustrato forma una supervuelta toroidal positiva. El sitio ATPasa se sitúa entre los primeros 400 aa de GyrB. La porción C-terminal de esta subunidad es necesaria para la interacción  $A_2B_2$ . Esta región exhibe una inserción de ~170 aa, necesaria para su actividad *in vivo*, que no se encuentra en TopIV ó en cualquier otra topoisomerasa tipo 2 descrita (Wang, 1996; Champoux, 2001; Maxwell, 1998).

La **Topoisomerasa IV** (Top IV) es producto de los genes *parC* y *parE* (minuto 65 del mapa genético de *E. coli*), cuyas secuencias son homólogas a *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Par E (70 kDa) y ParC (75 kDa) forman un heterotetrámero  $C_2E_2$  que en presencia de ATP remueve supervueltas negativas hasta la relajación completa. Asimismo, encadena-desencadena y resuelve nudos intramoleculares de moléculas de DNA circular (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995; Zechiedrich *et al.*, 2000). Al igual que Girasa, esta enzima es esencial para la supervivencia celular.



**Figura 4. Organización y mecanismo catalítico de Top I.** (a) Esquema simplificado de la estructura primaria de Top I; se señalan los dominios relevantes para la actividad de la enzima. (b) Modelo del mecanismo de relajación de TopI; las cadenas del DNA se representan como líneas sólidas (ver texto) (Champoux, 2001).

### Mecanismo de catálisis de Girasa

La estructura cristalina de la Girasa intacta no se ha resuelto aún. Sin embargo, se dispone de la estructura de los dominios N-terminales de GyrB (de 43 kDa) y GyrA (de 59 kDa), y de un fragmento de 92 kDa de la Topoisomerasa II de *S. cerevisiae* (homólogo a los dominios C-terminales de las subunidades de Girasa) (Fig. 5a) (Champoux, 2001; Wang, 1996; Heddle *et al.*, 2001).

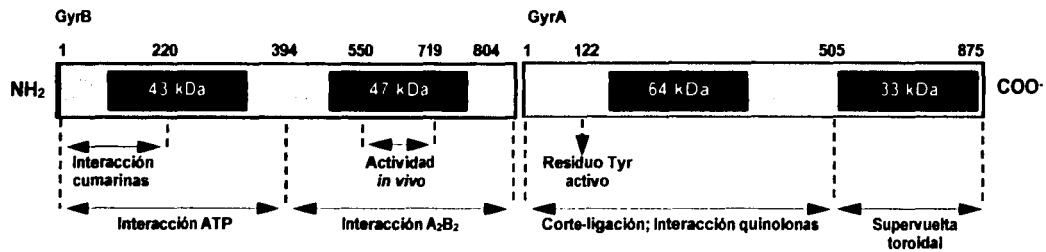
A partir de la información obtenida de estos fragmentos se ha inferido el mecanismo de catálisis de Girasa (Fig 5b). Los dominios de unión al ATP y de captura del DNA delimitan la puerta N (cerca del extremo N-terminal de la proteína). La puerta C (cerca del extremo C-terminal) acepta al segmento de DNA intacto tras el corte y la translocación, y está delimitada por la región N-terminal de GyrA. Aproximadamente 140 pb forman una supervuelta toroidal positiva en torno a la enzima. Un segmento de doble cadena se une al dominio de captura y corte, lo cual provoca la oscilación de la puerta N entre los estados abierto y cerrado. El segmento capturado se corta en forma independiente del ATP y, a través de los fosfatos de uno de sus extremos, permanece asociado covalentemente a los residuos Tyr122 de las subunidades GyrA. La ocupación de uno de los sitios de unión a ATP induce la conversión de la puerta N al estado cerrado y la unión de un segundo ATP (Champoux, 2001). Si en la cavidad N ha quedado atrapado un segmento intacto de DNA adyacente, se separan los extremos de las cadenas cortadas y se transloca el segmento intacto a la cavidad C. La hidrólisis del primer ATP posiblemente facilita la translocación (Baird *et al.*, 1999). La ligación del corte promueve la abertura de la puerta C y la liberación del segmento translocado. El ciclo de reacción termina cuando la puerta C se cierra rápidamente y se hidroliza el segundo ATP. La liberación de los productos de la hidrólisis de ATP induce la abertura de la puerta N, dejando preparada a Girasa para una nueva reacción.

La capacidad de Girasa para generar superenrollamiento negativo podría fundamentarse en la relación espacial de los segmentos T y G. El sentido del nodo establecido por los segmentos coincide con el de la tensión helicoidal de la molécula. Cualquier topoisomerasa tipo 2 distinta a Girasa produce relajación al cancelar dos supervueltas. En el caso de Girasa, la supervuelta toroidal impuesta por la región C-terminal de GyrA dicta un sentido positivo en el nodo. Al translocarse el segmento de doble cadena se cancela un nodo positivo, por lo que se introduce superenrollamiento plectonómico negativo (Champoux 2001).

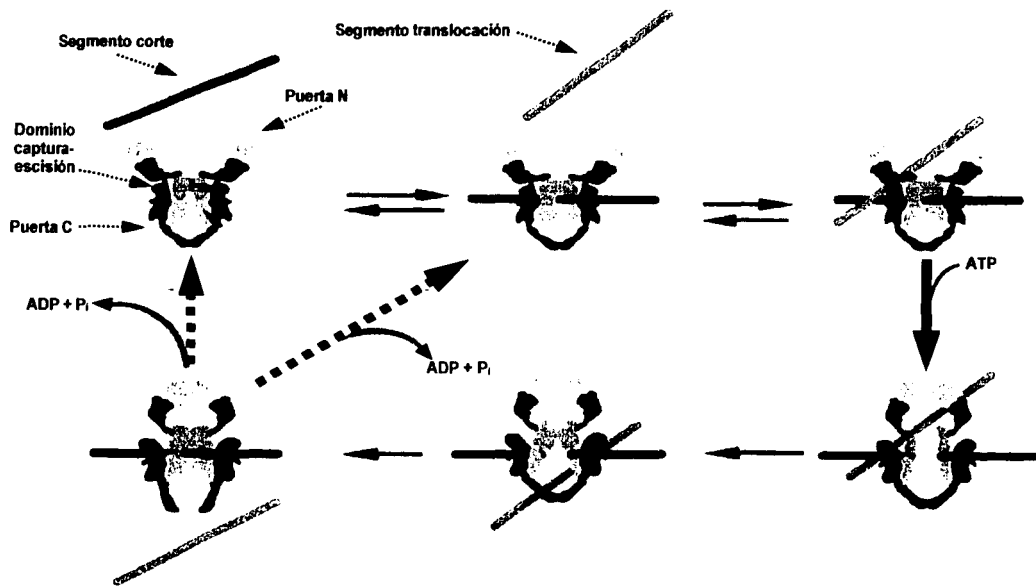
Girasa es blanco de diversos compuestos biológicos y sintéticos. Estos compuestos pueden agruparse en función de su mecanismo de acción. La primer clase reúne a las cumarinas (e.g., cumermicina y novobiocina), compuestos producidos por *Streptomyces spp.* que inhiben competitivamente la unión del ATP a GyrB. Por lo tanto, las cumarinas inhiben la introducción de superenrollamiento, pero no la relajación. La escasa similitud estructural entre el ATP y las cumarinas sugiere que tienen sitios de unión próximos y mutuamente excluyentes (Maxwell, 1998; Lewis *et al.*, 1996).

La segunda clase es representada por las quinolonas (e.g., ácido nalidixico y ciprofloxacina), antibióticos sintéticos que estabilizan la unión covalente DNA:Girasa e impiden la ligación del segmento cortado. La afinidad de las quinolonas por el DNA de cadena sencilla sugiere que podrían unirse a los bordes del corte; sin embargo, la mutación de Tyr122 no impide la asociación de las

**a**



**b**



**Figura 5. Organización y mecanismo catalítico de Girasa.** (a) Esquema simplificado de la estructura primaria de Girasa; se señalan los dominios relevantes para la actividad de la enzima y la interacción de sus inhibidores. (b) Modelo del mecanismo de introducción de superenrollamiento; los segmentos de doble cadena se representan como líneas sólidas (ver texto) (Modificada de Champoux, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

quinolonas (Maxwell, 1998; Lewis *et al.*, 1996).

Los inhibidores peptídicos CcdB (11.7 kDa) y microcina B17 (3.1 kDa) actúan de manera similar a las quinolonas, y son codificados por plásmidos de enterobacterias. CcdB es la toxina del módulo de muerte celular programada *ccdAB* (control of cell death) de los plásmidos F. Esta proteína bloquea la actividad corte-ligación de Girasa mediante una interacción directa con GyrA (Couturier *et al.*, 1997).

Las células que contienen el plásmido con el operón *mcb* sintetizan y secretan microcina B17 en la fase estacionaria. El operón *mcb* también contiene los genes para la inmunidad de las células que lo contienen. En presencia de ATP, la microcina B17 estabiliza el complejo de corte-ligación (Heddle, *et al.*, 2001; Zamble *et al.*, 2001).

Gyrl (*gyrase inhibitor*) constituye una nueva clase de inhibidor, pues es un factor codificado por el cromosoma que suprime directamente la actividad de Girasa (Nakanishi *et al.*, 1998). *gyrl* (*sbmC*) se identificó como un gen situado en el minuto 44 del mapa genético de *E. coli*, y cuya sobre-expresión confiere resistencia a la microcina B17 (Baquero *et al.*, 1995). Gyrl (18 kDa) secuestra a Girasa ó, alternativamente, impide el paso de unión de la enzima al DNA. Este modelo se basa en tres observaciones. Primero, Gyrl se asocia fuertemente a la holoenzima, pero débilmente a las subunidades por separado (Nakanishi *et al.*, 2002). Segundo, inhibe la introducción y la relajación del superenrollamiento dependientes de Girasa (Chatterji & Nagaraja, 2002). Tercero, evita la acumulación de cortes de doble cadena en presencia de inhibidores como la microcina B17 (Baquero *et al.*, 1995; Chatterji & Nagaraja, 2002). A partir de la última observación se propuso que en condiciones de estrés Gyrl contrarresta los efectos de los inhibidores peptídicos *in vivo* (Chatterji & Nagaraja, 2002). De manera interesante, la expresión de *gyrl* aumenta en la transición hacia la fase estacionaria, y su promotor exhibe una secuencia -10 putativamente dependiente de  $\sigma^S$  (Nakanishi *et al.*, 1998).

### **Funciones biológicas de las topoisomerasas**

Cada una de las topoisomerasas es responsable de un conjunto definido de funciones *in vivo*, aunque los análisis bioquímicos muestran cierto grado de superposición de actividades.

El DNA de *E. coli* se encuentra en un margen global de superenrollamiento negativo. Este margen depende principalmente del balance de las actividades complementarias de Girasa y Top I. Posiblemente, Top IV actúa junto con TopI en la modulación global de la tensión helicoidal negativa; mediante la inactivación selectiva de Top I y Top IV se ha determinado que TopIV contrarresta significativamente el efecto de Girasa *in vivo* (Zechiedrich *et al.*, 2000). Girasa es responsable de la tensión negativa necesaria para la replicación y la partición del DNA. También relaja el superenrollamiento positivo generado por la DNA polimerasa al frente de la horquilla (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995; Champoux, 2001). Top IV desencadena las moléculas hijas al término de la replicación, y sepa-

ra moléculas encadenadas por la recombinación sitio-específica (Zechiedrich *et al.*, 1997). La resolución de nudos intramoleculares *in vivo* también depende de Top IV (Deibler *et al.*, 2001).

El avance de la maquinaria de transcripción induce tensión helicoidal positiva al frente y negativa atrás de la RNAP (Rahmouni & Wells, 1992). La relajación de esta tensión implica directamente a Girasa y Top I. Aparentemente, TopI es más importante que Top IV en la relajación de la tensión inducida por la transcripción porque su tasa de relajación es superior (Massé & Drolet, 1999; Zechiedrich *et al.*, 2000).

Girasa podría participar en la conformación del nucleoide mediante la formación de estructuras toroidales en sitios preferenciales. Las secuencias REP (repetitive extragenic palindromic sequences) son sitios potenciales de unión para Girasa (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995b).

La relevancia biológica de Top III no se determina aún. Esta enzima se involucra en la separación de estructuras precursoras de encadenación en la vecindad de la horquilla de replicación (Champoux, 2001). Asimismo, parece ser importante para mantener una frecuencia baja de mutaciones espontáneas provocadas por la pérdida de DNA (Gómez-Eichelmann & Camacho-Carranza, 1995b).

#### **1.4 Regulación del superenrollamiento del DNA y su efecto sobre la expresión génica**

Las mutantes deficientes en Top I exhiben un crecimiento pobre y superenrollamiento negativo excesivo, a menos que aparezcan mutaciones compensatorias espontáneas en *gyrA* o *gyrB*. Esta observación condujo a la propuesta de que el superenrollamiento del DNA es susceptible a un mecanismo homeostático de autorregulación. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el promotor de *topA* se activa por el incremento del superenrollamiento, mientras que los promotores de *gyrA* y *gyrB* se activan en DNA relajado (Tse-Dinh & Beran, 1988; Menzel & Gellert, 1987).

Por otro lado, los estímulos ambientales afectan significativamente la tensión helicoidal del DNA. Las condiciones anaeróbicas e hiperosmóticas ocasionan el incremento del nivel de superenrollamiento (Drica & Woldringh, 1998; Higgins *et al.*, 1988; Conter *et al.*, 1997), mientras que la limitación de fuentes de carbono y de energía inducen la relajación del DNA (Balke & Gralla, 1987; Jensen *et al.*, 1995; Reyes *et al.*, 2003). La tensión helicoidal afecta la transcripción de diversos genes. La expresión de genes inducidos anaeróbicamente (como *cydAB*, para la citocromo oxidasa *bd*) ó hiperosmóticamente (como *proU*, para el sistema de transporte de la betaína de glicina) aumenta en templados superenrollados (Bebington & Williams, 2001; Higgins *et al.*, 1988).

La congruencia entre la tensión helicoidal requerida para estimular estos genes, y la tensión observada en las condiciones en las cuales se inducen, sugiere que el superenrollamiento del DNA constituye un mecanismo global de respuesta al estrés. Este modelo necesita sustentarse en el discernimiento de las rutas de señalización por las cuales se induce la alteración topológica del DNA. Asimismo,



mo, se requieren análisis detallados de los cambios de patrón de expresión génica que parecen depender de la topología del DNA.

El efecto del ambiente sobre la tensión helicoidal depende (al menos parcialmente) del potencial fosforilativo de la célula. A partir de una serie de observaciones se ha propuesto la existencia de un control termodinámico, adicional al de tipo homeostático, del superenrollamiento del DNA. La actividad *in vitro* de Girasa es muy sensible a la relación [ATP]/[ADP] (Westerhoff *et al.*, 1988). Asimismo, la relación [ATP]/[ADP] y el superenrollamiento varían paralelamente en situaciones de estrés, como en las condiciones anaeróbicas y de choque térmico (Drica & Woldringh 1998; Van Workum *et al.*, 1996; Camacho-Carranza *et al.*, 1995). La manipulación del nivel celular de la H<sup>+</sup>-ATPasa corrobora esta relación causal. Aparentemente, la dependencia de la tensión helicoidal hacia el nivel energético de la célula es fuerte cuando el cociente [ATP]/[ADP] es bajo. El mecanismo termodinámico predomina en esa condición, pero el control homeostático compensa el efecto del estado energético sobre la tensión helicoidal cuando el cociente [ATP]/[ADP] varía alrededor de un valor elevado (Jensen *et al.*, 1995).

El estudio del superenrollamiento del DNA en el estrés por calor es el ejemplo más ampliamente tratado de la relación entre la topología del DNA y el ambiente. El nivel de superenrollamiento aumenta junto con la temperatura de crecimiento en *E. coli*. Este aumento se presenta también a temperaturas que inducen la respuesta al estrés por calor dependiente de  $\sigma^H$  (o  $\sigma^{32}$ ). El comportamiento observado es parte de una respuesta homeostática al efecto de la temperatura sobre el DNA y la supervivencia.

El DNA se relaja de manera inmediata y transitoria tras la elevación de la temperatura. Este efecto tiene una componente termodinámica, pero experimentos con mutantes *topA* e inhibidores de Girasa indican que TopI y Girasa son responsables de la relajación. Esta etapa no requiere la síntesis de proteínas de respuesta al choque térmico, la relajación también ocurre en una mutante *rpoH* (Tse-Dinh *et al.*, 1997; López-García & Forterre, 2000). En una segunda etapa, Girasa es responsable de la recuperación del superenrollamiento negativo, lo cual coincide con el aumento de la relación [ATP]/[ADP]. El cloramfenicol inhibe el aumento del superenrollamiento, indicando que la síntesis de proteínas, *e.g.*, chaperonas, es necesaria para la recuperación (Camacho-Carranza *et al.*, 1995). Se ha propuesto que DnaK es esencial para este proceso, y ensayos *in vitro* muestran que esta chaperona estimula la actividad de Girasa (Tse-Dinh *et al.*, 1997; López-García & Forterre, 2000).

Aunque en menor grado, el estudio del superenrollamiento del DNA se ha extendido al estrés nutricional y la fase estacionaria. Balke y Gralla (1987) determinaron el efecto de la remoción abrupta de la fuente de carbono sobre la tensión helicoidal de un plásmido reportero. Se observó que el superenrollamiento del DNA disminuye en esta condición. La ligera relajación del plásmido de células cultivadas en presencia del des-acoplador energético dinitrofenol sugirió que el agotamiento del ATP no condiciona la relajación.

En el laboratorio de la Dra. Gómez Eichelmann se observó que la tensión helicoidal de un plásmido

reportero de células cultivadas en medio LB disminuye en la fase estacionaria (Reyes-Domínguez, 2000). La distribución de topoisómeros observada varía dependiendo de la presencia ó ausencia de un amortiguador. Este estudio se extendió a la determinación de la capacidad celular para recuperar el superenrollamiento del DNA al disponerse nuevamente de nutrimentos. Solamente en un medio que permanece neutro se incrementa rápidamente el superenrollamiento. El uso de inhibidores transcripcionales, traduccionales, y de la actividad de la Girasa indican que la recuperación del superenrollamiento no depende de la síntesis *de novo* de Girasa, sino de las moléculas de Girasa existentes en la célula. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la actividad de los genes *gyrA* y *gyrB*, y la cantidad de Girasa, se mantienen a lo largo de la fase estacionaria (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

La fase estacionaria es un proceso adaptativo que no parece depender del agotamiento de un nutriente específico, y factores adicionales como la densidad celular contribuyen a su activación (Hengge-Aronis, 2000). El hecho de que las células en fase estacionaria son metabólicamente activas, y muestran una expresión génica diferencial, indica que también en este caso el superenrollamiento varía definidamente y repercute en la fisiología celular.

En la última década se han enfocado esfuerzos en el entendimiento de la fisiología y expresión genética de las células en fase estacionaria. Una buena proporción de estos esfuerzos se dirigen a la caracterización de  $\sigma^S$ , la subunidad  $\sigma$  de la RNAP específica de la fase estacionaria. El número de genes en los que  $\sigma^S$  influye y la compleja regulación de su expresión sugieren que es un regulador maestro en las condiciones de estrés. El posible efecto de  $\sigma^S$  sobre el superenrollamiento del DNA en la fase estacionaria y en la reanudación del crecimiento es el motivo de este trabajo. Por ello, en la siguiente parte de la introducción se revisan el papel regulador y el control de la expresión de este factor  $\sigma$ .

## 2. La Fase Estacionaria en *Escherichia coli*

Las bacterias enfrentan constantemente condiciones que limitan ó impiden su crecimiento. Su habilidad para colonizar un ambiente requiere la capacidad para alternar períodos de rápida división celular y de crecimiento casi nulo o de latencia aparente. Esto lo logran mediante la expresión oportuna de genes que suelen organizarse en redes de regulación global.

*E. coli* posee redes de respuesta a condiciones adversas como el estrés calórico, el daño al DNA, el estrés oxidativo, y la limitación nutrimental. Específicamente, la respuesta a la limitación nutrimental comprende dos etapas parcialmente superpuestas. La primera implica la inducción de genes para la incorporación de nutrimentos específicos presentes en bajas concentraciones, o la utilización de fuentes nutrimentales no preferenciales (Hengge-Aronis, 1996). Estos genes pertenecen a sistemas de expresión como los regulones CRP:cAMP y PhoBR, inducidos en condiciones limitantes de glucosa y fósforo, respectivamente. Las células continúan dividiéndose hasta que agotan nutrimentos esenciales, entonces suspenden el crecimiento e ingresan a la fase estacionaria. La transición a esta etapa implica la disminución de la expresión de la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento exponencial, y también la inducción de un subgrupo de genes implicados en una reorganización fisiológica para el mantenimiento de la viabilidad durante la inanición.

Las células en fase estacionaria muestran un re-direccionamiento metabólico general: disminuyen la tasa global de síntesis de proteínas y acumulan compuestos de reserva, e.g., polifosfato y glucógeno (Azam *et al.*, 1999; Goodrich *et al.*, 1996). El número de ribosomas se reduce, posiblemente por su degradación y ulterior uso como fuente nutrimental, y se sintetiza el factor modulador de ribosomas (RMF), para la dimerización y conservación de los mismos (Huisman *et al.*, 1996). A nivel estructural se observan la disminución del tamaño y la adopción de una forma esférica, así como una tendencia a formar agregados. Las envolturas celulares sufren una recomposición crítica. En la membrana citoplásmica aumenta la cantidad de ácidos grasos poli-insaturados y de derivados ciclopropílicos (Huisman *et al.*, 1996). En la capa de mureína y en la membrana externa aumentan el nivel de entrecruzamiento covalente del péptidoglicano y el contenido de lipopolisacáridos, respectivamente (Huisman *et al.*, 1996; Goodrich, *et al.*, 1996). En la fase estacionaria ocurren cambios topológicos en el DNA que coinciden con la disminución de la expresión génica. La tensión helicoidal de los plásmidos disminuye (Balke & Gralla, 1987; Schneider *et al.*, 1997; Reyes-Domínguez, 2000), y el nucleóide se condensa por el efecto de co-cristalización de la proteína Dps (Almirón *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1999).

El uso de inhibidores de la síntesis de proteínas en el ingreso a la fase estacionaria disminuye críticamente la supervivencia de *E. coli* durante la fase estacionaria (Nyström & Neidhardt, 1994). Esta observación indica la necesidad de la activación temprana de mecanismos de regulación global que promuevan la supervivencia a largo plazo en esta condición.

La red de regulación dependiente del gen *rpoS* tiene ese carácter esencial para *E. coli*. Este gen codifica un factor  $\sigma$  específico de la fase estacionaria,  $\sigma^S$ , que modula la expresión de más de 90 genes implicados en la supervivencia durante la fase estacionaria y en la resistencia a otros tipos de estrés.

## 2.1 La respuesta de la fase estacionaria dependiente de *rpoS*

La expresión de *rpoS* se incrementa en condiciones hiper-osmóticas, de pH ácido, oxidativas, y de altas temperaturas (Hengge-Aronis *et al.*, 1993; Muffler *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1997b; Sledkeski *et al.*, 1996). Las células sometidas a estas condiciones exhiben características similares a las de la fase estacionaria inducida por el agotamiento nutricional. Esto ha sugerido la existencia de una respuesta general al estrés celular cuyo regulador maestro es  $\sigma^S$  (Hengge-Aronis, 2000).

Diferentes alelos mutantes de *rpoS* fueron descubiertos de manera independiente, y denominados en función de los procesos en los cuales intervienen (Kolter, 1999; Loewen & Hengge-Aronis, 1994). El primero fue *nur*, involucrado en la resistencia a la radiación ultravioleta cercana. Posteriormente se encontró un regulador positivo, *katF*, de los genes para la resistencia al  $H_2O_2$  *katE* y *xthA*, que codifican la catalasa HPII y la exonucleasa III, respectivamente. De manera paralela, se identificó el locus *appR*, cuya mutación impide la síntesis de la fosfatasa ácida codificada por *appA*.

Con base en la comparación de la estructura primaria de KatF y de los productos de *rpoD* ( $\sigma^{70}$ ) y *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) se postuló que *katF* podría codificar un factor  $\sigma$  secundario (Mulvey & Loewen, 1989). En una búsqueda de fusiones *lacZ* inducibles por el ayuno de fuentes de carbono se identificó el alelo *csi2* (Lange & Hengge-Aronis, 1991a). Las mutantes *csi2* exhiben un fenotipo pleiotrópico extremo, que consiste en la incapacidad para sintetizar glucógeno y fosfatasa ácida, y en la hipersensibilidad al  $H_2O_2$  y a temperaturas elevadas. Habiendo establecido que *csi2*, *katF*, y *appR* son alelos de un mismo gen, Lange y Hengge-Aronis (1991a) sugirieron la denominación *rpoS* y  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ ) para este gen y su producto codificado, respectivamente. El superíndice 'S' especifica 'starvation' o 'stationary phase'.

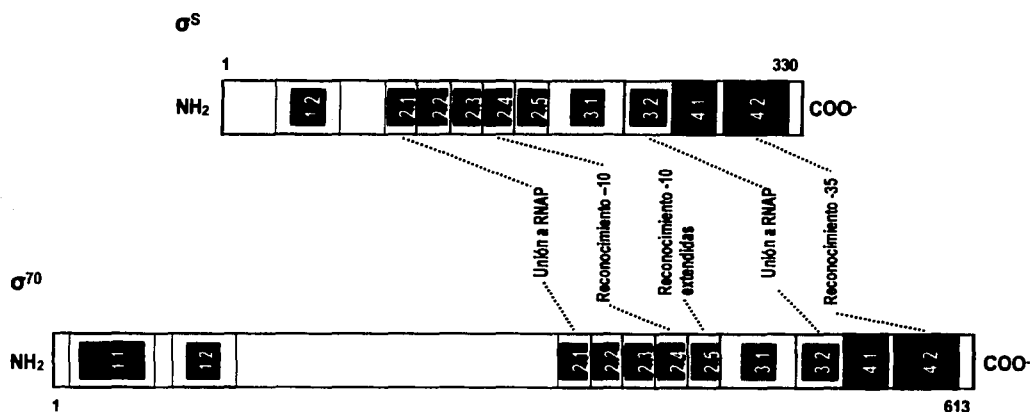
### Caracterización de *rpoS* y $\sigma^S$

*rpoS* se sitúa en el minuto 58.9 del mapa genético de *E. coli*, donde forma parte de un operón junto con *nlpD*, el gen estructural de una lipoproteína para la formación de la pared celular. Su dirección de transcripción es opuesta al sentido de las manecillas del reloj, y en su región 3' se encuentra una secuencia de terminación rho-independiente. La transcripción de *rpoS* es muy baja en la fase exponencial, y se genera a partir de dos promotores situados corriente arriba de *nlpD*, *nlpD* p1 y p2 (Mulvey & Loewen, 1989; Lange & Hengge-Aronis, 1994a; Takayanagi, 1994; Lange *et al.*, 1995). El uso combinado de fusiones transcripcionales *rpoS::lacZ* y de 'primer extension' indica que la inducción de *rpoS* durante la fase estacionaria depende de otro promotor, *rpoS* p1, que se encuentra a 550 pb corriente arriba de *rpoS*, dentro de *nlpD* (Takayanagi, 1994; Lange *et al.*, 1995). Este promotor muestra las se-

cuencias TATTCT y TTGCGT, separadas entre sí por 17 pb, en las posiciones -10 y -35, respectivamente. Estas secuencias corresponden relativamente bien a los consensos -10 TATAAT y -35 TTGACA de los promotores dependientes de  $E\sigma^{70}$ . Asimismo, dos sitios de unión cAMP-CRP putativos flanquean este promotor en las posiciones -62.5 y +55.5 (Takayanagi, 1994; Lange *et al.*, 1995).

$\sigma^S$  es una proteína de 330 aa y ~37.9 kDa con un alto grado de similitud con  $\sigma^{70}$  (Fig. 6) (Colland *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1993; Lonetto *et al.*, 1992).  $\sigma^{70}$  contiene 4 regiones conservadas divididas en un número de sub-regiones. Las sub-regiones 2.1 y 2.2 se implican en la unión de  $\sigma^{70}$  a la RNAP. Las sub-regiones 2.3 y 2.4 constituyen la caja RpoD, y son necesarias para la desnaturalización del promotor y el reconocimiento del consenso -10, respectivamente. El reconocimiento del consenso -35 depende de la sub-región 4.2 (Lonetto *et al.*, 1992). Las sub-regiones de  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^S$  para el reconocimiento de los promotores exhiben una similitud superior al 70% (Lee & Gralla, 2000). En este rubro también se incluye la sub-región 2.5, que en  $\sigma^{70}$  se asocia al reconocimiento del dominio TG de las secuencias -10 extendidas. El dominio correspondiente en  $\sigma^S$  sólo exhibe algunas posiciones idénticas (Colland *et al.*, 1999), y aparentemente no desempeña la misma función. No obstante, la sub-región 2.5 de  $\sigma^S$  posee un carácter crítico, *i.e.*, alberga el sitio susceptible a la proteólisis mediada por ClpXP (Muffler *et al.*, 1996).

Por otra parte,  $\sigma^S$  posee una región 1 más pequeña, y carece de la región conservada de 245 residuos situado entre las sub-regiones 1.2 (que interviene en la formación del complejo abierto) y 2.1 de  $\sigma^{70}$  (Colland *et al.*, 1999). Aparentemente, ambas regiones enmascaran una capacidad de unión a



**Figura 6. Comparación de la organización modular de  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^S$ .** Se señalan las regiones relevantes para la interacción de los factores  $\sigma$  con la RNAP y las determinantes promotoras (modificada de Colland *et al.*, 1999).

DNA libre situada en las sub-regiones de reconocimiento de las determinantes promotoras de  $\sigma^{70}$  (Dombroski *et al.*, 1992).

Por ser indispensable para el crecimiento exponencial,  $\sigma^{70}$  es considerado el factor  $\sigma$  primario -o vegetativo- de *E. coli*. Los factores  $\sigma$  alternativos intervienen en la transcripción de genes de respuesta al estrés específicos. Excepto por  $\sigma^{54}$ , todos los factores  $\sigma$  alternativos de *E. coli* exhiben estructuras primarias y organizaciones modulares similares a las de  $\sigma^{70}$ . Sin embargo, éstos difieren significativamente respecto a los 3 segmentos más conservados entre los factores  $\sigma$  primarios de diversas especies: (i) la caja RpoD; (ii) un segmento de 20 aa en la subregión 4.2 y; (iii) un segmento de 14 aa situado corriente abajo de la caja RpoD.

La estructura y el carácter de las respuestas mediadas por  $\sigma^S$  sugieren que esta proteína es un segundo factor  $\sigma$  primario, y no de tipo alternativo (Hengge-Aronis, 2000). Primero,  $\sigma^S$  alberga los tres dominios altamente conservados de  $\sigma^{70}$ , y es el factor  $\sigma$  no esencial para el crecimiento exponencial que guarda mayor similitud con éste. Segundo, un número de genes dependientes de  $E\sigma^{70}$  pueden ser transcritos por  $E\sigma^S$ , y *viceversa*. Tercero, aunque  $\sigma^S$  no es esencial para el crecimiento, lo es para la supervivencia bajo condiciones de estrés, es decir, las condiciones prevalecientes en los nichos de *E. coli* (Hengge-Aronis, 1996).

### **Genes regulados por $\sigma^S$**

$\sigma^S$  influye en la expresión de más de 90 genes (Tabla 1). Muchos de éstos son relevantes para la resistencia durante la limitación nutricional, mientras que otros sirven en la prevención y la reparación del daño causado por diferentes condiciones adversas. En esta lista se encuentran genes para la división celular y la síntesis de compuestos de reserva, y para la protección osmótica y la disociación de formas reactivas de  $O_2$ . También se incluyen genes asociados a las rutas metabólicas centrales, y genes implicados en la colonización y patogénesis bacteriana. Asimismo, algunos genes dependientes de  $\sigma^S$  codifican reguladores, como BolA, que controla la expresión de la proteína de unión a la penicilina PBP6, una carboxipeptidasa asociada a la síntesis de pared celular en el *septum*.

### **Regulación de la actividad de $E\sigma^S$**

$\sigma^{70}$  se mantiene permanentemente en el intervalo de 700 moléculas por célula;  $\sigma^S$  alcanza un nivel de ~230 moléculas durante la fase estacionaria (Jishage & Ishihama, 1995). La afinidad de  $\sigma^S$  por la RNAP es la más baja de todos los factores  $\sigma$  *in vitro* (Kusano *et al.*, 1996; Ishihama, 2000), y el nivel de saturación de  $E\sigma^S$  requerido para alcanzar un nivel máximo de transcripción es superior al de  $E\sigma^{70}$  (Kusano *et al.*, 1996). Evidentemente, la constante de afinidad y la concentración de  $\sigma^S$  no explican ni

Gen	Función	Referencia
<b>Morfología y división</b>		
<i>bolA</i>	Control de la síntesis de PBP6	Lange & Hengge-Aronis, 1991
<i>osmB, C, E</i>	Lipoproteínas de membrana externa	Bordes <i>et al.</i> , 2000
<i>osmY</i>	Proteína periplásmica	Kusano <i>et al.</i> , 1996
<i>csgBA</i>	Formación de curli	Hengge-Aronis, 2000
<i>csgCDEF</i>	Formación de curli	Hengge-Aronis, 2000
<i>fic</i>	Control de la división celular	Hiratsu <i>et al.</i> , 1995
<i>ftsQAZ</i>	Formación del <i>septum</i>	Rothfield & Garcia-Lara, 1996
<b>Energía y metabolismo</b>		
<i>aldB</i>	Aldehído deshidrogenasa	Loewen <i>et al.</i> , 1998
<i>cbdAB</i>	Citocromo <i>bd</i> oxidasa	Ishihama, 2000
<i>sdhA</i>	Subunidad de la succinato deshidrogenasa	Ishihama, 2000
<i>ihfN</i>	Acetohidroxiácido sintasa	Hengge-Aronis, 1996
<i>acs</i>	Acetil-CoA sintetasa	Ishihama, 2000
<i>frd</i>	Fumarato reductasa	Loewen <i>et al.</i> , 1998
<b>Replicación, reparación y configuración del DNA</b>		
<i>cbpA</i>	Chaperona molecular	Yamashino <i>et al.</i> , 1994
<i>aidB</i>	Reparación de lesiones por metilación del DNA	Landini & Busby, 1999
<i>alkA</i>	Reparación de lesiones del DNA	Landini & Busby, 1999
<i>mutS, H</i>	Reparación de DNA	Tsui <i>et al.</i> , 1997
<i>dps</i>	Proteína de unión a DNA	Almirón <i>et al.</i> , 1992
<i>topA</i>	Topoisomerasa I	Qi <i>et al.</i> , 1997
<i>dnaN</i>	Subunidad $\beta$ de la DNA polimerasa III	Ishihama, 2000
<i>xthA</i>	Exonucleasa III	Loewen & Hengge-Aronis, 1994
<b>Producción de compuestos de almacenamiento</b>		
<i>glgCAF</i>	Síntesis de glucógeno	Loewen & Hengge-Aronis, 1994
<i>glgS</i>	Síntesis de glucógeno	Loewen & Hengge-Aronis, 1994
<i>otsA (pexA)</i>	Trehalosa-6-fosfato sintasa	Hengge-Aronis <i>et al.</i> , 1991
<i>otsB (pexB)</i>	Trehalosa-6-fosfato fosfatasa	Hengge-Aronis <i>et al.</i> , 1991
<b>Resistencia al estrés</b>		
<i>treA</i>	Trehalasa periplásmica	Lange & Hengge-Aronis, 1991
<i>treF</i>	Trehalasa citoplásmica	Hengge-Aronis, 2000
<i>usp</i>	"Universal stress protein"	Farewell <i>et al.</i> , 1998
<i>sodC</i>	Superóxido dismutasa periplásmica	Hengge-Aronis, 2000
<i>katE</i>	Catalasa HPII	Hengge-Aronis, 2000
<i>katG</i>	Catalasa HPI	Hengge-Aronis, 2000
<b>Genes de patogenicidad</b>		
<i>esp</i>	Adhesión tisular	Hengge-Aronis, 2000
<i>csgBA</i>	Formación de curli	Hengge-Aronis, 2000
<i>csgCDEF</i>	Formación de curli	Hengge-Aronis, 2000
<i>fimA, B</i>	Formación de <i>fimbriae</i>	Dove <i>et al.</i> , 1997

Tabla 1. Lista parcial de genes influidos por  $\sigma^S$ .

su capacidad de competencia contra  $\sigma^{70}$  en la asociación a la RNAP, ni la expresión global diferencial observada durante la fase estacionaria. Las variaciones en las secuencias promotoras consenso, así como la presencia de reguladores proteicos (e.g., proteínas de unión a DNA) y no-proteicos (e.g., topología del DNA, trehalosa y (p)ppGpp) contribuyen de manera crucial en el reconocimiento preferencial de un promotor por  $E\sigma^S$  (Fig. 7).

Aunque se han identificado más de 90 genes dependientes de  $\sigma^S$ , no existe una secuencia consenso a partir de la cual sea predecible la dependencia hacia este factor  $\sigma$ . Muchos de estos promotores también son reconocidos por  $E\sigma^{70}$  *in vitro*, de la misma manera que promotores dependientes de  $\sigma^{70}$

son transcritos por  $E\sigma^S$ . Por ejemplo, el promotor *fic* depende de  $E\sigma^S$  *in vivo* (Utsumi *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993), pero  $E\sigma^{70}$  es capaz de reconocerlo *in vitro* (Ding *et al.*, 1995). Asimismo, *lacUV5* y *trp*, dos genes regulados por  $E\sigma^{70}$ , pueden ser reconocidos por  $E\sigma^S$  (Tanaka *et al.*, 1993).

A partir del alineamiento de diversos promotores se propuso la secuencia CTAG/rACT, comprendida entre las posiciones -13 y -7, como un consenso putativo en la región -10 de los genes dependientes de  $\sigma^S$  (Loewen *et al.*, 1998; Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Lee & Gralla, 2001; Becker & Hengge-Aronis, 2001). Esta secuencia exhibe como posiciones más conservadas a -13C, -12T, -11A, y -7T (Lee & Gralla, 2001; Hengge-Aronis, 2001). Curiosamente, las últimas tres posiciones también son las más conservadas en los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ . La importancia de la identidad de estas posiciones en la actividad de  $E\sigma^S$  se ha explorado mediante mutagénesis dirigida (Lee & Gralla, 2001; Becker & Hengge-Aronis, 2001). La sustitución de -12T y -11A eliminan por completo la unión de  $E\sigma^S$  al promotor. La identidad de -13C es crucial para evitar el reconocimiento por parte de  $E\sigma^{70}$ , aunque su sustitución no afecta la afinidad de  $E\sigma^S$ . De manera similar, la remoción de -7T elimina la unión de  $E\sigma^{70}$ , pero disminuye poco la afinidad de  $E\sigma^S$  por el promotor. Sin embargo, si se substituyen simultáneamente estas dos posiciones, la identidad de -13C sí desempeña un papel positivo en la interacción de  $E\sigma^S$  con el promotor (Lee & Gralla, 2001; Becker & Hengge-Aronis, 2001).

Diversos estudios *in vitro* sugieren que  $E\sigma^S$  y  $E\sigma^{70}$  pueden reconocer secuencias promotoras similares (Tanaka, 1995; Tanaka, 1993). Esto coincide con la fuerte similitud existente entre los dominios 2.4 y 4.2 de ambos factores  $\sigma$ . No obstante, mientras la determinante -10 influye en el reconocimiento de promotores por  $E\sigma^S$ , posiblemente no se requiere una secuencia específica en la región -35. Incluso la transcripción del promotor *fic* no se altera cuando es dirigida por una forma de  $\sigma^S$  que carece de la sub-región 4.2 (Hiratsu *et al.*, 1995). La ausencia de un elemento -35 en los promotores dependientes de  $E\sigma^S$  podría determinar la selectividad de esta holoenzima al interferir con el reconocimiento por  $E\sigma^{70}$ . Por otro lado, Wise *et al.* (1996) observaron una distribución relativamente conservada de la secuencia CCG en la región -35 de los promotores dependientes de  $\sigma^S$ . La sustitución de estos nucleótidos en el promotor de *osmY* reduce la transcripción por  $E\sigma^S$ , pero estimula la transcripción por  $E\sigma^{70}$ . Asimismo, la introducción de esta secuencia en *proU* hace a este gen insensible a  $\sigma^{70}$ , pero inducible por  $E\sigma^S$  y dependiente de la fase de crecimiento.

Factores adicionales a las secuencias promotoras influyen en el uso diferencial de promotores por  $E\sigma^S$ . Por lo menos dos aspectos de la topología del DNA intervienen en este sentido. Primero, la transcripción *in vitro* de los promotores *lacUV5* y *osmY* por  $E\sigma^S$  es más eficiente en templados con bajo nivel de superenrollamiento (Kusano *et al.*, 1996). De forma muy general, esta observación coincide con la noción de que el nivel de superenrollamiento del DNA disminuye en condiciones de estrés nutricional. Segundo, diversos genes dependientes de  $\sigma^S$  exhiben regiones de curvatura intrínseca corriente arriba de sus promotores (Espinosa-Urgel & Tormo, 1993; Espinosa-Urgel *et al.*, 1996). Existe



evidencia de que los dominios que inducen el doblamiento del DNA (*i.e.*, segmentos de múltiples adeninas) pueden interactuar con la RNAP. Estos segmentos estimulan fuertemente la transcripción cuando se sitúan corriente arriba de la región -35 de genes reconocidos por  $E\sigma^{70}$  *in vivo* e *in vitro* (Aiyar *et al.*, 1998). Apparently, existe una relación entre la actividad de H-NS y el reconocimiento diferencial por la RNAP asociada a  $\sigma^{70}$  ó  $\sigma^S$ . Sólo en una cepa *hns* la transcripción de *csgBA*, que codifica la principal subunidad de la curlina, puede ocurrir a través de  $E\sigma^{70}$  (Amqvist, 1994). H-NS muestra especificidad por el DNA con curvatura en condiciones de sub-saturación, por lo que es posible que mantenga a los promotores en una configuración que impida a  $E\sigma^{70}$  su reconocimiento.

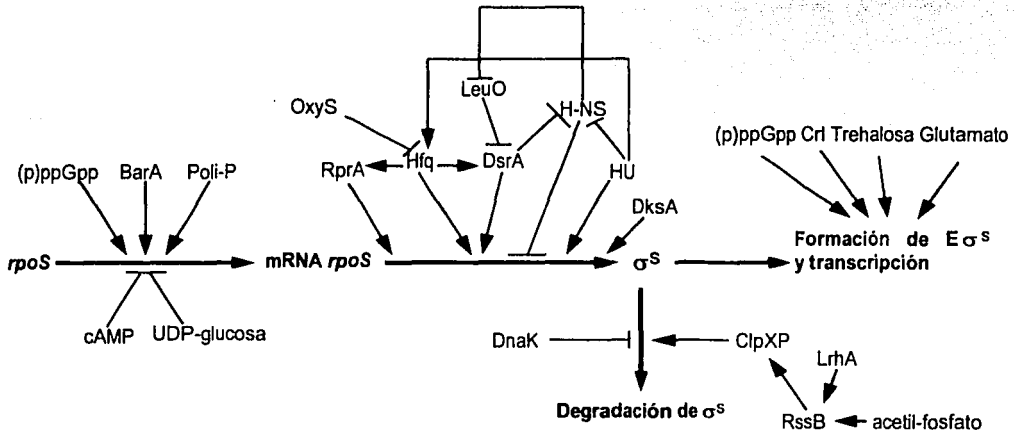
Otras proteínas intervienen en el control de la actividad de  $E\sigma^S$ . Durante la fase exponencial, la expresión de *dps* en respuesta al estrés oxidativo es estimulada por OxyR, y depende de  $E\sigma^{70}$ . Sin embargo, su inducción durante la fase estacionaria depende de  $E\sigma^S$ , y es facilitada por IHF (Altuvia *et al.*, 1994). La expresión de *osmY* es activada por  $E\sigma^S$ , pero es reprimida por Lrp, cAMP-CRP, e IHF (Lange *et al.*, 1993). La competencia entre  $\sigma^S$  y  $\sigma^{70}$  por la RNAP también podría afectarse por Rsd, una proteína de unión a  $\sigma^{70}$  que impide en diferentes grados la transcripción *in vitro* de diversos promotores (Jishage & Ishihama, 1998). Asimismo, Pratt y Silhavy (1998) implicaron a *crl* (un modulador de la transcripción de *csgBA*) como un regulador positivo de  $E\sigma^S$  que posiblemente se une a  $\sigma^S$  o a  $E\sigma^S$ , ó que estimula la asociación de  $\sigma^S$  a la RNAP.

El incremento de diversos factores en respuesta a condiciones de estrés, incluyendo moléculas osmoprotectoras (glutamato de potasio y trehalosa), el poli-P, y el (p)ppGpp favorecen la transcripción *via*  $E\sigma^S$ . La transcripción *in vitro* de los genes *osmB* y *osmY* mediante  $E\sigma^S$  se estimula con concentraciones de glutamato de potasio que simulan las condiciones iónicas intracelulares durante el estrés osmótico,  $\geq 0.3$  M. La transcripción de estos genes por  $E\sigma^{70}$  es eficiente en condiciones normales, pero esta concentración de glutamato ejerce un efecto inhibitorio sobre  $E\sigma^{70}$  (Ding *et al.*, 1995). El nivel de transcripción de *osmY*, *lavUV5* y *fic* mediante  $E\sigma^S$  y  $E\sigma^{70}$  se incrementa junto con la concentración de trehalosa. Mientras la concentración de trehalosa óptima para  $E\sigma^S$  se encuentra en el intervalo de 0.7-1.2 M, para  $E\sigma^{70}$  es 0.7 M (Kusano & Ishihama, 1997a).

El poli-P inhibe la transcripción *in vitro* por ambas holoenzimas,  $E\sigma^S$  y  $E\sigma^{70}$ . El efecto inhibitorio sobre  $E\sigma^S$  cesa por el incremento del nivel intracelular de glutamato de potasio; el poli-P posiblemente desempeña un papel en la expresión dependiente de  $\sigma^S$  en condiciones hiperosmóticas (Kusano & Ishihama, 1997b). Recientemente se ha propuesto que el (p)ppGpp regula la competencia entre factores  $\sigma$  para asociarse a la RNAP (Jishage *et al.*, 2002). Esta noción se fundamenta en las siguientes observaciones: (i) los factores  $\sigma^S$  y  $\sigma^{32}$  compiten mejor contra  $\sigma^{70}$  en presencia de (p)ppGpp; (ii) la fracción de  $\sigma^S$  y  $\sigma^{32}$  asociada a la RNAP disminuye en una cepa *relA spoT* y; (iii) la necesidad de estos factores  $\sigma$  por el (p)ppGpp se elimina en presencia de formas mutantes de  $\sigma^{70}$  con una afinidad disminuida por la RNAP.

## Regulación de la expresión de $\sigma^S$

La expresión de  $\sigma^S$  está sujeta a un intrincado mecanismo de regulación que opera en los niveles transcripcional, traduccional, y de estabilidad proteica (Figura 7) (Lange & Hengge-Aronis, 1994b). Numerosas moléculas se han involucrado en la regulación de  $\sigma^S$ , y no es excepcional que alguna de éstas intervenga, directa o indirectamente, en más de una forma. La significación de la ocurrencia simultánea de tres niveles de regulación respecto a un único parámetro, la concentración de  $\sigma^S$ , se relaciona con el carácter general de la respuesta fisiológica dependiente de este factor  $\sigma$ . La primera observación en este sentido es que los diferentes tipos de estrés inciden en distinta proporción sobre



**Figura 7. Regulación del nivel y actividad de  $\sigma^S$ .** Se presenta un modelo de regulación de la expresión de *rpoS* en los niveles transcripcional y post-transcripcional. También se incluyen el control de la estabilidad de  $\sigma^S$  y la participación de factores que promueven su asociación a la RNAP y la transcripción dependiente de este factor  $\sigma$ .  $\blacktriangleright$ , regulación positiva;  $\blacktriangleleft$ , regulación negativa (Modificada de Hengge-Aronis, 2000).

cada nivel de regulación. Lo anterior sugiere que los factores exógenos que disparan la expresión de  $\sigma^S$  actúan sobre varias rutas de señalización, y que no hay una molécula señal común a todos los tipos de estrés (Hengge-Aronis, 2000). La traducción del *mRNA rpoS* y la estabilidad de  $\sigma^S$  aumentan en condiciones hiperosmóticas, aunque la actividad transcripcional de *rpoS* no se modifica (Hengge-Aronis *et al.*, 1993). De manera similar, el ingreso a la fase estacionaria por el agotamiento nutricional estimula la transcripción y la traducción de *rpoS* (Lange & Hengge-Aronis, 1994b). Aparentemente, cuando el carácter del estrés permite una adecuación paulatina, la regulación de  $\sigma^S$  en los niveles transcripcional y traduccional se acentúa. Por el contrario, cuando el estrés es potencialmente letal y requiere una respuesta rápida, la disminución de la proteólisis de  $\sigma^S$  es el control preponderante.

### Control a nivel transcripcional

La actividad de *rpoS* se induce durante la fase exponencial tardía y en la transición hacia la fase estacionaria (McCann *et al.*, 1991; Lange & Hengge-Aronis, 1991; Loewen *et al.*, 1998; Lange & Hengge-Aronis, 1994b). Esto sugiere la intervención de mecanismos reguladores positivos en la expresión de este gen *in vivo*. Diversas moléculas se asocian al control transcripcional de *rpoS*, pero no existe un modelo satisfactorio que explique la inducción de este gen en el inicio de la fase estacionaria. Al menos una señal intracelular debe funcionar en este sentido, y moléculas como el (p)ppGpp y el poli-P, o el complejo cAMP-CRP y BarA, son candidatos importantes.

El (p)ppGpp es el efector del control estricto. El control estricto es un ajuste fisiológico en respuesta a la limitación de aminoácidos y de fuentes de carbono y de energía, y consiste en la disminución de la síntesis de RNA estable (rRNA y tRNA) y en el control del inicio de la transcripción de diversos genes. El metabolismo del (p)ppGpp depende de RelA, una (p)ppGpp sintetasa asociada constitutivamente a los ribosomas, y de SpoT, una enzima citoplásmica que sintetiza y degrada (p)ppGpp (Chatterji & Ohja, 2001; Cashel *et al.*, 1996; Hernández & Bremer, 1991). El nivel de  $\sigma^S$  no se incrementa en la transición a la fase estacionaria en una cepa  $\Delta relA \Delta spoT$ . Asimismo, la sobreproducción de (p)ppGpp en ausencia de estrés nutricional conduce a la acumulación de  $\sigma^S$  (Gentry *et al.* 1993). Aparentemente, el (p)ppGpp estimula la transcripción de *rpoS*, pero no a nivel de iniciación. La mutación  $\Delta relA \Delta spoT$  no influye diferencialmente la iniciación transcripcional a partir de los promotores situados corriente arriba de *rpoS* (Lange *et al.*, 1995). El efecto del (p)ppGpp podría operar a nivel de elongación ó de estabilidad del mRNA *rpoS* (Lange *et al.*, 1995; Hengge-Aronis, 2000). Paradójicamente, el bajo nivel de  $\sigma^S$  en una cepa  $\Delta relA \Delta spoT$  no se relaciona con un bajo nivel de mRNA *rpoS*. Por el contrario, el nivel del transcrito aumenta como resultado del incremento de su vida media (Zgurskaya *et al.*, 1997).

Las células incapaces de sintetizar poli-fosfato (poli-P) son hiper-sensibles al estrés por calor. La sobre-expresión de *rpoS* en estas células compensa este efecto, por lo que se propuso que el poli-P estimula la expresión de  $\sigma^S$ . La actividad de las fusiones transcripcionales *rpoS::lacZ* disminuye cuando se sobre-produce la exopolifosfatasa de levadura PPX1 (Shiba *et al.*, 1997); desafortunadamente, no hay evidencia de que el poli-P estimule la transcripción de *rpoS in vitro*.

BarA es un sensor-cinasa de la familia de activadores transcripcionales de dos componentes, y se ha encontrado que el nivel de mRNA *rpoS* disminuye substancialmente en la fase exponencial temprana en una mutante *barA*. Una evidencia adicional de que esta proteína desempeña un papel en la expresión de *rpoS* es que la propia inducción de *barA* antecede a la de aquél en la fase exponencial tardía (Mukhopadhyay *et al.*, 2000).

Aparentemente, el complejo cAMP-CRP ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *rpoS* (Loewen *et al.*, 1998; Hengge-Aronis, 1996). En la fase exponencial, la transcripción de *rpoS* y los

niveles de  $\sigma^S$  se incrementan fuertemente en las cepas *cya* y *crp*, pero disminuyen inmediatamente si se adiciona cAMP (Lange & Hengge-Aronis 1991; Lange y Hengge-Aronis, 1994b). Existe un reporte en el que se observó la disminución en la transcripción de *rpoS* en una cepa *cya* (McCann *et al.*, 1993), pero esta contradicción permanece sin explicación.

Otros factores involucrados en el control de la expresión de *rpoS* son la UDP-glucosa y la homoserín lactona. La UDP-glucosa es necesaria para la producción de trehalosa y de algunas componentes de la envoltura celular, y aparentemente ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *rpoS* (Böhringer *et al.*, 1995). Huisman y Kolter (1994) propusieron que una acil-homoserín lactona (AHL) dispara la expresión de *rpoS* en condiciones de estrés nutricional. Las AHLs fungen como señales extracelulares en el control dependiente de la densidad celular de diversos procesos en bacterias Gram-negativas, como la bioluminiscencia de *Vibrio harveyi* (Bassler, 1999; Fuqua & Greenberg, 1998). Aunque existe controversia respecto a los resultados reportados para *E. coli* (aparentemente *E. coli* no sintetiza AHLs), en *Pseudomonas aeruginosa* si se requiere una AHL para la expresión de *rpoS* (Latifi *et al.*, 1996).

### Control a nivel traduccional

La transición hacia la fase estacionaria, así como otros tipos de estrés (térmico y osmótico), estimulan la traducción del mRNA codificado por *rpoS* (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Sledjeski *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1996; Muffer *et al.*, 1997). La región 5' del mRNA *rpoS* exhibe una secuencia en la que se predice la formación de una extensa estructura tallo-asa. Aparentemente, el segmento delimitado por los nucleótidos 160 y 210 impide la unión de los ribosomas al actuar como RNA antisentido en *cis* sobre la región líder. Se ha propuesto que un conjunto de factores condicionan la desestabilización de esta estructura secundaria con el fin de regular su iniciación traduccional (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Brown & Elliot, 1996; Muffler *et al.*, 1996). Entre estos factores se encuentran las proteínas del nucleóide Hfq, H-NS, y HU, así como las moléculas pequeñas de RNA no traducido DsrA, RprA, y OxyS (Fig. 7).

La ausencia de Hfq provoca la disminución en los niveles de  $\sigma^S$  de *S. typhimurium* y *E. coli* (Brown & Elliot, 1996; Muffler *et al.*, 1997). Dado que Hfq interactúa con un número de mRNAs *in vivo*, se ha propuesto que desestabiliza directamente la estructura secundaria del mRNA *rpoS* (Loewen *et al.*, 1998; Brown & Elliot, 1996; Muffler *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Sin embargo, no existen reportes sobre la unión específica Hfq:mRNA *rpoS in vitro*.

OxyS es un RNA no traducido de 109 nt asociado a la regulación de ~40 genes en *E. coli* (Altuvia *et al.*, 1997). OxyS interactúa directamente con Hfq *in vivo*, y aparentemente impide la traducción del mRNA *rpoS* al competir por Hfq (Zhang *et al.*, 1998).

Por otra parte, Yamashino *et al.* (1995) encontraron que el nivel y la estabilidad de  $\sigma^S$  aumentan significativamente en ausencia de *hns*. Posteriormente se estableció que esta proteína participa en la

regulación de *rpoS* en respuesta al estrés osmótico y a la desaceleración del crecimiento (Barth *et al.*, 1995). H-NS podría regular negativamente la transcripción de factores que interactúan directamente con el mRNA *rpoS*, ó unirse a éste (H-NS se une inespecíficamente al RNA, y exhibe propiedades de chaperona de RNA).

DsrA tiene un efecto antagónico sobre la función inhibitoria mediada por H-NS. DsrA es un RNA no traducido de 85 nt, con una estructura secundaria putativa consistente en tres tallos-asa (Sledjeski y Gottesman, 1995; Majdalani, *et al.*, 1998; Lease & Belfort, 2000; Lease *et al.*, 1998). En *E. coli*, DsrA se desempeña como regulador a través de interacciones RNA:RNA en, por lo menos, dos niveles. A nivel post-transcripcional, DsrA estimula la expresión de *rpoS* a través de un mecanismo anti-antisentido (Sledjeski & Gottesman, 1995; Majdalani *et al.*, 1998). A nivel transcripcional, funge como antisilenciador de H-NS, promoviendo la expresión de diversos genes (Sledjeski & Gottesman, 1995). El segmento ocupado por el primer tallo-asa y la base del segundo es complementario a una región de ~20 nt dentro de la secuencia líder del mRNA *rpoS*. El apareamiento entre DsrA y esta región podría eliminar la estructura secundaria del transcrito *rpoS* (Majdalani *et al.*, 1998). Por otra parte, la función de DsrA parece depender de Hfq. Hfq se une específicamente a DsrA *in vitro* y, en ausencia del gen que codifica a esta proteína, DsrA prácticamente pierde su estabilidad (Sledjeski *et al.*, 2001).

HU contribuye al control post-transcripcional positivo de  $\sigma^S$  *in vivo*; reconoce específicamente el mRNA *rpoS*, y la síntesis de  $\sigma^S$  disminuye significativamente en una cepa *hupAB* (Balandina *et al.*, 2001). HU podría desestabilizar la estructura del mRNA *rpoS* para facilitar la unión de los ribosomas o, alternativamente, modular la unión de otras proteínas como Hfq y H-NS (Balandina *et al.*, 2001).

El circuito de control traduccional de *rpoS* es aún más complejo. A partir del monitoreo aleatorio de clonas capaces de estimular la traducción de *rpoS* en ausencia de DsrA se detectó un RNA no transcrito de 106 nt, RprA (RpoS regulator RNA) (Majdalani *et al.*, 2001). Aunque en DsrA y RprA es predecible la formación de estructuras tallo-asa, y la actividad de RprA también se ausenta en una cepa *hfq*, este RNA no parece interactuar con el mRNA *rpoS*. Solamente se han detectado pequeñas regiones de complementariedad con éste, y la mutación de tales segmentos no afectan significativamente su actividad.

*dksA*, descrito originalmente como un gen cuya sobre-expresión suprime la termosensibilidad y la filamentación de una cepa *dnaK*, contribuye en la regulación traduccional positiva del mRNA *rpoS* (Webb *et al.*, 1999). Aparentemente, DksA actúa específicamente en la región situada entre los codones 8 y 73, *i.e.*, a diferencia de lo propuesto en el caso de Hfq, la interacción DksA:mRNA *rpoS* es independiente de la región promotora.

LeuO, un regulador similar a LysR, reduce los niveles de  $\sigma^S$  a bajas temperaturas (Klauck *et al.*, 1997). La sobre-expresión de LeuO tiene el mismo efecto sobre DsrA, pero no afecta la expresión de *rpoS* en un fondo *dsrA*. Es decir, posiblemente LeuO regula a *rpoS* mediante la represión de DsrA. La

expresión de *leuO* es relativamente baja e independiente de la temperatura. Sin embargo, este gen se des-reprime en ausencia de H-NS, lo cual sugiere que H-NS regula la síntesis de su antisilenciador, DsrA (Klauck *et al.*, 1997).

### Control post-traducciona l de los niveles de $\sigma^S$

Durante la fase exponencial, el bajo nivel de  $\sigma^S$  depende de la actividad ClpXP (Schweder *et al.*, 1996), una proteasa ATP-dependiente formada por una componente reguladora (ClpX) y una proteolítica (ClpP) (Gottesman *et al.*, 1993). El sitio crítico para la degradación de  $\sigma^S$  se encuentra entre las posiciones 159 y 188, y el residuo 173lys es esencial para este proceso. Por lo tanto, el sitio susceptible a la proteólisis y la sub-región 2.4 se sobreponen (Zhou *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1999).

La degradación de  $\sigma^S$  requiere el factor de reconocimiento RssB o SprE (Regulator of sigma S; Stationary phase regulator), un miembro de la familia de reguladores de respuesta (Muffler *et al.*, 1996b; Pratt & Silhavy, 1996). RssB promueve específicamente la degradación de  $\sigma^S$  (Pratt & Silhavy, 1996; Zhou & Gottesman, 1998), e interactúa exclusivamente con ClpXP (Zhou *et al.*, 2001). Éste es el primer regulador de respuesta implicado en la regulación a nivel de estabilidad proteica, además de que su dominio C-terminal no guarda similitud alguna con el resto de los miembros de dicha familia (Pratt & Silhavy, 1996; Muffler *et al.*, 1996b).

Existen condiciones en las que la interacción RssB: $\sigma^S$  y el proceso proteolítico se desacoplan. En condiciones donde la tasa proteolítica de  $\sigma^S$  disminuye parcial- o totalmente (e.g., en la fase estacionaria ó en una cepa *clpP*), la sobre-expresión de RssB suprime la actividad de los genes dependientes de  $\sigma^S$ , aun en presencia de elevados niveles de  $\sigma^S$  (Becker *et al.*, 2000). A partir de esta observación, Becker *et al.* (2000) propusieron que RssB puede actuar como factor anti- $\sigma$  bajo condiciones de crecimiento en las que *rssB* es fuertemente inducido.

Otra proteína involucrada en el control de la proteólisis de  $\sigma^S$  es DnaK. El nivel y vida media de  $\sigma^S$  se reducen en una cepa *dnaK* durante la fase estacionaria (Rockabrand *et al.*, 1998; Muffler *et al.*, 1997b). DnaK promueve la estabilidad de  $\sigma^S$ ; sin embargo, se desconoce si esta chaperona interactúa con este factor  $\sigma$  *in vivo* como hace con  $\sigma^H$ , en cuyo caso aumenta su inestabilidad. Alternativamente, DnaK podría afectar la actividad de RssB ó de ClpXP. Por el contrario, LrhA (LysR-like transcriptional regulator) promueve la degradación de  $\sigma^S$  mediante la estimulación de RssB en la fase exponencial (Gibson *et al.*, 1999).

Aparentemente, el acetil fosfato también participa en la regulación de la interacción RssB: $\sigma^S$ . *In vitro*, el acetil fosfato puede actuar como donador en la fosforilación de diversos sensores cinasa, como la proteína reguladora del regulón Ntr (Nyström, 1995). La tasa de degradación de  $\sigma^S$  disminuye en una cepa incapaz de sintetizar acetil fosfato, y RssB interactúa con  $\sigma^S$  *in vitro* en forma dependiente de la fosforilación del residuo Asp58 de su dominio receptor N-terminal (Bouché *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1999).



### **Objetivo general**

Estudiar el papel de *rpoS* en los cambios de superenrollamiento del DNA durante la fase estacionaria y en el periodo de recuperación del crecimiento de *Escherichia coli*.

### **Objetivos particulares**

Determinar el efecto de la mutación de los genes *rpoS* y *relA* en la cinética de superenrollamiento del DNA durante la fase estacionaria y en el periodo de recuperación del crecimiento.

Determinar el efecto de la mutación de *rpoS* en la expresión de la Girasa a lo largo del crecimiento.





## Materiales y Métodos

### 1. Cepas bacterianas y plásmido

La cepa MC4100 F- *araD139*  $\Delta$ (*argF-lac*)205 *rpsL150 thiA1 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR* (Lac- Ara- Sm<sup>R</sup> Thi) se utilizó en la mayoría de los experimentos (Casadaban, 1976). También se emplearon las cepas MX614 *ile-680* (Bastarrachea *et al.*, 1980), CF148 (protótrofa), CF1652 (CF1648  $\Delta$ *relA251::kan*) (Xiao *et al.*, 1991), y las cepas con fusiones transcripcionales en el cromosoma MC4100  $\lambda\Phi$ (*gyrA-lacZ*), y MC4100  $\lambda\Phi$ (*gyrB-lacZ*) (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Las cepas MC4100 *rpoS::Tn10*, MX614 *rpoS::Tn10*, CF1648 *rpoS::Tn10*, CF1652 *rpoS::Tn10*, MC4100 *rpoS::Tn10*  $\lambda\Phi$ (*gyrA-lacZ*), y MC4100 *rpoS::Tn10*  $\lambda\Phi$ (*gyrB-lacZ*) se obtuvieron mediante transducción generalizada con el bacteriófago P1 *vir* [*rpoS::Tn10* (Tc<sup>R</sup>)] (Lange & Hengge-Aronis, 1991a). El bacteriófago P1 *vir* fue donado por el Dr. Jorge Membrillo Hernández (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Para el monitoreo del superenrollamiento del DNA se empleó el plásmido pMS01 (Ap<sup>R</sup>), un derivado de pBR322 en el que se eliminó el gen de resistencia a la tetraciclina (León *et al.*, 1988).

### 2. Medios y condiciones de crecimiento

Los medios ricos LB (Luria-Bertani) y LB-MOPS se usaron en casi todos los experimentos. El medio mínimo M9 se utilizó únicamente para conocer la viabilidad de una mutante *rpoS* durante períodos prolongados de fase estacionaria. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de crecimiento estándar, a 37 °C y con agitación constante de 180 rpm.

Los cultivos experimentales se iniciaron de la siguiente forma. En un tubo con 3 mL de medio LB se inocularon 50  $\mu$ L de un cultivo en glicerol al 20%. (Los cultivos en glicerol o de almacenamiento se conservan a -70 °C y contienen  $\sim 10^8$  células mL<sup>-1</sup>). El tubo se incubó en condiciones estándar durante toda una noche. Para iniciar el experimento, 200  $\mu$ L de cultivo de una noche se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 10 mL de medio LB o LB-MOPS.

Con el fin de asegurar la presencia homogénea del plásmido en la población celular, se adicionó Carbecín, un antibiótico tipo ampicilina, a una concentración de 300  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

El crecimiento celular se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm (DO<sub>550</sub>). Para cosechar células en la fase exponencial los cultivos se incubaron hasta una DO<sub>550</sub>  $\approx$  0.4. La fase estacionaria comienza en una D.O.<sub>550</sub>  $\sim$  1.5, cuando el cultivo se ha incubado alrededor de 6 h.

Para inducir la recuperación del crecimiento, se transfirió  $\sim$ 1 mL de cultivo en fase estacionaria a un

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

Triptona (Difco) 10 g L<sup>-1</sup>  
Extracto de levadura (Difco) 5 g L<sup>-1</sup>

**Medio M9 (Sambrook *et al.*, 1989)**

NH<sub>4</sub>Cl 1 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g  
NaCl 0.5 g

NaCl (Baker) 10 g L<sup>-1</sup>  
Timina (Sigma) 20 µg mL<sup>-1</sup>  
El pH se ajusta a 7.0 con 1 mL de disolución de NaOH (Baker) 2.5 N por litro de cultivo.  
El medio LB sólido se prepara de la misma manera, pero se agrega 2 % de Bacto-Agar (Difco).  
En los experimentos que se requirió, se agregó amortiguador MOPS (Sigma) al medio LB, a una concentración final de 40 mM.

Agar 20 g  
MgSO<sub>4</sub> 1 mL de una disolución al 25 %  
Glucosa 0.1 %  
Timina 20 µg mL<sup>-1</sup>  
Aminoácidos 20 µg mL<sup>-1</sup>  
Vitamina B1 0.16 mL de una disolución 0.1 %  
Aforar con H<sub>2</sub>O desionizada a 1L

### 3. Construcción de cepas *rpoS::Tn10 (Tc<sup>R</sup>)* por transducción generalizada mediada por el bacteriófago P1 *vir*

Se inocularon 200 µl de un cultivo de una noche de la cepa a transducir en 10 mL de medio LB. Este cultivo se incubó hasta la fase exponencial, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, y se resuspendió en un volumen de 1 mL de triptona 1%. 500 µL de esta suspensión (~10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>) se disolvieron en el mismo volumen de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0.015 M y MgSO<sub>4</sub> 0.030 M, y se incubaron a 37 °C durante 2 min.

Paralelamente, se diluyó el bacteriófago P1 *vir* en medio LB, hasta una concentración de ~5 x 10<sup>7</sup> ufp mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de placa); esta disolución se incubó a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla de transducción se preparó con 500 µl de las suspensiones MC4100-Ca-Mg y P1-LB, y se incubó a 37 °C por 2 min. Centrifugación a 10,000 rpm durante 1 min y resuspensión en 1.5 mL de medio de disolución (MgSO<sub>4</sub> 10 mM). Esta última mezcla se distribuyó en volúmenes de 100 µl en cajas de medio LB con tetraciclina (25 µg mL<sup>-1</sup>). Se emplearon como controles cajas sembradas únicamente con la cepa silvestre ó la suspensión P1-LB transductante. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h.

Se seleccionaron 4 colonias de posibles transductantes *rpoS::Tn10 (Tc<sup>R</sup>)* y se comparó su fenotipo con el de las cepas silvestres. Finalmente, se seleccionaron dos colonias para iniciar nuevos cultivos. Las colonias se inocularon en 3 mL de LB y se incubaron en condiciones estándar durante 24 h. De estos cultivos se transfirieron 500 µL a tubos de almacenamiento con igual volumen de glicerol al 40 %, tras lo cual los tubos se almacenaron a -70 °C.

### 4. Verificación del fenotipo mutante *rpoS*

Se compararon las capacidades de las células silvestres y *rpoS* para sobrevivir a la incubación a altas temperaturas y por períodos prolongados de fase estacionaria. Para estos experimentos se usó la metodología de Lange y Hengge-Aronis, 1991. Asimismo, se evaluó la respuesta de las cepas a la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Curva de termotolerancia.** Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivos en LB de las cepas MC4100 y MC4100 *rpoS* con 18 h en fase estacionaria (24 h de incubación continua). Las células se cosecharon

por centrifugaron a 10,000 rpm por 3 min, y se diluyeron en NaCl 0.9 % hasta una densidad de  $10^3$  células mL<sup>-1</sup>. Para cada una de las cepas se hicieron 9 muestras de 1 mL, éstas se numeraron para especificar el tiempo (min) que se incubarian a la temperatura subletal de 55 °C. Se mitoreó el porcentaje de supervivencia a intervalos de 1 minuto, durante 9 minutos. Se tomaron 100 µL (por duplicado) en los tiempos marcados para realizar cuentas viables en cajas de Petri con medio LB.

**Curva de viabilidad celular en periodos prolongados de incubación.** Las cepas MC4100 y MC4100 *rpoS* se cultivaron en 10 mL de medio mínimo M9 con 0.1 % de glucosa. Estos cultivos se incubaron en condiciones estándar durante 9 días. Diariamente se tomaron muestras y se diluyeron en NaCl 0.9 % hasta densidades de  $10^3$  y  $10^2$  células mL<sup>-1</sup>. A partir de estas disoluciones se espatularon muestras de 100 µl (por duplicado) en cajas con medio LB y se hicieron cuentas viables.

**Ensayo de tolerancia al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las mutantes *rpoS* se determinó como en Small *et al.*, 1994 . A partir de cultivos de una noche se sembraron cajas de Petri. Posteriormente, se aplicaron por goteo ~5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a colonias aisladas. Las células silvestres producen inmediatamente un intenso burbujeo, pero en las mutantes *rpoS* esto es apreciable solamente después de 10-20 s. Este ensayo se utilizó después de cada experimento como control de la identidad de las cepas empleadas.

## 5. Transformación con el plásmido pMS01 (Ap<sup>R</sup>)

Para introducir el plásmido reportero en las cepas se utilizó el método de preparación de células competentes en un paso descrito por Chung *et al.* (1989). En un tubo Eppendorf se mezclaron volúmenes equivalentes (500 µL) de medio TSS 2X frío y de un cultivo celular en fase exponencial en medio LB. 100 µl de esta mezcla se incubaron en hielo con 10 ng de pMS01 durante 30 min. Posteriormente, el tubo se incubó en un baño a 45 °C durante 5 min, y por otros 5 min en hielo. Después de agregar 900 µl de medio LB se hizo otra incubación a 37 °C durante 1 h. Finalmente, se tomaron 100 µL del contenido y se sembraron por espatulado en una caja de medio LB con ampicilina (200 µg mL<sup>-1</sup>). Incubación a 37 °C durante 24 h. Se seleccionaron 4 colonias con el fin de verificar la transformación. Los plásmidos se purificaron por el método de lisis alcalina para la extracción de DNA (Maniatis *et al.*, 1982), y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 75 voltios. Se conservaron dos colonias para el almacenamiento a -70 °C.

### TSS 2X

NaCl (Baker) 1%

Triptona (Difco) 1%

Extracto de levadura (Difco) 0.5%

Polietilenglicol, PEG, 8,000 (Sigma) 20%

Dimetilsulfóxido, DMSO (Merck) 10%

MgCl<sub>2</sub> (Merck) 50 mM

No se ajusta el pH de la solución; se esteriliza en autoclave y se mantiene a 4 °C

## 6. Determinación del nivel de superenrollamiento del plásmido pMS01

**Extracción del plásmido.** La purificación del plásmido se hizo con una versión modificada del método de lisis alcalina para la extracción de DNA (Maniatis *et al.*, 1982). Se transfirieron 1-1.5 mL de cultivo en fase estacionaria a un tubo con 18 g de hielo triturado preparado con medio LB. En el caso de los cultivos en fase exponencial y de recuperación del crecimiento se transfirió el volumen total de los cultivos.

Las células se cosecharon mediante centrifugación a 11,000 rpm a 4 °C, por 10 min. Tras la eliminación del sobrenadante, las células fueron resuspendidas con 200 µl de disolución I con 15 µL de RNAsa. Las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf, los cuales se incubaron con la tapa abierta en hielo por 10 min. Se agregaron 400 µL de la disolución II; el contenido se mezcló manualmente invirtiéndolo con suavidad. Tras otros 10 min de incubación en hielo, se agregaron 300 µL de la disolución III. Los tubos fueron agitados en posición invertida en el 'vortex' por 10 segundos, se incubaron en hielo por 10 min, y se centrifugaron a 12,000 rpm en frío, por 15 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Eppendorf limpios, y se mezclaron con 650 µL de isopropanol. La mezcla se incubó a -20 °C, por 24 h.

Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min. Se decantó el isopropanol, se limpió el interior de los tubos con una toalla de papel, y se secó la pastilla a 37 °C por 30 min. La pastilla se resuspendió en 11 µL de agua desionizada y 9 µL de colorante guía para DNA.

### Disolución I

Glucosa (Baker) 50 mM  
Dietilén-diamino-tetraacetato EDTA (Sigma) 10 mM  
Tris-HCl 25 mM (pH 8.0)  
Lisozima (Sigma) 5 mg mL<sup>-1</sup>  
RNAsa (Sigma) 10 mg mL<sup>-1</sup>

### Disolución III

Acetato de potasio (Baker) 3 M  
Ácido acético glacial (Baker) 11.6 %  
pH final 5.6

### Disolución II

Dodecil sulfato de sodio SDS (Sigma) 1 %  
NaOH (Baker) 0.2 N

**Corrimiento electroforético.** Los plásmidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad) al 0.7 % con cloroquina (12 µg mL<sup>-1</sup>). Se prepararon 1000 mL de amortiguador TBE 1X con la concentración de cloroquina señalada. Para el gel se usaron 70 mL de amortiguador, el resto se vertió en la cámara de electroforesis. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min, al transferirlas al gel se evitó tomar la porción sedimentada. El corrimiento se efectuó a 22 voltios (~45 mA), durante 22 h. Posteriormente, se eliminó la cloroquina del gel lavándolo constantemente en agua (cuatro remplazamientos a intervalos de 1 h). Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma) 2.5 µg mL<sup>-1</sup>. Los topoisómeros se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta, y se fotografiaron con película Kodak TRI-X-PAN y un filtro rojo No. 4.

**Amortiguador TBE 1X**

Trizma base (Sigma) 90 mM  
Ácido bórico (Baker) 90 mM  
Dietilen-diamino-tetraacetato  
(Sigma) 10 mM

EDTA

**Colorante guía para DNA**

EDTA (Sigma) 1 mM  
Azul de bromofenol (Merck) 0.25 %  
Xilen cianol 0.25 %  
Glicerol (Baker) 30 %

**7. Determinación de la cantidad de las proteínas Gyr con anticuerpos**

**Extracción de proteína total.** Se transfirieron 450  $\mu$ L de un cultivo de 10 mL de la cepa MC4100 en fase estacionaria a un tubo Eppendorf y se añadieron 4  $\mu$ L de inhibidor de proteasas PMSF (10 mM). Para la extracción a partir de cultivos en fase exponencial se concentraron por centrifugación dos volúmenes de 900  $\mu$ L de cultivo y se usó la misma cantidad de PMSF. Se agregó ácido tricloroacético (Merck) hasta una concentración final de 5 %, se incubó el tubo en hielo por 20 min, y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. El contenido del tubo se lavó con una mezcla fría de Tris-Etanol (1:1) y se volvió a centrifugar por 5 min. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se secó al aire y se resuspendió en 40  $\mu$ L de amortiguador de muestras Laemmli. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

**Amortiguador de muestras Laemmli**

Glicerol (Baker) 10 %  
SDS (Sigma) 2.3 %  
Tris-HCl (Sigma) 0.0625 M, pH 6.8  
 $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad) 5 %  
Azul de bromofenol (Merck) 0.001 %

**PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro)**

1.74 mg mL<sup>-1</sup> (10 mM) en isopropanol

**Corrimiento electroforético y transferencia tipo Western.**

Las muestras se hirvieron en un baño durante 2 min antes de su colocación en el gel. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 %, a 150 voltios. La cantidad relativa de proteína de cada muestra se comparó en un gel con tinción de Coomassie. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45  $\mu$ m (Schleicher & Schuell); el corrimiento se efectuó a 100 voltios (~250 mA) durante 1 h. Las proteínas Gyr fueron identificadas en experimentos separados con anticuerpos monoclonales anti-GyrA y anti-GyrB (John Innes Enterprises, Ltd). La membrana de transferencia se incubó en PBS-Tween 20 (0.1%) con 6 % de leche en polvo durante 1.5 h. Se hicieron tres lavados de 10 min con PBS-Tween 20 (0.1 %), tras lo cual la membrana se incubó en presencia del anticuerpo monoclonal disuelto en PBS-Tween 20 (0.1%) con 0.3 % de leche en polvo durante 1.5 h. Los anticuerpos anti-GyrA y anti-GyrB se usaron en una proporción de 1/200 y 1/500, respectivamente. La membrana se lavó con PBS-Tween 20 (0.3 %) 6 veces, cada lavado de 5 min. A continuación, se agregó anticuerpo anti-IgGAM conjugado con peroxidasa de rábano (Zymmed Laboratories, Inc.) para la detección de las proteínas Gyr. Este anticuerpo se disolvió en PBS-Tween 20 (0.1%) en una proporción de 1/1500.

Después de una incubación de 45 min, la membrana se lavó a intervalos de 5 min, dos veces con PBS-Tween 20 (0.1 %) y 4 veces con PBS.

**Gel de poliacrilamida al 7.5 % (72 x 82 mm)**

**Gel separador**

Agua desionizada 2.42 mL  
Disolución A, Acrilamida (30 %) 1.245 mL  
Disolución B (pH 8.8) 1.25 mL  
Disolución C 50  $\mu$ L  
Persulfato de amonio 12.5  $\mu$ L  
N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina,  
TEMED 2.5  $\mu$  L

**Gel condensador**

Agua desionizada 1.52 mL  
Disolución A, Acrilamida (30 %) 0.33 mL  
Disolución D (pH 8.8) 0.625 mL  
Disolución C 25  $\mu$ L  
Persulfato de amonio 12.5  $\mu$ L  
TEMED (Bio-Rad) 2.5  $\mu$ L

**Disolución A**

Acrilamida (Bio-Rad) 29.2 g  
Bis-Acrilamida 0.8 g  
Se afora con H<sub>2</sub>O desionizada a 100 mL

**Disolución B**

Tris-HCl (pH 8.8) 3 M  
Trizma base (Sigma) 36.3 g  
Se afora con H<sub>2</sub>O desionizada a 100 mL

**Disolución C**

SDS (Sigma) 10 %

**Disolución D**

Tris-HCl (Sigma) (pH 6.8) 0.5 M  
Trizma base (Sigma) 6.055 g  
Se afora con H<sub>2</sub>O desionizada a 100 mL

**Amortiguador de corrimiento Laemmli**

Trizma base (Sigma) 0.025 M  
Glicina 0.192 M  
SDS (Sigma) 0.1 %  
pH final 8.4

**Amortiguador de transferencia**

Glicina 192 mM  
Trizma base (Sigma) 25 mM  
Metanol (Merck) 20 % final

**Tinción de Coomassie**

Ácido acético (Baker) 10 %  
Metanol (Merck) 30 %  
Azul brillante de Coomassie R-250  
(Sigma) 0.06 %

**PBS**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) 7.25 mM  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 2.8 mM  
NaCl (Baker) 126 mM  
pH final 7.2

**Visualización de las proteínas Gyr.** Las proteínas Gyr se detectaron con el sistema 'ECL Western blotting Detection System' (Amersham Life Science). Se mezclaron cantidades equivalentes de los reactivos de detección; la mezcla se esparció en la superficie de la membrana y se dejó en reposo por 1.5 min. Para la captación de la señal emitida por la peroxidasa de rábano se empleó película Kodak X-Omat, con un tiempo de exposición de 2-8 min.

### 8. Medición de la expresión de los genes *gyr* de mutantes *rpoS* durante la fase estacionaria

Con este fin se emplearon las cepas MC4100  $\lambda\Phi(\textit{gyrA-lacZ})$ , MC4100  $\lambda\Phi(\textit{gyrB-lacZ})$ , y sus derivados *rpoS::Tn10*. De acuerdo con el protocolo de Maniatis *et al.* (1982), se permeabilizaron las células con SDS y se estimó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa sobre el sustrato *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 [\text{DO}_{420} - 1.75(\text{DO}_{550})]}{t \text{ v } \text{DO}_{600}}$$

Las lecturas  $\text{DO}_{420}$  y  $\text{DO}_{550}$  se realizan a partir de la mezcla de reacción. La lectura a una  $\text{DO}_{420}$  es una combinación de la absorbancia del *o*-nitrofenol y de la luz dispersada por el *debris* celular. En *E. coli*,  $1.75(\text{DO}_{550})$  equivale a la dispersión lumínica a una  $\text{DO}_{420}$ , y se utiliza como factor de corrección para estimar únicamente la absorbancia del *o*-nitrofenol a una  $\text{DO}_{420}$ . La densidad celular previa al ensayo se representa con la lectura  $\text{DO}_{600}$ , mientras que *t* y *v* representan el tiempo de la reacción (min) y el volumen del cultivo (mL). Las unidades Miller son proporcionales al incremento de *o*-nitrofenol por minuto por bacteria.





## Resultados

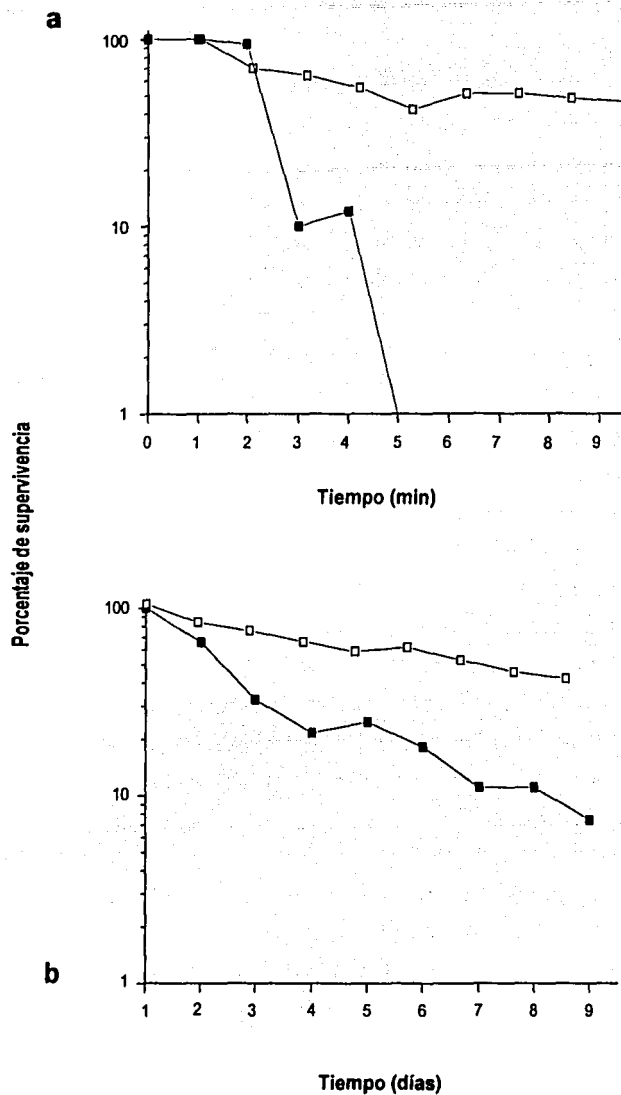
### 1. Construcción de mutantes *rpoS*

Para estudiar el papel de  $\sigma^S$  en la regulación de la tensión helicoidal o superenrollamiento del DNA, se aislaron mutantes MC4100 *rpoS::Tn10* ( $Tc^R$ ) mediante transducción generalizada con el bacteriófago P1 *vir*. Siendo *rpoS* un gen de función reguladora esencial en esta etapa, su inactivación se relaciona con efectos pleiotrópicos múltiples. Las mutantes *rpoS* no sobreviven periodos prolongados de fase estacionaria, y no desarrollan termotolerancia ni resistencia al  $H_2O_2$  (Lange & Hengge Aronis, 1991). Estas tres características sirvieron para verificar el fenotipo de las transductantes *rpoS::Tn10* (Fig. 8).

En la fase estacionaria, *E. coli* exhibe tolerancia a la exposición transitoria a temperaturas de 55 a 57 °C (Lange & Hengge-Aronis, 1991). Se puso a prueba esta capacidad en las células silvestres y *rpoS::Tn10* de cultivos en medio LB con 18 h de fase estacionaria. Alicuotas de cada cultivo se incubaron a 55 °C. Se determinó el porcentaje de supervivencia celular cada minuto cuantificando unidades formadoras de colonia (UFCs) (Fig. 8a). La viabilidad de las células *rpoS* disminuye rápidamente en comparación con las de tipo silvestre. El porcentaje de supervivencia disminuyó hasta ~10 % entre los minutos 2 y 3. Después de 5 minutos no se observaron colonias *rpoS*, mientras que ~40 % de las células silvestres aún era cultivable al término del ensayo.

A continuación, se evaluó el efecto de *rpoS* sobre la viabilidad celular durante la fase estacionaria. Se cultivaron las cepas silvestre y *rpoS* durante 9 días en medio mínimo M9, y se estimó diariamente el porcentaje de supervivencia cuantificando UFCs (Fig. 8b). La ausencia de un gen *rpoS* funcional tiene un marcado efecto sobre la viabilidad celular. La vida media de la cepa silvestre fue de 6 a 8 días. La vida media de la mutante *rpoS* fue de ~3 días, y entre los días 5 y 6 sobrevivía a penas el 10 % de la población.

*E. coli* exhibe dos enzimas con función hidroxidroxidasa, KatG (o HPI) y KatE (o HPII). La expresión de *katE* es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento y dependiente de  $\sigma^S$ . La inducción de *katG* durante la fase exponencial es función de la presencia de  $H_2O_2$ , pero  $\sigma^S$  es necesario para su expresión en la fase de desaceleración del crecimiento (Loewen & Hengge-Aronis, 1994). La sensibilidad de las mutantes *rpoS* al  $H_2O_2$  se evaluó directamente al agregar  $H_2O_2$  a colonias aisladas (Small *et al.*, 1994). Las células silvestres producen inmediatamente un intenso burbujeo, pero en las mutantes *rpoS* esto fue apreciable solamente después de 10-20 segundos. Esta prueba se empleó subsecuentemente en todos los experimentos como control de la identidad de las cepas. En conjunto, estas observaciones indican que *rpoS* fue inactivado.

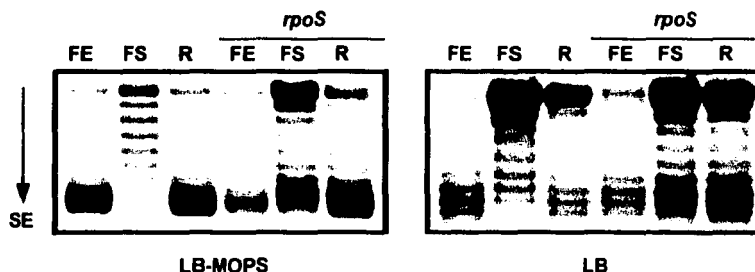


**Figura 8. Efecto de la mutación *rpoS* en la supervivencia a 55 °C.** (a) Termotolerancia de células *rpoS* en fase estacionaria. Alícuotas de cultivos en LB con 18 h de fase estacionaria se incubaron a una temperatura subletal de 55 °C, hasta por 9 min. (b) Supervivencia celular durante una fase estacionaria de 9 días en medio mínimo M9. □, cepa silvestre; ■, cepa *rpoS*. (En cada caso se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes).

## 2. Implicación de $\sigma^S$ en la tensión helicoidal del DNA en la fase estacionaria

Para la determinación del efecto de *rpoS* en el superenrollamiento del DNA, se empleó el plásmido reportero pMS01. Este plásmido es un derivado de pBR322 en el que el gen *tetA* fue eliminado (León *et al.*, 1988). La ausencia de este gen garantiza que la transcripción y traducción simultáneas de su producto, la proteína de membrana TetA, no alterarán la topología del plásmido durante los experimentos. Asimismo, esta delección elimina los efectos generados por la transcripción a partir de promotores divergentes.

Se comparó el nivel de superenrollamiento del DNA de las cepas silvestre y *rpoS* en el crecimiento exponencial, después de 18 horas de fase estacionaria, y en el período de recuperación del crecimiento (Fig. 9). Las células se cultivaron en los medios LB y LB adicionado con MOPS para discernir



**Figura 9. Cinética de superenrollamiento del plásmido pMS01 de células silvestres y *rpoS* cultivadas en los medios LB y LB-MOPS.** Los plásmidos con mayor superenrollamiento migran más rápidamente en el gel. FE, fase exponencial; FS, 18 h de fase estacionaria; R, período de recuperación de 10 min; SE, superenrollamiento. (Se muestran resultados representativos de, por lo menos, tres experimentos independientes).

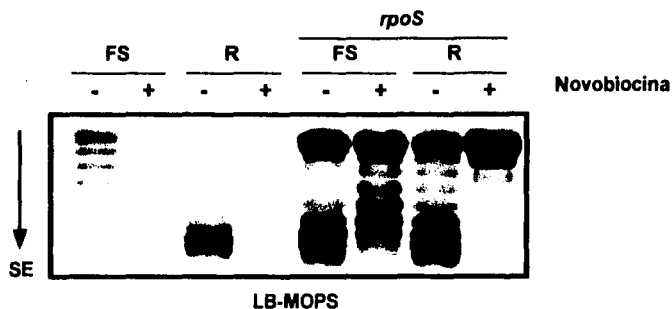
el efecto del pH del medio sobre la tensión helicoidal del plásmido. En medio LB, el pH se eleva hasta casi 9 unidades conforme se establece la fase estacionaria, lo cual ocurre después de aproximadamente 6 horas de incubación continua. En medio LB-MOPS, el pH permanece constante a lo largo de la curva de crecimiento. El período de recuperación del crecimiento se inició mediante la dilución 1:10 del cultivo de fase estacionaria en medio fresco (LB ó LB-MOPS) pre-incubado a 37 °C. Los topoisómeros se separaron en un gel de agarosa mediante electroforesis en presencia de cloroquina (12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los topoisómeros más superenrollados migran rápidamente y se visualizan en la parte inferior del gel, mientras que los topoisómeros con menor superenrollamiento, ó relajados, se ven en la parte superior.

En el crecimiento exponencial, los plásmidos de las células *rpoS* cultivadas en LB y LB-MOPS muestran un alto nivel de superenrollamiento, similar al de las células silvestres. Durante la fase estacionaria se observa una disminución en la tensión helicoidal. Sin embargo, las cepas silvestre y *rpoS* muestran distribuciones de topoisómeros distintas en medio LB-MOPS. En presencia de amortiguador, el plásmido de la cepa silvestre tiene una distribución más o menos homogénea de topoisómeros relajados. En cambio, la cepa *rpoS* exhibe una distribución bimodal de topoisómeros, que consiste en una subpoblación de moléculas superenrolladas y otra de moléculas relajadas. Por otro lado, en ausencia de MOPS, se observa una distribución bimodal de topoisómeros en las cepas silvestre y *rpoS*.

La disolución en medio fresco provoca una rápida recuperación del superenrollamiento en las células silvestres cultivadas en LB-MOPS. En esta condición, las mutantes *rpoS* incrementan parcialmente el superenrollamiento tras un período de recuperación de 10 minutos. Esto se aprecia como un aumento de la población de topoisómeros con mayor nivel de superenrollamiento; asimismo, es apreciable en la disminución de la intensidad de las bandas correspondientes al plásmido relajado. Las células silvestres cultivadas en LB presentan cierta modificación en la distribución de topoisómeros en el período de recuperación. La distribución bimodal se mantiene, pero se observa una separación más clara entre las subpoblaciones de plásmidos relajados y superenrollados. Este comportamiento también se presenta en las células *rpoS* después de 10 minutos de haberse iniciado la recuperación.

Los resultados indican que *rpoS* afecta la distribución de topoisómeros del plásmido reportero en una fase estacionaria relativamente temprana. Este efecto se observó en medio LB-MOPS. Asimismo, en este medio *rpoS* afecta la capacidad celular para aumentar la tensión helicoidal al disponerse nuevamente de nutrientes, por lo menos en un intervalo en el que las células silvestres lo logran por completo. En LB las cinéticas de superenrollamiento de las cepas *rpoS* y silvestre son casi indistinguibles entre sí, excepto porque la cepa *rpoS* establece una distribución bimodal más clara desde la fase estacionaria.

Se verificó que la subpoblación de plásmidos superenrollados observada en las mutantes *rpoS* en LB-MOPS fuera de sentido negativo, *i.e.*, generada por la actividad de Girasa. Cultivos en fase estacionaria de 18 horas y en período de recuperación se incubaron en presencia de un inhibidor de Girasa, novobiocina ( $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), por 10 minutos antes de la purificación del plásmido (Figura 10). El comportamiento del plásmido de la cepa silvestre en período de recuperación coincide con la implicación de la Girasa pre-existente en la célula en el incremento del superenrollamiento. La presencia de la novobiocina inhibe por completo dicho incremento. La novobiocina no tuvo un efecto apreciable sobre la distribución de topoisómeros de la cepa silvestre en la fase estacionaria. Este patrón difiere ligeramente del observado anteriormente (Reyes-Domínguez, 2000), donde la novobiocina aparentemente ocasionó una mayor relajación. Se observó que la subpoblación de plásmidos superenrollados



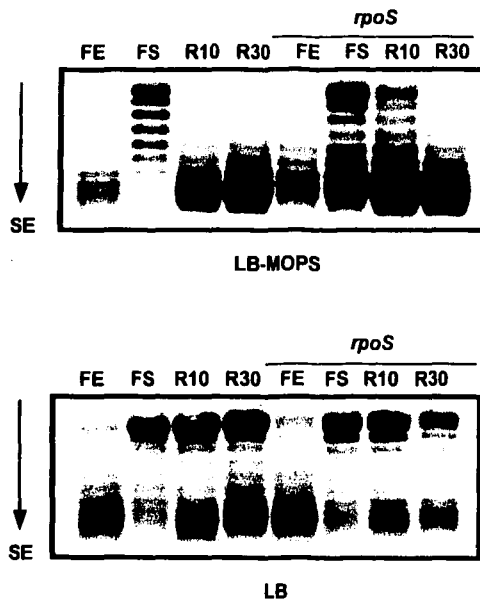
**Figura 10. Efecto de la novobiocina sobre el superenrollamiento del plásmido reportero de células *rpoS*.** Cultivos en fase estacionaria de 18 h en medio LB-MOPS se incubaron con novobiocina ( $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 10 min y se diluyeron 1:10 en medio fresco adicionado con la misma concentración de inhibidor. Los plásmidos superenrollados migran más rápidamente. FS, fase estacionaria; R, período de recuperación de 10 min, SE, superenrollamiento.

de las células *rpoS* en fase estacionaria se genera por la actividad de la Girasa. La tensión helicoidal de esta subpoblación disminuyó tras 10 minutos de incubación en presencia del inhibidor, lo que en el corrimiento electroforético se evidencia en un aumento de la intensidad de las bandas de los topoisómeros más relajados. Este patrón es observado en la cepa silvestre en LB cuando la distribución bimodal no se establece claramente (datos no mostrados). La novobiocina también evitó la aparición de la subpoblación de moléculas superenrolladas en el período de recuperación, lo que confirma una tensión helicoidal negativa. Sin embargo, el efecto del inhibidor sobre la Girasa parece ser más fuerte en este período que en la fase estacionaria. En el corrimiento electroforético no se observan plásmidos superenrollados.

### 3. Efecto de $\sigma^S$ sobre la capacidad celular para generar superenrollamiento en el período de recuperación del crecimiento

Los resultados observados tras 18 horas de fase estacionaria en LB-MOPS sugieren que las células *rpoS* aún retienen la capacidad (ligeramente disminuida) para aumentar el superenrollamiento en el período de recuperación. Se prolongó el período de recuperación del crecimiento hasta 30 minutos y se determinó la distribución de topoisómeros en ambas cepas (Fig. 11). Asimismo, no se descartó la posibilidad de que, en medio LB, *rpoS* afectara la cinética de superenrollamiento del plásmido al extenderse la recuperación. La distribución de topoisómeros del plásmido de las células *rpoS* de cultivos en LB no se modificó al término de 30 minutos. Este comportamiento coincide nuevamente con el que

describe el plásmido en las células silvestres cultivadas en LB, en cuyo caso no se observa modificación alguna aún después de 80 minutos (Reyes-Domínguez, 2000). Por otro lado, en LB-MOPS sí ocurrió una variación en el superenrollamiento. Después de 30 minutos de haber agregado nutrientes, las células *rpoS* lograron aumentar el superenrollamiento del plásmido hasta un nivel similar al observado en la cepa silvestre tras 10 y 30 minutos de recuperación. Se concluye que las células que carecen de  $\sigma^S$  retienen la capacidad para superenrollar el plásmido cuando abandonan una fase estacionaria de 18 h.



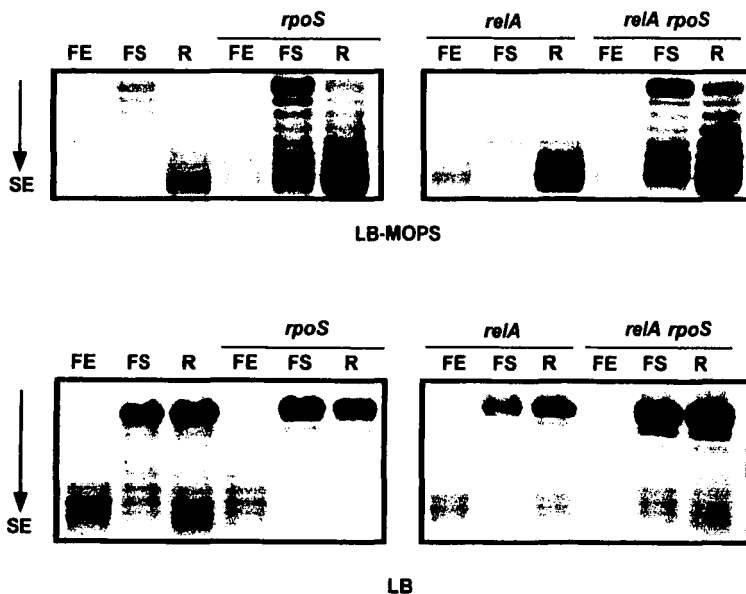
**Figura 11. Capacidad de las células *rpoS* para aumentar el superenrollamiento del plásmido pMS01 en el período de recuperación del crecimiento.** Los plásmidos superenrollados migran más rápidamente. FE, fase exponencial; FS, fase estacionaria de 18 h; R10 y R30, períodos de recuperación de 10 y 30 min, respectivamente; SE, superenrollamiento. (Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes).

#### 4. La ausencia del gen *relA* no afecta la tensión helicoidal del DNA en la fase estacionaria

Los resultados indican que el modulador  $\sigma^S$  participa en la regulación de la tensión helicoidal del DNA durante la fase estacionaria. Dado lo anterior, se consideró importante la evaluación del efecto de la mutación *relA1*, contenida en la cepa MC4100, en el superenrollamiento del plásmido reportero. La

cepa MC4100 se emplea ampliamente en estudios de estrés de tipos calórico y nutricional, y el producto de *relA* es una de las dos proteínas responsables de la síntesis de (p)ppGpp en *E. coli*. El alelo mutante *relA1* consiste en una inserción IS2 N-terminal que posee una actividad (p)ppGpp sinte-tasa residual durante la respuesta estricta (Metzger *et al.*, 1989; Cashel *et al.*, 1996). Desde que el control estricto es una respuesta primaria a la limitación nutricional, y el (p)ppGpp controla la expresión de *rpoS* a nivel transcripcional, el nivel superenrollamiento observado durante la fase estacionaria en la cepa MC4100, y en su derivado *rpoS*, podría ser resultado de la falta de (p)ppGpp. Se determinó el efecto de *relA* sobre el superenrollamiento del DNA mediante la comparación de la distribución de topoisómeros del plásmido reportero de mutantes *relA251::kan* y *relA251::kan rpoS::Tn10* obtenidas a partir de la cepa CF1648 (*relA*<sup>+</sup>).

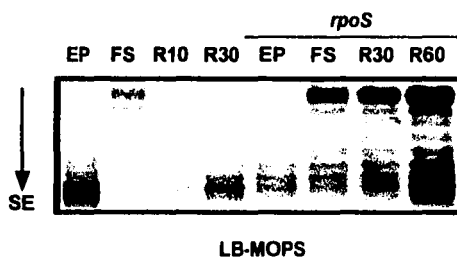
En la Figura 12 se muestra la tensión helicoidal del plásmido en estas cepas durante las fases



**Figura 12. Cinética de superenrollamiento del plásmido pMS01 de mutantes *relA* y *relA rpoS* cultivadas en los medios LB y LB-MOPS.** Los plásmidos superenrollados migran más rápidamente. FE, fase exponencial; FS, fase estacionaria de 18 h; R, periodo de recuperación de 10 min; SE, superenrollamiento. (Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes).



exponencial y estacionaria, y en el período de recuperación del crecimiento. En LB-MOPS, el plásmido de las células *relA* muestra el mismo comportamiento que la cepa silvestre, es decir, un alto nivel de superenrollamiento en la fase exponencial, una disminución más o menos homogénea de superenrollamiento tras 18 horas de fase estacionaria, y un aumento substancial de superenrollamiento en un período de recuperación de 10 minutos. En este mismo medio, los plásmidos de las mutantes *rpoS* y *relA rpoS* exhibieron distribuciones bimodales y una recuperación parcial del superenrollamiento, como ocurre en el caso de la cepa MC4100 *rpoS*. En medio LB, el comportamiento de los plásmidos de las cepas mutantes y la silvestre también fueron similares. Se observa que, por lo menos en las condiciones experimentales empleadas, *relA* no afecta el superenrollamiento del DNA en ninguna de las etapas de crecimiento estudiadas. Conviene mencionar que, en este ensayo, se descarta la posibilidad de que la cinética de superenrollamiento asumida como 'típica' de una célula silvestre en la fase estacionaria se vea afectada por mutaciones que truncan, parcial- o totalmente, al gen *relA*. Sin embargo, no se puede descartar un efecto del (p)ppGpp sobre el superenrollamiento porque SpoT también sintetiza esta molécula.



**Figura 13. Cinética de superenrollamiento del plásmido pMS01 de células *rpoS* tras una fase estacionaria prolongada.** Los plásmidos superenrollados migran más rápidamente. FE, fase exponencial; FS, fase estacionaria de 72 h; R10, R30 y R60 períodos de recuperación de 10, 30 y 60 min, respectivamente; SE, superenrollamiento. (Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes)

### 5. $\sigma^S$ y el superenrollamiento del DNA tras un período prolongado de fase estacionaria

La presencia de  $\sigma^S$  es particularmente importante para la supervivencia celular durante períodos prolongados de fase estacionaria. Se determinó el superenrollamiento del plásmido de células incubadas en LB-MOPS durante 72 horas de incubación en esta etapa. Asimismo, se determinó la capacidad de estas células para incrementar el superenrollamiento en el período de recuperación (Fig. 13). El nivel de relajación del plásmido de las células silvestres fue ligeramente mayor tras 72 horas. La capacidad

para incrementar la tensión helicoidal se conservó en estas células; en un periodo de recuperación de 10 minutos se obtuvo una población de plásmidos superenrollados. En el caso de las células *rpoS*, la distribución bimodal observada en una fase estacionaria de 18 horas persiste tras 72 horas y en el periodo de recuperación, aún cuando éste se prolongue por 30 y hasta 60 minutos. Los resultados indican que el efecto de la ausencia de un gen *rpoS* funcional sobre la capacidad para generar superenrollamiento negativo es más comprometedora tras un periodo prolongado de fase estacionaria.

## 6. La expresión de Girasa en las mutantes *rpoS*

Se realizaron dos experimentos con el fin de conocer algún efecto de  $\sigma^S$  sobre la expresión de Girasa. El primero consistió en la determinación de la transcripción de los genes que codifican a Girasa a lo largo de la curva de crecimiento. Para ello, con el bacteriófago P1 *vir* se transdujo el alelo *rpoS::Tn10* en cepas MC4100 que contienen las fusiones transcripcionales  $\lambda \Phi(gyrA-lacZ)$  y  $\lambda \Phi(gyrB-lacZ)$ . Las fusiones comprenden las regiones reguladoras de los genes *gyrA* y *gyrB*, de 1190 pb y 902 pb, respectivamente, y son unicopia (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Se estimó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones transcripcionales de células cultivadas en medio LB-MOPS a lo largo de la curva de crecimiento, hasta 72 horas de incubación continua (Fig. 14). El comportamiento de las fusiones fue similar en ambas cepas. Este comportamiento consistió en un aumento progresivo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa hasta la transición a la fase estacionaria; en el tiempo subsecuente los niveles de transcripción permanecieron constantes, en el caso de *gyrA*, ó disminuyeron ligeramente, en el caso de *gyrB*.

El segundo experimento fue la detección de las subunidades GyrA y GyrB mediante ensayos tipo 'Western blot' a partir de células en fase exponencial ó cultivadas por 18 y 72 horas de fase estacionaria (Fig. 15). En los tiempos indicados se obtuvieron muestras de proteína total de las cepas MC4100 y MC4100 *rpoS* cultivadas en los medios LB-MOPS. Las proteínas se separaron por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas Gyr se detectaron mediante anticuerpos monoclonales. Se observó que los niveles de las subunidades GyrA y GyrB en la fase exponencial y en la fase estacionaria se mantienen más o menos constantes en ambas condiciones de cultivo.

Los niveles de transcripción de los genes *gyrA* y *gyrB*, y la cantidad de las subunidades de Girasa, se mantienen durante la fase estacionaria independientemente de la presencia  $\sigma^S$ . Estas observaciones implican que el incremento de la degradación de proteínas típica de la fase estacionaria no afecta el nivel de las proteínas que constituyen a Girasa. Asimismo, implican que el mantenimiento de la estabilidad de estas proteínas no depende de  $\sigma^S$ .

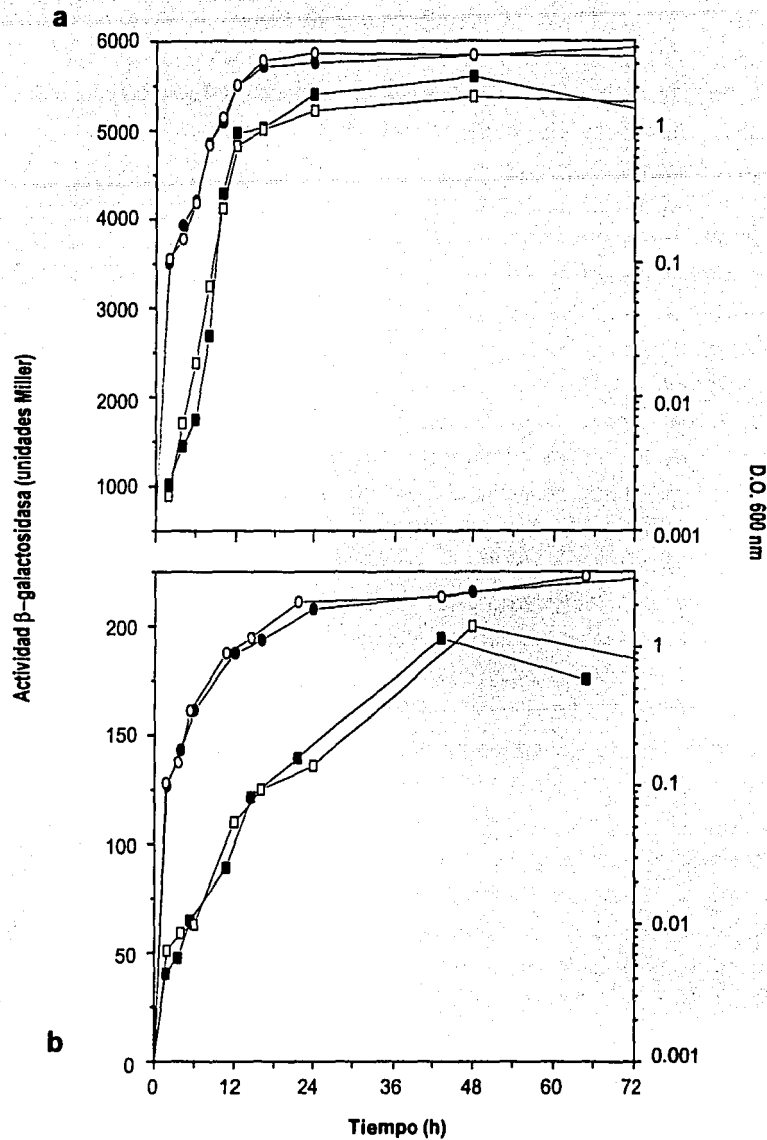
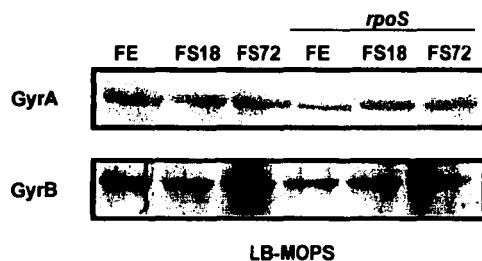


Figura 15. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de fusiones transcripcionales en los genes *gyrA* y *gyrB* en células *rpoS*. A lo largo de la curva de crecimiento (círculos), se estimó la actividad  $\beta$ -galactosidasa (cuadrados) de las fusiones transcripcionales *gyrA-lacZ* (a) y *gyrB-lacZ* (b) contenidas en las cepas silvestre (símbolos blancos) y *rpoS* (símbolos negros).



**Figura 14. Cantidad de las subunidades de la Girasa de mutantes *rpoS*.** Visualización de las subunidades GyrA y GyrB de las cepas silvestre y *rpoS* mediante ensayos tipo Western en la fase exponencial (FE), y tras 18 (FS18) y 72 horas (FS72) de fase estacionaria en medio LB-MOPS. (Se muestran resultados representativos de, por lo menos, tres experimentos independientes).



## Discusión

En este trabajo se encontró que, en la fase estacionaria,  $\sigma^S$  influye en la tensión helicoidal de un plásmido reportero de células cultivadas en medio LB adicionado con MOPS. Se observaron dos efectos. Primero, la mutante *rpoS* muestra una distribución bimodal de topoisómeros tras 18 horas de fase estacionaria (Fig. 9). Esta distribución persiste aún después de 72 horas de incubación en esta etapa (Fig. 13). El efecto del inhibidor de Girasa novobiocina indica que la tensión helicoidal del plásmido en esta distribución es de sentido negativo (Fig. 10). Segundo, la mutación de *rpoS* ejerce un efecto negativo en la capacidad para incrementar el superenrollamiento del plásmido en el período de recuperación del crecimiento (Figs. 11 y 13). En este período, la mutante *rpoS* cultivada por 18 horas de fase estacionaria incrementa el superenrollamiento hasta un nivel similar al observado en la fase exponencial, pero sólo después de 30 minutos de habersele proporcionado nutrimentos. (El plásmido de la cepa silvestre recupera el superenrollamiento en 10 minutos). La mutante pierde la capacidad para incrementar el superenrollamiento cuando se incuba por un período de 72 horas de fase estacionaria. En medio LB, la cinética de superenrollamiento del plásmido de la mutante *rpoS* es similar a la de la cepa silvestre. Se observa una distribución bimodal de topoisómeros en la fase estacionaria que no se modifica al agregar medio fresco al cultivo (Fig. 11).

Paralelamente, se evaluó el papel de *relA*, el gen para la principal (p)ppGpp sintetasa de *E. coli*, en el superenrollamiento del plásmido reportero en los medios LB y LB-MOPS (Fig. 12). El (p)ppGpp es el efector del control estricto de la expresión génica inducido por la limitación nutrimental. Además, se implica en la modulación transcripcional positiva de *rpoS*. Se observó que la mutación de *relA* no afecta el superenrollamiento del plásmido reportero en la fase estacionaria ni en el período de recuperación. Esta observación se extiende a mutantes dobles *relA rpoS*. No se descarta un efecto del (p)ppGpp en la regulación del superenrollamiento del DNA porque SpoT también es capaz de sintetizar esta molécula. Posiblemente, si el (p)ppGpp tiene un efecto sobre el superenrollamiento del DNA, éste depende de su relación con la transcripción de *rpoS*. Las mutantes *relA spoT* no acumulan  $\sigma^S$  en la transición a la fase estacionaria (Lange & Hengge-Aronis, 1994b), aunque el nivel de esta proteína aumenta en el tiempo subsecuente (Gentry *et al.*, 1993). Entonces, se esperaría que la ausencia de (p)ppGpp afectara el superenrollamiento del plásmido en la transición a la fase estacionaria. Esta posibilidad indica la necesidad de experimentos para definir el intervalo en el que  $\sigma^S$  propicia el establecimiento de la distribución bimodal de topoisómeros.

El efecto de la mutación de *rpoS* sobre la tensión helicoidal en LB-MOPS implica que, en ausencia de  $\sigma^S$ , uno ó más genes capaces de afectar este parámetro no se expresan adecuadamente. La aparición de la subpoblación de plásmidos superenrollados podría relacionarse con un cambio en la expresión de los genes *gyr*. Sin embargo, la actividad transcripcional de fusiones *lacZ* en los genes *gyr*,

y las cantidades de las subunidades de Girasa, se mantienen independientemente de la presencia de *rpoS* durante la fase estacionaria (Figs. 14 y 15). Estas observaciones prácticamente descartan un efecto, directo ó indirecto, de  $\sigma^S$  sobre algún parámetro de la expresión de Girasa. El resultado del ensayo tipo 'Western' descarta un papel de  $\sigma^S$  en el mantenimiento de la integridad de las proteínas que componen a Girasa. No obstante, este experimento no descarta un papel de  $\sigma^S$  en el ensamblaje de la holoenzima.

Una estrategia para explicar el efecto de *rpoS* consiste en la determinación del superenrollamiento del plásmido de mutantes en genes dependientes de  $\sigma^S$ . De la lista de genes influidos por este factor  $\sigma$ , *topA*, *dps*, *cbpA*, y *gyrI* tienen una obvia relación con la estructura del DNA. Mientras *topA* se implica directamente en la topología del DNA, *dps*, *cbpA* y *gyrI* codifican proteínas capaces de unirse al DNA o de interactuar con Girasa (Tabla 1).

La transcripción de *topA* puede iniciarse a partir de 4 promotores distintos. Uno de éstos, Px1, muestra una actividad dependiente de la fase de crecimiento y de la presencia de  $\sigma^S$ . Pero su secuencia se acerca al consenso de los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  (Qi *et al.*, 1997). La distribución bimodal de topoisómeros de la mutante *rpoS* podría explicarse si los niveles de Top1 disminuyeran significativamente por la transcripción ineficiente de *topA*. Sin embargo, aunque la ausencia de *rpoS* impide la transcripción de *topA* desde Px1, el nivel de Top1 permanece más o menos constante en la fase estacionaria (Qi *et al.*, 1997). Por lo tanto, la dependencia de *topA* hacia  $\sigma^S$  parece ser irrelevante para los cambios en el superenrollamiento del plásmido reportero en la mutante *rpoS*.

El nivel de Dps aumenta en la fase estacionaria y en el estrés oxidativo hasta casi 200,000 unidades por célula (Martínez & Kolter, 1997; Ali Azam *et al.*, 1999). Aparentemente, esta proteína evita el daño al DNA por diversos factores, como los agentes oxidativos y las nucleasas, mediante un efecto de co-cristalización (Almirón *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1999). Dps podría afectar la topología del plásmido en los cultivos en LB-MOPS al limitar el acceso de Girasa al DNA. Este efecto se ausentaría con la mutación de *dps*, y posiblemente reproduciría la distribución de topoisómeros de la mutante *rpoS*. En el laboratorio se determinó el superenrollamiento del plásmido en una mutante *dps*, pero no se observaron variaciones respecto al comportamiento del plásmido de la cepa silvestre. El que Dps no influya en el superenrollamiento del plásmido no indica necesariamente que no pueda afectar la tensión helicoidal del DNA. Aunque el nivel máximo de Dps no es suficiente para cubrir el cromosoma completamente (Ali Azam *et al.*, 1999), su efecto en la capacidad celular para resistir el estrés oxidativo es significativo (Martínez & Kolter, 1997). A pesar de que esta proteína no tiene una obvia afinidad por alguna secuencia (Wolf *et al.*, 1999), no se descarta la posibilidad de que su interacción con otras proteínas dicte una distribución específica. Estas proteínas podrían interactuar con secuencias que no se encuentran en el plásmido reportero. En este sentido, el plásmido pMS01 no estaría representando un efecto localizado del cromosoma. Por otro lado, posiblemente Dps simplemente es un escudo físico que compacta el DNA, pero que es incapaz de modificar la tensión helicoidal de la molécula.

La ausencia de *rpoS* podría implicar la expresión nula, o deficiente, de una proteína que influye en la integridad ó la actividad de Girasa. La comparación con el estrés por calor permite suponer la participación de una chaperona en la determinación del superenrollamiento del plásmido en la mutante *rpoS*. El aumento de superenrollamiento en el estrés por calor indica que Girasa tiene una actividad eficiente, aún cuando el incremento de temperatura afecta negativamente la integridad de las proteínas. Se ha propuesto que el sistema DnaKJ evita la desnaturalización de Girasa en el estrés por calor, permitiéndole aumentar la tensión helicoidal (Camacho-Carranza *et al.*, 1995; López-García & Forster, 2000). En este sentido, la determinación del efecto de *cbpA* sobre la tensión helicoidal del plásmido reportero en la fase estacionaria es importante. Este gen codifica una proteína supresora de la mutación de *dnaJ*, y la doble mutación *cbpA dnaJ* impide a las células crecer a 37 °C. El hecho de que esta proteína tenga afinidad por el DNA con curvatura, y que su expresión aumente en forma dependiente de  $\sigma^S$  (Ueguchi, 1994; Yamashino *et al.*, 1994), sugiere que es una chaperona importante para la respuesta general al estrés. Al evaluarse el efecto de *cbpA*, se estudiaría la posibilidad de que su producto supliera a DnaJ en la fase estacionaria. Junto con DnaK, CbpA podría desempeñar una función en la protección o ensamblaje de Girasa.

Gyrl es una proteína de la fase estacionaria que interactúa directamente con Girasa, impidiéndole la unión al DNA (Nakanishi *et al.*, 2002). Asimismo, se supone que esta proteína tiene un papel en la protección celular contra inhibidores peptídicos de esta enzima (Chatterji & Nagaraja, 2002). Se pensó que Gyrl podría mantener a Girasa en forma holoenzimática, aunque inactiva. De ser el caso, se podría explicar el comportamiento del plásmido de las cepas silvestre y *rpoS* en la fase estacionaria y en la recuperación del crecimiento. En el laboratorio se determinó el nivel de superenrollamiento del plásmido en una mutante *gyrl*. Pero la inactivación de este gen no se relacionó con una distribución de topoisómeros distinta a la de la cepa silvestre.

El intento de explicar el efecto de *rpoS* en el superenrollamiento del DNA con la inactivación de sus genes dependientes podría no ser la estrategia más adecuada. La selección de candidatos ya es, de hecho, difícil. Varios de estos genes tienen un papel en el metabolismo y la producción de energía, como *aldB* y *acs*, ó en el almacenamiento y utilización de reservas nutritivas, como *treF* y *treA* (Tabla 1). Cualquiera de estos genes, individual- ó colectivamente, podría contribuir a la desestabilización del metabolismo programado para la fase estacionaria. Estos genes podrían afectar, por ejemplo, el potencial fosforilativo de la célula, que se implica directamente en la actividad de Girasa (Westerhoff *et al.*, 1988; van Workum *et al.*, 1996).

El análisis de aspectos puntuales del metabolismo es metodológicamente complicada. Quizá sea innecesario abordar el problema desde esta perspectiva. Por el contrario, puede contemplarse la posibilidad de que sea precisamente la influencia global de  $\sigma^S$  sobre el funcionamiento celular la que repercute en el superenrollamiento. En ausencia de  $\sigma^S$  no se activa adecuadamente el programa genéti-



co de la fase estacionaria. La activación es inadecuada porque la expresión de muchos genes depende, al menos parcialmente, de este factor  $\sigma$ , y otros reguladores (como el complejo cAMP-CRP, IHF y Fis) intervienen en esta etapa. Por lo tanto, la disminución del superenrollamiento del DNA en la fase estacionaria sólo es parcialmente dependiente de  $\sigma^S$ , pero es el producto de un cambio fisiológico general dictado por un programa genético.

La inactivación de *rpoS* puede representar una ventaja adaptativa en un momento dado. No obstante, la desestabilización genética que supone esta inactivación es potencialmente deletérea para la célula. En ausencia de *rpoS* se pierde capacidad para enfrentar el estrés. A partir de cualquiera de estas dos opciones se puede formular una explicación tentativa de la distribución de topoisómeros en las células *rpoS* en la fase estacionaria. Enseguida se comentan evidencias de ventaja adaptativa conferida por la mutación de *rpoS*, y se discute un modelo basado en dichas observaciones. Posteriormente se discute un modelo fundamentado en el efecto negativo de la mutación de *rpoS* sobre la capacidad de supervivencia.

La incubación prolongada por días en la fase estacionaria provoca la muerte de las células de un cultivo, excepto por una fracción poblacional. Si se inocula una minoría de esta fracción en un cultivo en fase estacionaria temprana, las supervivientes del cultivo prolongado desplazan rápidamente a las células 'jóvenes'. El fenotipo de esas células se denomina GASP (Growth advantage in stationary phase), y frecuentemente se relaciona con la aparición de alelos de *rpoS* que atenúan, pero no suprimen, la actividad de  $\sigma^S$  (Zambrano & Kolter, 1996). Notley-McRobb *et al.* (2002) encontraron que la limitación nutrimental conduce a una rápida selección de mutaciones *rpoS* en cultivos de quimiostato. La acumulación de mutantes *rpoS* y la transcripción de genes de los sistemas de alta afinidad para la incorporación de glucosa se correlacionan positivamente. La expresión de estos sistemas depende principalmente de  $\sigma^{70}$ . Se supone que la mutación de *rpoS* implica la disminución de la competencia entre los factores  $\sigma^S$  y  $\sigma^{70}$  por la RNAP. En consecuencia, la célula no activa la respuesta general de la fase estacionaria y no apaga los sistemas de incorporación de nutrientes. Debe recordarse que el ingreso a la fase estacionaria no parece responder al agotamiento de un nutriente específico, pero que existen umbrales de concentración que lo propician (Ferenci, 1999). En medio mínimo con glucosa, la producción de cAMP, y la inducción de operones como *mal*, ocurre a una concentración de glucosa de ~0.3 mM, cuando la tasa de crecimiento está a ~97 % de su valor máximo. La inducción de genes dependientes de  $\sigma^S$  ocurre en tiempos de generación y concentraciones de glucosa de ~7 h y  $\ll 10^{-6}$  mM, respectivamente (Notley-McRobb & Ferenci, 1996).

En este trabajo, lo anterior significaría que la mutante *rpoS* continúa captando nutrientes del medio. Los nutrientes disponibles tras 18 horas serían insuficientes para resumir el crecimiento. En una cepa silvestre, los sistemas de captación nutrimental posiblemente estarían inactivados. En la mutante *rpoS* estos sistemas continuarían encendidos. Entonces, al menos una fracción de la Girasa en la po-

blación celular podría disponer de ATP para generar la subpoblación de plásmidos superenrollados. En este sentido, también puede considerarse que la permeabilidad celular se modifica por la mutación de *rpoS*. Por ejemplo, *ompF*, que codifica una porina de membrana externa, es regulado negativamente por  $\sigma^S$  (Liu & Ferenci, 1998). Este modelo enfatiza el hecho de que, en principio, las células *rpoS* tienen una capacidad metabólica distinta a la de las células silvestres. Esta capacidad metabólica está disponible incluso a concentraciones nutrimentales residuales. Sin embargo, no explica por qué la distribución bimodal persiste aún después de 72 horas de fase estacionaria. En esta etapa los nutrimentos del medio LB seguramente se han agotado. Tampoco explica la incapacidad de la mutante *rpoS* para superenrollar rápidamente el plásmido en el período de recuperación. Aunque este modelo sea insatisfactorio, sugiere la necesidad de considerar la relación entre el superenrollamiento del DNA, la fisiología celular, y  $\sigma^S$  en términos más generales. Particularmente, debe ponerse en consideración la dinámica poblacional de las células *rpoS* en un período que requiere la capacidad para tolerar el estrés y reparar el daño celular.

El segundo modelo implica primordialmente la disminución de la capacidad de las células *rpoS* para sobrevivir en la fase estacionaria. El superenrollamiento del plásmido en la fase estacionaria, ó en el período de recuperación, varía en función de la presencia del amortiguador MOPS. Esta diferencia indica que el pH del medio repercute en la tensión helicoidal del plásmido. Además, la mutación de *rpoS* tiene un efecto apreciable en el superenrollamiento, pero solamente en medio LB-MOPS. El superenrollamiento del plásmido de las mutantes *rpoS* en LB-MOPS es similar al de las células silvestres en LB.

Lo anterior sugiere que las mutantes *rpoS* en LB-MOPS sufren una situación fisiológica similar a la experimentada por las células silvestres (o *rpoS*) en LB. La distribución bimodal de toposiómeros, tanto en las células *rpoS* en LB-MOPS como en las silvestres en LB, podría relacionarse con la pérdida de la viabilidad en la fase estacionaria. La viabilidad no sólo implica la presencia de actividad fisiológica en la célula. También incluye el control relativo de la célula sobre dicha actividad, y la capacidad para alternar eficientemente entre programas genéticos. (De manera importante, entre los programas de crecimiento estacionario y exponencial). En medio LB, la elevación del pH sería el factor crítico para la disminución del control fisiológico. En LB-MOPS, la presencia del amortiguador asegura que el estrés sea predominantemente nutrimental. La modificación de la permeabilidad y el metabolismo inherentes a la fase estacionaria propiciaría la relajación homogénea del plásmido en las células silvestres. Dado que la inactivación de *rpoS* implica la incapacidad para prevenir y reparar los daños asociados al estrés, en LB-MOPS la disminución de la viabilidad dependería del daño acumulado en la célula. Sin la capacidad para activar eficientemente mecanismos de reparación, aun a un pH extracelular neutro, incluso el metabolismo (e.g., la respiración) puede dañar a la célula. De esta manera, en un cultivo podría esperarse la co-existencia de células moribundas y de distintas

capacidades metabólicas.

A partir de esta suposición se propone que, tras 18 horas de fase estacionaria, existe una fracción poblacional de células moribundas que liberan nutrientes. Estos nutrientes serían captados por las células con cierta capacidad metabólica. Topl y Girasa podrían relajar el plásmido en las células moribundas. Para esto, sería necesario que al menos una fracción de estas células perdiera el control sobre la permeabilidad, pero que permaneciera con un grado de integridad membranal. Por otro lado, las células que aún tienen capacidad metabólica podrían inducir el incremento del superenrollamiento del plásmido. Este esquema es congruente con la idea de que las mutante *rpoS* mantiene encendidos los sistemas de captación nutricional (como se expuso en el primer modelo). Además, es congruente con el control termodinámico del superenrollamiento del DNA, en el que la dependencia de la tensión helicoidal hacia el nivel energético de la célula se acentúa cuando el cociente  $[ATP]/[ADP]$  es bajo (Jensen *et al.*, 1995). Esto es, las células con mayor capacidad metabólica y menor daño mostrarían una distribución de topoisómeros que tiende a una tensión helicoidal elevada. Las células con menor capacidad metabólica, ó moribundas, presentarían una mayor proporción de plásmidos con una tensión helicoidal intermedia o baja. Conforme se prolonga la incubación en la fase estacionaria, el número de células viables disminuye. No hay cambios críticos en el número de unidades formadoras de colonia en los cultivos silvestres tras 72 horas de fase estacionaria en LB-MOPS. En el caso de los cultivos *rpoS*, hay una disminución en las cuentas viables de aproximadamente 14 % (Reyes *et al.*, 2003). Aunque la tasa de muerte celular de la cepa *rpoS* sea relativamente baja al término de 72 horas, puede considerarse que en este intervalo la heterogeneidad de la población persiste y sufre modificaciones. Incluso se puede suponer que la fracción poblacional restante exhibe ciertas mutaciones que compensan el efecto de la mutación de *rpoS* sobre la supervivencia. Estas mutaciones podrían considerarse de tipo 'GASP', pero incidirían en genes distintos a *rpoS*. Tal fracción poblacional sobreviviría, mientras que sería capaz de emplear los productos liberados por las células muertas. De esta manera se explicaría la persistencia de la distribución bimodal de topoisómeros en una fase estacionaria prolongada. Dado que en LB-MOPS se ausenta el posible efecto negativo del pH, también puede suponerse que en las mutantes *rpoS* el plásmido presenta anticipadamente un comportamiento que las células silvestres sólo experimentan cuando las condiciones del cultivo se deterioran críticamente. De ser el caso, el plásmido de un cultivo silvestre en LB-MOPS también exhibiría una distribución bimodal, pero después de una fase estacionaria más prolongada que 72 horas.

Profundizar en el esquema presentado requiere la estimación de la viabilidad celular en la fase estacionaria por medios distintos a las cuentas viables. Mediante el uso combinado de técnicas de tinción y microscopía, Ericsson *et al.* (2000) estimaron la viabilidad en la fase estacionaria en términos de la integridad membranal y de la capacidad para reanudar el crecimiento de células individuales. Encontraron que las células con una integridad membranal disminuida son incapaces de dividirse al dispo-

ner de nutrimentos. A nivel poblacional, estas observaciones coinciden con las estimaciones de la viabilidad por medio de cuentas viables. No obstante, también encontraron que una fracción de la población, alrededor del 5 %, consiste en células con la membrana íntegra, pero incapaces de dividirse. Esto indica que la capacidad reproductiva y la actividad metabólica sí pueden deteriorarse antes del colapso de la membrana. Por otro lado, la heterogeneidad poblacional en un cultivo en fase estacionaria aparentemente es todavía mayor. Makinoshima *et al.* (2002) definieron 10 subpoblaciones celulares con distinta densidad de flotación mediante centrifugación con gradientes de Percoll (un coloide de sílice con recubrimiento de polivinilpirrolidona). La relación entre la densidad y el nivel de distintos marcadores moleculares indica que la expresión del programa de la fase estacionaria es discontinuo. Todavía dentro de este carácter discontinuo, la tensión helicoidal del DNA disminuye como una respuesta general. Es interesante pensar en las diferencias que podrían existir entre los patrones de subpoblaciones celulares de cultivos silvestres y *rpoS* en presencia de MOPS.

El fraccionamiento de un cultivo en función de las capacidades metabólicas y de la integridad membranar para después monitorear el superenrollamiento del plásmido sería demasiado complicado. En lugar de esto, sería apropiado disponer de aproximaciones de los tiempos en que se establece la distribución bimodal de topoisómeros y se pierde la capacidad para incrementar el superenrollamiento. A partir de estas observaciones podrían buscarse cambios en la composición poblacional que sugirieran un comportamiento general congruente con el modelo propuesto. Una cuestión importante sería estimar los porcentajes de células íntegras (metabólicamente activas) y capaces de reproducirse en diferentes etapas de la fase estacionaria. Esta característica podría compararse con la capacidad relativa del cultivo para incrementar el superenrollamiento del plásmido en el período de recuperación.

Se puede pensar que, incluso después de una fase estacionaria menos prolongada que 18 horas, el incremento del superenrollamiento del plásmido en el período de recuperación depende de factores adicionales a los meramente nutrimentales. Por ejemplo, se ha propuesto que la elevada expresión de Fis en la fase exponencial temprana es parte de la regulación homeostática del superenrollamiento del DNA (Travers *et al.*, 2001). Fis reprime la transcripción de los promotores de los genes *gyr*. Asimismo, se ha propuesto que protege al DNA contra la introducción de superenrollamiento excesivo en la recuperación del crecimiento (Schneider *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2000 ). Aunque la transcripción de *fis* no depende de  $\sigma^S$ , sería necesario evaluar el papel de este gen en la regulación del superenrollamiento del DNA bajo las condiciones experimentales empleadas en este laboratorio.

La regulación del superenrollamiento del DNA no puede ser menos que compleja. Esta regulación depende de, al menos, dos tipos de control general. En el control homeostático se acoplan la estructura del DNA y la transcripción de los genes de TopI y Girasa. Por otro lado, en el control termodinámico se acoplan el metabolismo y la actividad de Girasa. Se puede esperar que el balance entre estas formas de regulación dependa de diversos factores celulares. En lo general, esta observación coincide

con la posible implicación de la tensión helicoidal en las respuestas celulares al ambiente. En lo particular, sugiere que la influencia de un regulador como  $\sigma^S$  en la tensión helicoidal del DNA podría resultar de la expresión controlada de genes de diversa función, y no de un solo gen.

## Conclusiones

En cultivos en medio LB-MOPS:

El regulador transcripcional  $\sigma^S$  afecta el superenrollamiento del plásmido reportero en la fase estacionaria y en el período de recuperación del crecimiento.

En ausencia de  $\sigma^S$ , las células pierden la capacidad para incrementar el superenrollamiento del plásmido reportero después de una fase estacionaria prolongada.

El gen *relA* no afecta el superenrollamiento del plásmido reportero en la fase estacionaria ni en el período de recuperación del crecimiento analizados.

Los niveles de transcripción de los genes *gyrA* y *gyrB*, y de las subunidades de Girasa, se mantienen durante el crecimiento independientemente de la presencia de  $\sigma^S$ .



## Perspectivas

La determinación del período en que  $\sigma^S$  propicia el establecimiento de la distribución bimodal en células cultivadas en medio LB-MOPS. Se podría comparar las cinéticas de superenrollamiento del plásmido reportero de las células *rpoS* cultivadas en LB y LB-MOPS en este período.

La determinación del superenrollamiento del plásmido de células silvestres en LB-MOPS a tiempos más prolongados que 72 horas para determinar si en estas condiciones de cultivo es posible el establecimiento de una distribución bimodal de topoisómeros.

La purificación y comparación de las cantidades de Girasa en forma holoenzimática en las fases exponencial, estacionaria, y de recuperación con el fin de determinar un posible papel de  $\sigma^S$  en el ensamblaje de la holoenzima.

El estudio de la heterogeneidad poblacional en los cultivos de mutantes *rpoS* en fase estacionaria. Se podría intentar identificar sub-poblaciones definidas por el nivel de superenrollamiento del plásmido reportero (superenrollado ó relajado). La cinética de superenrollamiento del plásmido de tales sub-poblaciones podría relacionarse con distintas capacidades para restablecer el crecimiento, es decir, con distintos potenciales fisiológicos.

La evaluación de la importancia de Fis para el incremento del superenrollamiento del plásmido en la recuperación del crecimiento bajo las condiciones experimentales empleadas en este laboratorio.





## Referencias

Aiyar, S. E., R. L. Gourse & R. Ross W. **Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase alpha subunit.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, **95** (25): 14652-14657.

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

Ali Azam, T. & A. Ishihama. **Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*: sequence recognition specificity and DNA Binding affinity.** *The Journal of Biological Chemistry* 1999, **274** (46).

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

Altuvia, S., M. Almirón, G. Huisman, R. Kolter & G. Storz. **The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and  $\sigma^S$  in stationary phase.** *Molecular Microbiology* 1994, **13** (2): 264-272.

Amqvist, A., A. Olsen & Normark, S.  **$\sigma^S$ -dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by  $\sigma^{70}$  in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS.** *Molecular Microbiology* 1994, **13**: 1021-1032.

Baird, C. L., T.T. Harkins, S. K. Morris & J. E. Lindsley. **Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96** (24): 13686-13690.

Baquero, M. R., M. Bouzon, J. Varea & F. Moreno. ***sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17.** *Molecular Microbiology* 1995, **18** (2): 301-311.

Balandina, A., L. Claret, R. Hengge-Aronis & J-Rouviere-Yaniv. **The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation.** *Molecular Microbiology* 2001, **39** (4): 1069-1079.

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

Barth, M. C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer & R. Hengge-Aronis. **Role of the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of  $\sigma^S$  and many  $\sigma^S$ -dependent genes in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177** (12): 3455-3464.

Bassler, B. L. **How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing.** *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, **2** (6): 582-587.

Bebbington K. J., H. D. Williams. **A role for DNA supercoiling in the regulation of the cytochrome bd oxidase of *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 3): 591-598.

Becker, G. & R. Hengge-Aronis. **What makes an *Escherichia coli* promoter  $\sigma^S$  dependent? Role of the -13/-14 nucleotide positions and region 2.5 of  $\sigma^S$ .** *Molecular Microbiology* 2001, **39** (5): 1153-1165.

Becker, G., E. Klauck & R. Hengge-Aronis. **The response regulator RssB, a recognition factor for  $\sigma^S$  proteolysis in *Escherichia coli*, can act like an anti- $\sigma^S$  factor.** *Molecular Microbiology* 2000, **35** (3): 657-666.

Becker, G., E. Klauck & R. Hengge-Aronis. **Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**: 6439-6444.

Bohannon, D. E., N. Connel, J. Keener, A. Tormo, M. Espinosa-Urgel, M. Zambrano & R. Kolter. **Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of  $\sigma^{70}$ .** *Journal of Bacteriology* 1991, **173** (14): 4482-4492.

Böhringer, J., D. Fischer, G. Mosler & R. Hengge-Aronis. **UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of  $\sigma^S$  and  $\sigma^S$ -dependent genes in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177** (2): 413-422.

Bouché, S., E. Klauck, D. Fischer, M. Lucassen, K. Jung & R. Hengge-Aronis. **Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process.** *Molecular Microbiology* 1998, **27** (4): 787-795.

Bordes, P., F. Repoili, A. Kolb & C. Gutierrez. **Involvement of differential efficiency of transcription by  $E\sigma^S$  and  $E\sigma^{70}$  RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli osmE* promoter.** *Molecular Microbiology* 2000, **35** (4): 845-853.

Brown, L. & T. Elliot. **Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**: 3763-3770.

Calladine, C. R. & H. R. Drew. **Understanding DNA: The molecule and how it works.** Segunda edición. Academic Press. E.U.A.

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

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

Chuang, S. E., D. L. Daniels & F. R. Blattner. **Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175** (7): 2026-2036.

Chaterji, D. & A. N. Ojha. **Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling.** *Curr. Opin. Microbiol.* 2001, **4**: 160-165.

Chatterji, M. & V. Nagaraja. **Gyrl: a counter defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase.** *EMBO reports* 2002, **31** (3): 261-267.

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

Colland, F., N. Fujita, D. Kotlarz, J. A. Brown, C. F. Meares, A. Ishihama & A. Kolb. **Positioning of  $\sigma^S$ , the stationary phase  $\sigma$  factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes.** *The EMBO Journal* 1999, **18** (14): 4049-4059.

Conter A, C. Menchon, C. Gutierrez. **Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12.** *J. Mol. Biol.* 1997, **273** (1): 75-83.

Couturier, M., El Mustapha Bahassi & L. Van Melderen. **Bacterial death by DNA gyrase poisoning.** *Trends in Microbiology* 1997, **6** (7): 269-275.

Cozzarelli, N. R. & J. C. Wang, **DNA topology and its biological effects.** Cold Spring Harbor Press. 1990. E.U.A.

Dai, X. & L. B. Rothman-Denes. **DNA structure and transcription.** *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, **2**: 126-130.

Deibler, R. W., S. Rahmati & L. Zechiedrich. **Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*.** *Genes & Development* 2001, **15**: 748-761.

Ding, Q., S. Kussano, M. Villarejo & A. Ishihama. **Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strength: Differential recognition of osmoregulated promoters by  $E\sigma^D$  and  $E\sigma^S$  holoenzymes.** *Molecular Microbiology* 1995, **16** (4): 649-656.

Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record, Jr., D. A. Siegele & C. A. Gross. **Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor  $\sigma^{70}$  exhibit specificity of binding to promoter DNA.** *Cell* 1992, **70**: 501-512.

Dove, S. L., S. G. J. Smith & C. J. Dorman. **Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS.** *Mol. Gen. Genet.* 1997, **253** (13): 13-20.

Drlica, K. & C. L. Woldringh. Chromosomal organization. "Nucleoids, chromosomal folding, and DNA topology" en: **Bacterial genomes: Physical structure and analysis.** Bruijn, F. J., J. R. Lupski & G. M. Weinstock (eds). Chapman & Hall 1998. E.U.A.

Ericsson, M., D. Hanstorp, P. Hagberg, J. Enger & T. Nyström. **Sorting out bacterial viability with optical tweezers.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182** (19): 5551-5555.

Espinosa-Urgel, M, C. Chamizo & A. Tormo. **A consensus structure for sigma S-dependent promoters.** *Molecular Microbiology.* 1996, **21** (3): 657-659.

Espinosa-Urgel, M & A. Tormo.  **$\sigma^S$ -dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA**

**regions with intrinsic curvature.** *Nucleic Acids Research* 1993, **21** (16): 3667-3670.

Gentry, D.R., V.J. Hernández, L.H. Nguyen, D.B. Jensen & M. Cashel. **Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175** (24): 7982-7989.

Gibson, K. E. & T. J. Silhavy. **The LysR homolog LrhA promotes RpoS degradation by modulating activity of the response regulator SprE.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181** (2): 563-571.

Gómez-Eichelmann, M.C. & R. Camacho-Carranza. **El nucleóide bacteriano.** *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 1995, **37** (3): 281-290.

Gómez-Eichelmann, M.C. & R. Camacho-Carranza. **El superenrollamiento del DNA y topoisomerasas en *Escherichia coli*.** *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 1995, **37** (3): 291-304.

Gottesman, S. & M. R. Maurizi. **Surviving starvation.** *Science* 2001, **293**: 614-615.

Gottesman, S., W. P. Clark, V. de Crecy-Lagard & M. R. Maurizi. **ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*: Sequence and *in vivo* activities.** *J. Biol. Chem.* 1993, **268** (30): 22618-22626.

Goodrich-Blair, H., M. Uria-Nickelsen & R. Kolter. "Regulation of gene expression in stationary phase" en: **Regulation of gene expression in *Escherichia coli*.** Lin, E.C. & A. S. Lynch (Eds.) R.G. Landes Company & Chapman & Hall 1996. New York.

Hedde, J. G., S. J. Blance, D. B. Zamble, F. Hollfender, D. A. Miller, L. M. Wentzell, C. T. Walsh & A. Maxwell. **The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterization of the mode of inhibition.** *J. Mol. Biol.* 2001, **307** (5): 1223-1234.

Hengge-Aronis, R. "Regulation of gene expression during entry into stationary phase" en: ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, second edition.** Neidhardt, F. C. (ed.) ASM Press. 1996. Washington, D. C.

Hengge-Aronis, R. "The general stress response in *Escherichia coli*" en: Stortz, G. & R. Hengge-Aronis (eds.). 2000. **Bacterial stress responses.** ASM Press, Washington, D.C. E.U.A.

Hengge-Aronis, R. **Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*.** *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, **2**: 148-152.

Hengge-Aronis, R., R. Lange, N. Henneberg, & D. Fischer. **Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175** (1): 259-265.

Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmelé & W. Boos. **Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1991, **173** (24): 7918-7924.

Hernández, V. J. & H. Bremer. ***Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires Spot.** *J. Biol. Chem.* 1991, **266** (9): 5991-5999.

Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May & E. Bremer. **A physio-**

logical role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 1988, **52**: 569-584.

Hiratsu, K., H. Shinigawa & K. Makino. **Mode of promoter recognition by the *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing the  $\sigma^S$  subunit: identification of the recognition sequence of the *fic* promoter.** *Molecular Microbiology* 1995, **18** (5): 841-850.

Huisman, G. W. D. A. Siegele, M. M. Zambrano & R. Kolter. "Morphological and physiological changes during stationary phase" en: ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, second edition.** Neidhardt, F. C. (ed.) ASM Press. 1996. Washington, D. C. pp. 1672-1682.

Huisman, G. W. & R. Kolter. **Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*.** *Science* 1994, **265**: 537-539.

Ishihama, A. **Functional Modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase.** *Annu. Rev. Microbiol* 2000, **54**: 499-518.

Ishihama, A. **Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997, **7**: 582-588.

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

Jensen, P. R. L. Loman, B. Petra, C. van der Weijden & H. V. Westerhoff. **Energy buffering of DNA structure fails when *Escherichia coli* runs out of substrate.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177** (12): 3420-3426.

Jishage, M., K. Kvint, V. Shingler & T. Nyström. **Regulation of  $\sigma$  factor competition by the alarmone ppGpp.** *Genes and Development* 2002, **16**: 1260-1270.

Jishage, M. & A. Ishihama. **A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major  $\sigma$  subunit of RNA polymerase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, **95**: 4953-4958.

Jishage, M. A. Iwwata, S. Ueda & A. Ishihama. **Regulation of RNA polymerase sigma subunit in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**: 5447-51.

Jishage, M. & A. Ishihama. **Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{39}$ .** *Journal of Bacteriology* 1995, **177**: 6832-6835.

Josaitis, C.A., T. Gaal, & R. L. Gourse. **Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, **92**: 1117-1121.

Klauck, E., J. Bohringer & R. Hengge-Aronis. **The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA.** *Molecular Microbiology* 1997, **248**: 629-634.

Kolter, R. **Growth in studying the cessation of growth.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181** (3): 697-699.

Kolter, R., D. A. Siegele & A. Tormo. **The stationary phase of the bacterial cycle.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1993, **47**: 855-74.

Kusano, S. & Ishihama, A. **Stimulatory effect of trehalose on formation and activity of *Escherichia coli* RNA polymerase  $E\sigma^{38}$  holoenzyme.** *Journal of Bacteriology* 1997a, **179** (11): 3649-3654.

Kusano, S. & Ishihama, A. **Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate.** *Genes Cells* 1997b, **2**: 433-41.

Kusano, S., Q. Ding, N. Fujita & A. Ishihama. **Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase  $E\sigma^s$  and  $E\sigma^{38}$  holoenzymes: effect of DNA supercoiling.** *J. Biol. Chem.* 1996, **271** (4): 1998-2004.

Landini, P & S. J. W. Busby. **Expression of the *Escherichia coli* Ada regulon in stationary phase: Evidence for *rpoS*-dependent negative regulation of *alkA* transcription.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181** (21): 6836-6839.

Lange, R., D. Fischer & R. Hengge-Aronis. **Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the  $\sigma^s$  subunit of RNA Polymerase in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177** (16): 4676-4680.

Lange, R. & R. Hengge-Aronis. **The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation.** *Molecular Microbiology* 1994a, **48**: 53-80.

Lange, R. & R. Hengge-Aronis. **The cellular concentration of the  $\sigma^s$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability.** *Genes and Development* 1994b, **8**: 1600-1612.

Lange, R., M. Barth & R. Hengge-Aronis. **Complex transcriptional control of the  $\sigma^s$ -dependent stationary-phase-induced and osmotically regulated *omsY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and Integration Host Factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175** (24): 7910-7917.

Lange, R. & R. Hengge-Aronis. **Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 1991a, **5** (1): 49-59.

Lange, R. & R. Hengge-Aronis. **Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor  $\sigma^s$ .** *Journal of Bacteriology* 1991b, **173** (14): 4474-4481.

Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. **A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expres-**

sion of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology* 1996, **21** (6):1137-1146.

Lease, R.A. & M. Belfort. **A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **18**: 9919-9924.

Lease, R.A., M.E. Cusick & M. Belfort. **Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, **95**: 12456-12461.

Lee, S. J. & J. D. Gralla. **Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides.** *J. Biol. Chem.* 2001, **276** (32): 30064-30071.

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

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

Liu, X, C. Ng & T. Ferenci. **Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182** (15): 4158-4164.

Loewen, P.C., & R. Hengge-Aronis. **The role of the sigma factor  $\sigma^S$  (KatF) in bacterial global regulation.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, **48**: 53-80.

Loewen, P.C., B. Hu, J. Strutinsky & R. Sparling. **Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli* (review article).** *Canadian Journal of Microbiology* 1998, **44**: 707-717.

Loewen, P.C. & R. Hengge-Aronis. **The role of the sigma factor  $\sigma^S$  (KatF) in bacterial global regulation.** *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, **48**: 53-80.

Lonetto, M., M. Gribskov & C. A. Gross. **The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships.** *Journal of Bacteriology* 1992, **174**: 3843-3849.

López-García, P. & P. Forterre. **DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles.** *Bioessays* 2000, **22**: 738-746.

Maniatis, T., E. F. Fritsch & J. Sambrook. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Laboratory Press. 1982. E.U.A.

Massé, E. & M. Drolet. **Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I.** *J. Biol. Chem.* 1999, **274** (23): 16654-16658.

Majdalani, N., S. Chen, J. Murrow, K. St. John & S. Gottesman. **Regulation of RpoS by a novel small RNA: The characterization of RprA.** *Molecular Microbiology* 2001, **39** (5): 1382-1394.

Majdalani, N., C. Cuning, D. Sledjeski, T. Elliot & S. Gottesman. **DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanisms, independent of its action as an antisilencer of transcription.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, **95**: 124622-12467.



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

Makinoshima, H., A. Nishimura & A. Ishihama. **Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase.** *Molecular Microbiology* 2002, **43** (2): 269-279.

Maxwell, A. **DNA gyrase as a drug target.** *Biochemical Society Transactions* 1999, **27** (2): 48-53

McCann, M. P., C. D. Fraley & A. Matin. **The putative  $\sigma$  factor KatF is regulated posttranscriptionally during carbon starvation.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175** (7): 2143-2149.

McCann, M.P., J. P. Kidwell & A. Matin. **The putative  $\sigma$  factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1991, **173**: 4188-4194.

Menzel, R. & M. Gellert. **Fusions of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* control regions to the galaktokinase gene are inducible by coumestrol treatment.** *Journal of Bacteriology* 1987, **169** (3): 1272-1278.

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

Muckopadhyay, S., J. P. Audia, R. N. Roy & H. E. Schellhorn. **Transcriptional induction of the alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator.** *Molecular Microbiology* 2000, **37** (2): 371-381.

Muffler, A., D. D. Traulsen, D. Fischer, R. Lange & R. Hengge-Aronis. **The RNA-binding protein HF-1 plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1997a, **179** (1): 297-300.

Muffler, A. M. Barth, C. Marschall & R. Hengge-Aronis. **Heat shock regulation of  $\sigma^S$  turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by  $\sigma^S$  and  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1997b, **179** (2): 445-452.

Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange & R. Hengge-Aronis. **Posttranscriptional osmotic regulation of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1996a, **179** (6): 1607-1613.

Muffler, A., D. Fischer, S. Altuvia, G. Storz & R. Hengge-Aronis. **The response regulator RssB controls stability of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*.** *The EMBO Journal* 1996b, **15** (6): 1333-1339.

Mulvey, M. R. & P. C. Loewen. **Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests *katF* protein is a novel  $\sigma$  transcription factor.** *Nucleic Acids Research* 1989, **17** (23): 9979-9991.

Mukhopadhyay, S., J. P. Audia, R. N. Roy & H. E. Schellhorn. **Transcriptional induction of the conserved alternative factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator.** *Molecular Microbiology* 2000, **37** (2): 371-381.

Nakanishi, A., T. Oshida, T. Matsushita, S. Imajoh-Ohmi & T. Ohnuki. **Identification of DNA gyrase inhibitor (Gyrl) in *Escherichia coli*.** *J. of Biol. Chem.* 1998, **273** (4): 1933-1938.

Nakanishi, A., T. , S. Imajoh-Ohmi & F. Hanaoka. **Characterization of the interaction between DNA gyrase inhibitor and DNA gyrase of *Escherichia coli*.** *J. Biol. Chem.* 2002, **277** (11): 8949-8954.

Notley-McRobb, L., T. King & T. Ferency. **rpoS mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* as a consequence of conflict between competing stress responses.** *Journal of Bacteriology* 2002, **184** (3): 806-811.

Notley-McRobb, L. & T. Ferency. **Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces stationary phase in *Escherichia coli*?** *Journal of Bacteriology* 1996, **178** (5): 1465-1468.

Nyström, T. **The trials and tribulations of growth arrest.** *Trends in Microbiology* 1995, **3** (4): 131-136.

Nyström, T. & F. C. & Neidhardt. **Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest.** *Molecular Microbiology* 1994, **11** (3):537-44.

O'Neal, C. R., W. M. Gabriel, A. K. Turk, S. J. Libby, F. C. Fang & M. P. Spector. **RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon, and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176** (15): 4610-4616.

Pettijohn, D. E. 'The Nucleoid' en: ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, second edition.** Neidhardt, F. C. (Ed.) ASM Press. 1996. Washington, D. C.

Pettijohn, D. E. **Histone-like proteins and bacterial chromosome structure.** *J. Biol. Chem.* 1988, **263** (26): 12793-12796.

Pratt, L.A., & T. J. Silhavy. **Cri stimulates RpoS activity during stationary phase.** *Molecular Microbiology* 1998, **29** (5): 1225-1236.

Pratt, L.A. & T.J. Silhavy. **The response regulator SprE controls the stability of RpoS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **98**: 2488-2492.

Qi, H., R. Menzel & Y. C. Tse-Dinh. **Regulation of *Escherichia coli* topA gene transcription: involvement of a sigmaS-dependent promoter.** *J. Mol. Biol.* 1997, **267** (3): 481-489.

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

Jensen, P. R., L. Loman, B. Petra, C. van der Weijden & H. V. Westerhoff. **Energy buffering of**

**DNA structure fails when *Escherichia coli* runs out of substrate.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177** (12): 3420-3426.

Reyes-Domínguez, Y. **El superenrollamiento del DNA en la fase estacionaria de *Escherichia coli* K-12.** Tesis de licenciatura.

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

Rothfield, L. I. & J. Garcia-Lara. "Cell division" en: **Regulation of gene expression in *Escherichia coli*.** Lin, E.C. & A. S. Lynch (Eds.) R.G. Landes Company & Chapman & Hall 1996. New York.

Rockabrand, D., K. Livers, T. Austin, R. Kaiser, D. Jensen, R. Burgess & P. Blum. **Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180** (4): 846-854.

Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. E.U.A.

Shiba, T., K. Tsutsumi, H. Yano, Y. Ihara, A. Kameda, K. Tanaka, H. Takahashi, M. Munekata, N.N. Rao & A. Komberg. **Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, **94**: 11210-11215.

Schellhom, H.E., J.P. Audia, L.I.C. Wei & L. Chang. **Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180** (23): 6283-6291.

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

Schneider, R., A. Travers, T. Kutateladze & G. Muskhelishvili. **A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 1999, **34** (5): 953-964.

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

Schweder, T., K. Lee, O. Lomovskaya & A. Matin. **Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor ( $\sigma^S$ ) by ClpXP protease.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178** (2): 470-476.

Sledjeski, D. D., C. Whitman & A. Zhang. **Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA *DsrA*.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183** (6): 1997-2005.

Sledjeski, D. D., A. Gupta & S. Gottesman. **The small RNA, *DsrA*, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*.** *Embo Journal* 1996, **15**: 3993-4000.

Sledjeski, D. D. & S. Gottesman. **A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcaA***

**gene in *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, **92**: 2003-2007.

Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, & J. L. Slonczewski. **Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of *rpoS* and growth pH.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176** (6): 1729-1737.

Takanayagi, Y. K. Tanaka & H. Takahashi. **Structure of the 5' upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*.** *Mol. Gen. Genet* 1994, **243**: 525-531.

Tanaka, K., S. Kusano, N. Fujita, A. Ishihama & H. Takahashi. **Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{38}$  (the *rpoS* gene product).** *Nucleic Acids Research* 1995, **23** (5): 827-834.

Tanaka, K., Y. Takanayagi, N. Fujita, A. Ishihama & H. Takahashi. **Heterogeneity of the principal  $\sigma$  factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product,  $\sigma^{38}$ , is a second principal  $\sigma$  factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**: 3511-3515.

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

Tse-Dinh, Y., H. Qi & R. Menzel. **DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance.** *Trends in Microbiology* 1997, **5** (8): 323-326.

Tse-Dinh, Y. & R. Beran. **Multiple promoters for transcription of the *E. coli* DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling.** *J. Mol. Biol.* 1988, **202**: 735-742.

Tsui, H. T., G. Feng & M. E. Winkler. **Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12.** *Journal of Bacteriology* 1997, **179** (23): 7476-7487.

Tupper, A. E., T. A. Owen-Hughes, D. W. Ussery, D. S. Santos, D. J. P. Ferguson, J. M. Sidebotham, J. C. D. Hinton & C. F. Higgins. **The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*.** *EMBO Journal* 1994 **13** (1): 258-268.

Ueguchi, C., N. Misonou & T. Mizuno. **Negative control of *rpoS* expression by phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183** (2): 520-527.

Ueguchi, C., M. Kakeda, H. Yamada, & T. Mizuno. **An analogue of the DnaJ molecular chaperone in *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, **91**: 1054-1058.

Utsumi, R., S. Kusafuka, T. Nakayama, K. Tanaka, Y. Takayanagi, H. Takahashi, M. Noda & M. Kawamukai. **Stationary phase-specific expression of the *fic* gene in *Escherichia coli* K-12 is controlled by the *rpoS* gene product ( $\sigma^S$ ).** *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, **113**: 273-278.

Uzan, M. & A. Danchin. **A rapid test for the RelA mutation in *E. coli*.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1976, **69** (3): 751-758.

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

Webb, C., M. Moreno, M. Wilmes-Riesenberg, R. Curtiss III & J. W. Foster. **Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium***. *Molecular Microbiology* 1999, **34** (1): 112-123.

Weichart, D., R. Lange, N. Henneberg & R. Hengge-Aronis. **Identification and characterization of stationary-phase inducible genes in *Escherichia coli***. *Molecular Microbiology* 1993, **10** (2): 407-420.

Westerhoff, H. V., M. H. O'Dea, A. Maxwell & M. Gellert. **DNA supercoiling by DNA gyrase**. *Cell Biophysics* 1988, **12**: 157-181.

Wise, A., R. Brems, V. Ramakrishnan & M. Villarejo. **Sequence in the -35 region of *Escherichia coli* rpoS-dependent gene promote transcription by E $\sigma^S$** . *Journal of Bacteriology* 1996, **178** (10): 2785-2793.

Wolf S. G., D. Frenkiel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter & A. Minsky. **DNA protection by stress-induced biocrystallization**. *Nature* 1999, **400**: 83-85.

Van Workum, M., S. J. M. van Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P. R. Jensen, J. L. Snoep & H. V. Westerhoff. **DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli***. *Molecular Microbiology* 1996, **20** (2): 351-360.

Yamashino, T., C. Ueguchi & T. Mizuno. **Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor,  $\sigma^S$ , in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS**. *EMBO Journal* 1995, **14** (3): 594-602.

Yamashino, T., M. Kakeda, C. Ueguchi & T. Mizuno. **Al analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by  $\sigma^S$  during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli***. *Molecular Microbiology* 1994, **13** (3): 475-483.

Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori & T. Yura. **Heat induction of  $\sigma^{32}$  synthesis mediated by mRNA secondary structure: A primary step of the heat shock response in *Escherichia coli***. *Nucleic Acid Research* 1993, **21**: 5449-5455.

Zamble, D. B., D. A. Miller, J. G. Heddle, A. Maxwell, C. T. Walsh & F. Hollfelder. **In vitro characterization of DNA gyrase inhibition by microcin B17 analogs with altered bisheterocyclic sites**. *Proc. Anat. Acad. Sci. USA*, 2001. **98** (14): 7712-7717.

Zambrano, M. M. & R. Kolter. **GASping for life in stationary phase**. *Cell* 1996, **86**: 181-184.

Zechiedrich, L., Khodursky, A. B. & N. R. Cozzarelli. **Topoisomerase IV, not gyrase, decatenate products of site-specific recombination in *Escherichia coli***. *Genes & Development* 1997, **11**: 2580-2592.

Zechiedrich, E. L., A. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. Lilley & N. Cozzarelli. **Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* 2000, **275** (11): 8103-8113.

Zgurskaya, H. I., M. Keyhan & A. Matin. **The  $\sigma^S$  level in starving *Escherichia coli* cells increases**

**solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis.** *Molecular Microbiology* 1997, **24** (3): 643-651.

Zhang, A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis & G. Storz. **The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation by binding Hfq (HF-1) protein.** *EMBO Journal* 1998, **17**: 6061-6068.

Zhang, A., S. Rimsky, M. E. Reaban, H. Buc & M. Belfort. ***Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics.** *EMBO Journal* 1996, **15** (6): 1340-1349.

Zhou, Y., S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi & S. Wickner. **The RssB response regulator directly targets  $\sigma^S$  for degradation by ClpXP.** *Genes & Development* 2001, **15**: 627-637.

Zhou, Y. & S. Gottesman. **Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180** (5): 1154-1158.