



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE *gyrI* (sbmC) DURANTE LA RESPUESTA
SOS Y LA FASE ESTACIONARIA EN *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 :

CARLOS MAURICIO BELMAN RAMOS

TUTORA:

DRA. MARÍA DEL CARMEN DEL SOCORRO GÓMEZ
EICHELMANN

2008





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA GENERAL
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente.

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**EVALUACIÓN DE gyrI (sbmC) DURANTE LA RESPUESTA SOS Y LA FASE ESTACIONARIA EN
*Escherichia coli***

realizado por **Belman Ramos Carlos Mauricio**, con número de cuenta **0-9808678-0** quien opta por titularse en la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr.	René de Jesús Cárdenas Vázquez	
Propietario	Dr.	Jesús Ramírez Santos	
Propietario Tutor(a)	Dra.	María del Carmen del Socorro Gómez Eichelmann	
Suplente	Dra.	América Nitxín Castañeda Sortibrán	
Suplente	Dra.	Blanca Estela Hernández Baños	

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 31 de marzo de 2008
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*cigs

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	Belman Ramos Carlos Mauricio 53995490 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad De Ciencias Biología 098086780
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Doctora María del Carmen del Socorro Gómez Eichelmann
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Doctor René de Jesús Cárdenas Vázquez
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Doctor Jesús Ramírez Santos
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Doctora América Nitxin Castañeda Sortibrán
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Doctora Blanca Estela Hernández Baños
7. Datos del trabajo escrito. Título Número de páginas Año	EVALUACIÓN DE gyrI (sbmC) DURANTE LA RESPUESTA SOS Y LA FASE ESTACIONARIA EN <i>Escherichia coli</i> 67 p 2008

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento para la **Dra. María del Carmen del Socorro Gómez Eichelmann** y para el **Dr. Jesús Ramírez Santos**, por la confianza que me depositaron, por todo el valioso tiempo que invirtieron en mi formación profesional y personal; por cada uno de sus comentarios, críticas y consejos, que me guiaron día a día para materializar mi sueño.

También quisiera agradecer a mis sinodales:

**Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán y
Dra. Blanca Estela Hernández Baños**

los cuales con sus sugerencias y objetivos comentarios enriquecieron este trabajo.

De igual forma quisiera expresar mi más grande agradecimiento a la **Dra. Laura Camarena** y al **Dr. Sebastián Poggio**, por permitirme usar su equipo óptico (microscopio y hardware y software asociado) para la visualización y captura de las células bacterianas. Así mismo agradezco al **Sr. Miguel Páez** por su enorme colaboración en la preparación de los medios de cultivo y otras soluciones, lo cual me ahorró muy valioso tiempo, mismo que pude invertir en otras actividades.

Por último, quisiera expresar mi gratitud a la beca anual (enero-diciembre 2007) que gocé durante mi estancia en el laboratorio de Carmen Gómez, como parte del Donativo **DGAPA PAPIIT IN214807**, pues gracias a ese apoyo económico mi vida resultó un poco más desahogada.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Sin lugar a dudas es a mi madre, la **Sra. Margarita Ramos**, a quien debo principalmente este logro.

¡LO LOGRAMOS MAMÁ!

También quiero dedicar este trabajo a todas y cada una de las personas que a continuación menciono:

Familia: Cynthia Isela Belman Ramos (hermana), Sergio Luz Marín (cuñado) y al latoso Luis Enrique Luz Belman (sobrino).

Amigos: Odette Charabati, Paz Misrahi, Moisés Martínez Ayala y a su familia, Javier Guzmán “logan”, Mónica Martínez Hernández y su gemela Marta Martínez Hernández, Sergio Alberto Gómez, Job Salinas Garduño, Fausto Gómez Morales, José Rómulo Sosa Ortíz, Minerva Galván Delgado, Zacil Ha Vilchis Zapata, Alfonso Díaz, Álvaro Jiménez Blandó, Isaí Morales Medina, Manuel Gallego, Guadalupe Bravo, Claudia Sánchez Ahumada, Laura López González, Norma Araceli, Lucero Margarita, Itzel Sigala, Érika Juárez, Sr. Salvador “tío chava” y a mis compañeros de ALDO.

Profesores: Mario Grajeda, Vicente Turrubiarte, Esperanza Landeros y Rafael Báez.

... y a tantas otras personas que me faltó mencionar y que ya no caben en estas líneas. A todos ustedes, gracias por haber estado en los momentos más difíciles y seguir confiando en mí.

Toda nuestra ciencia
comparada con la realidad
es primitiva e infantil...
y sin embargo
es lo más preciado que tenemos.

Albert Einstein

(1879-1955)

EVALUACIÓN DE *gyrI* (*sbmC*) DURANTE LA RESPUESTA SOS Y LA FASE ESTACIONARIA EN *Escherichia coli*

ÍNDICE:

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
2.1 Las DNA topoisomerasas y el superenrollamiento del DNA.....	6
2.1.1 Las DNA topoisomerasas clase 1 (Top I y Top III) y clase 2 (Top II o girasa y Top IV) de <i>E. coli</i>	7
2.2 Inhibidores de girasa. No protéicos: quinolonas, cumarinas y otros. Protéicos: proteínas codificadas en plásmidos o en el cromosoma.....	9
2.2.1 Quinolonas, cumarinas y otros.....	9
2.2.2 Proteínas plasmídicas (Microcin B17, CcdB y Qnr) y proteínas cromosomales (MfpA y GyrI).....	11
2.3 La proteína GyrI.....	12
2.3.1 Características de GyrI.....	12
2.3.2 Regulación de la expresión genética de <i>gyrI</i> (<i>sbmC</i>).....	12
2.4 La respuesta SOS en <i>E. coli</i>	14
2.4.1 Mecanismo de inducción de la respuesta SOS.....	14
2.5 La fase estacionaria (FS) en <i>E. coli</i>	17
2.5.1 Cambios a nivel de transcripción y traducción.....	18
2.5.2 Cambios morfológicos, de membrana citoplásmica y de pared celular....	19
2.5.3 Cambios en el nucleóide y el metabolismo del DNA.....	19
3. Justificación.....	21
4. Objetivo.....	22
4.1 Objetivos particulares.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Materiales y métodos.....	24
6.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	24
6.2 Preparación de soluciones concentradas de ácido nalidíxico (NAL) y de mitomicina C (MMC).....	24

6.3	Medio de cultivo y condiciones de los cultivos bacterianos.....	24
6.4	Observación de las células bacterianas al microscopio de luz.....	25
6.5	Determinación del porcentaje y magnitud de filamentación.....	25
6.6	Determinación del número de células vivas o cuentas viables.....	25
6.7	Purificación del DNA bacteriano y amplificación de un fragmento del gen <i>gyrI</i> mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).....	26
6.8	Separación de los fragmentos de DNA de <i>gyrI</i> obtenidos por amplificación por PCR.....	27
7.	Resultados.....	28
7.1.	Verificación de los fenotipos Kan ^R o Kan ^S y del genotipo <i>gyrI</i> silvestre y <i>sbmC::Tn5kan^R (gyrI)</i> en las cepas MG1655 y FB20566 de <i>E. coli</i>	28
7.2.	Evaluación de la función protectora de Gyrl durante la respuesta SOS en células en fase exponencial de crecimiento.....	29
7.2.1	Establecimiento de las condiciones experimentales de la respuesta SOS inducida por NAL y MMC para la adecuada observación de filamentos celulares.....	33
7.2.2	Efecto de NAL y MMC en la filamentación de células silvestres y <i>gyrI</i> de fase exponencial.....	39
7.2.3	Efecto de NAL y MMC en la sobrevida de células silvestres y <i>gyrI</i> de fase exponencial.....	39
7.3.	Estudio de la función protectora de Gyrl contra agentes que dañan el DNA, NAL y MMC, en células de fase estacionaria temprana.....	42
7.3.1	Efecto de dosis 1X y 5X de NAL y MMC en la filamentación de células silvestres y <i>gyrI</i> de fase estacionaria temprana.....	42
7.3.2	Efecto de NAL y MMC en la sobrevida de células silvestres y <i>gyrI</i> de fase estacionaria.....	43
8.	Discusión.....	47
9.	Conclusiones.....	52
10.	Perspectivas.....	53
11.	Referencias.....	54
12.	Anexo.....	60

1. RESUMEN

Girasa es una enzima esencial para la viabilidad bacteriana, ya que su actividad es importante para mantener un nivel de superenrollamiento del DNA que permite la replicación, reparación, recombinación y transcripción en esta molécula. Su ciclo catalítico implica un equilibrio entre cortes y religamientos del DNA, en forma dependiente de ATP. Girasa es blanco de antibióticos como las quinolonas y proteínas de plásmidos como CcdB y MccB17, que interrumpen su ciclo catalítico después de que corta las dos hebras del DNA impidiendo que la enzima lo religue. Este daño en el DNA induce la respuesta celular SOS.

En *E. coli*, la proteína cromosomal inhibidora de girasa Gyrl, codificada por *gyrl* (*sbmC*), incrementa su cantidad durante la respuesta SOS y al inicio de la fase estacionaria (FS). Experimentos *in vivo* e *in vitro* demuestran que la sobreproducción de Gyrl en fase exponencial de crecimiento (FE) protege contra el daño que inducen los inhibidores de girasa MccB17 y quinolonas, o agentes que dañan el DNA como mitomicina C (MMC), un agente alquilante e intercalante. La protección se expresa como una disminución de daño al DNA y mayor sobrevivencia, sin embargo, la función biológica de Gyrl a concentraciones fisiológicas durante la respuesta SOS o a la entrada a la FS, se desconoce.

La filamentación celular es una alteración morfológica resultado de la expresión del gen de SOS *sulA*. A mayor daño en el DNA, es mayor la expresión de *sulA* y la filamentación. En este trabajo se evaluó el posible papel protector de Gyrl contra el daño en el DNA durante la respuesta SOS inducida por el ácido nalidíxico (NAL), una quinolona, y por MMC. Este posible papel protector se evaluó en células en FE y en FS temprana expuestas a estos compuestos. Para ello se midieron los parámetros de porcentaje de filamentación celular y la viabilidad de células *gyrl*⁺ y *gyrl*⁻.

Los resultados de viabilidad de células *gyrl*⁺ o *gyrl*⁻ en FS o FE expuestas a NAL o MMC no mostraron diferencias significativas. Por otra parte, la filamentación porcentaje de células filamentadas por exposición a NAL en FE fue 5.84% mayor en la cepa *gyrl*⁻. Por el contrario, con la exposición a MMC la cepa *gyrl*⁺ presentó 14% más filamentación que la cepa *gyrl*⁻. Los resultados obtenidos en este trabajo, permiten descartar a Gyrl como un protector importante en estas

condiciones fisiológicas y sugieren que dicha proteína carece de una función protectora global.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 LAS DNA TOPOISOMERASAS Y EL SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA

Aun cuando el cromosoma de *Escherichia coli* es una molécula de DNA de doble hebra, de tan sólo 1.5 mm de longitud (Holmes y Cozzarelli, 2000), el diminuto tamaño de esta bacteria (aproximadamente 1,000 veces menor), supondría un verdadero problema de espacio al momento de albergar a aquella molécula. No obstante, al microscopio electrónico, el cromosoma de *E. coli* aparece altamente condensado en un cuerpo de un tamaño cercano a 1 μm (Holmes y Cozzarelli, 2000), llamado nucleoide bacteriano, en el cual el DNA se hace acompañar de RNA, proteínas estructurales (tipo histona), proteínas reguladoras y polimerasas de DNA y RNA (Stonington y Pettijohn, 1971). En esta conformación altamente compactada, se dice que el DNA está superenrollado (Worcel y Burgi, 1971).

El superenrollamiento del DNA puede ser toroidal, cuando el DNA gira en torno a un cuerpo cilíndrico (tal es el caso de las histonas en eucariontes), o plectonómico, cuando la doble hebra de DNA gira sobre sí misma, generando hélices en el espacio (Gómez y Camacho, 1995). Las proteínas responsables de modular homeostáticamente el superenrollamiento son las DNA topoisomerasas (Menzel y Gellert, 1983; Champoux, 2001), enzimas que toman su nombre de su capacidad de llevar a cabo interconversiones entre isómeros topológicos de moléculas circulares de DNA (Menzel y Gellert, 1983; Champoux, 2001). La actividad de estas enzimas resulta esencial en la viabilidad de todas las células (Krauzwer y Cozzarelli, 1979). De hecho, son imprescindibles en el metabolismo del DNA, principalmente durante la transcripción y replicación del genoma, así como al final de ésta, en la segregación de cromosomas. Además de proporcionar una condición energética favorable a este metabolismo, el grado de superenrollamiento tiene un papel importante en la regulación de la expresión de muchos genes y en la respuesta celular a diferentes condiciones de estrés (López Sánchez *et al.* 1997, Peter *et al.* 2004). En *E. coli* la regulación celular del grado de superenrollamiento del DNA parece ser un mecanismo homeostático que depende principalmente del balance entre las actividades de topoisomerasa I (Top I) y topoisomerasa II o girasa (Top II).

La importancia de las DNA topoisomerasas queda de manifiesto por su ubicuidad, ya que se han descrito en los tres dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*) e incluso algunos virus contienen genes para estas enzimas (Forterre *et al.*, 2007). Las topoisomerasas se clasifican como de clase 1 o de clase 2, encontrándose varias familias y subfamilias de ellas: 1A, 1B, 1C, 2A, y 2B, (Forterre *et al.*, 2007). Las dos clases se diferencian, entre otros aspectos, en función

de cuantas hebras de DNA cortan, cómo pasan las mismas a través del corte y si requieren o no de ATP. De este modo, se tiene que las topoisomerasas clase 1 cortan una hebra y pasan la otra a través del corte antes de ser religado; además no requieren de ATP. Por su parte, las topoisomerasas clase 2 cortan dos hebras y pasan otras dos hebras de la misma molécula, o incluso de otra molécula de DNA (Champoux, 2001), a través del corte antes de resellarlo; además requieren de ATP (Corbett y Berger, 2004).

2.1.1 Las DNA topoisomerasas clase 1 (Top I y Top III) y clase 2 (Top II o girasa y Top IV) de *E. coli*

En *E. coli* se han identificado cuatro DNA topoisomerasas, dos de clase 1 (Top I y Top III) y dos de clase 2 (Top II y Top IV) (Wang, 1991; Corbett y Berger, 2004). En 1971, en extractos celulares de *E. coli*, se descubrió la primera DNA topoisomerasa con la capacidad de relajar DNA superenrollado negativamente (Wang, 1971). Esta enzima corresponde a la topoisomerasa I o Top I. Por otra parte, está la topoisomerasa III, que presenta una actividad similar a la Top I, es decir, corta una hebra de DNA y relaja moléculas superenrolladas negativamente, sin embargo, se diferencia de aquella en que requiere potasio y magnesio, corta en sitios diferentes y funciona mejor a altas temperaturas (Digate, 1989).

La primera topoisomerasa clase 2 en *E. coli* se descubrió 5 años después de Top I (Gellert *et al.*, 1976a). Esta enzima, también conocida como girasa, está presente en todas las bacterias y endosimbiontes de posible origen bacteriano de eucariontes (Wall, 2004), y se caracteriza por la propiedad única de catalizar, en forma dependiente de ATP, el superenrollamiento negativo del DNA (Gellert *et al.*, 1976a). La girasa es una enzima heterotetramérica, compuesta de dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB), con un peso aproximado de 97 y 90 kDa, respectivamente (Mizzuchi *et al.*, 1978). El mecanismo involucrado en el ciclo de reacción de superenrollamiento se conoce con cierto detalle (Reece y Maxwell, 1991) y se muestra en la Figura 1. El ciclo comienza cuando girasa (en su forma heterotetramérica funcional) une los dominios C-terminal de las subunidades GyrA a un segmento de DNA de aproximadamente 120 pares de bases (pb), quedando rodeada en éste, lo cual genera un superenrollamiento toroidal positivo. Posteriormente, la tirosina 122 (perteneciente al dominio N-terminal de GyrA) cataliza un corte de doble hebra en aquel segmento que rodea a girasa (segmento G)¹ y se une covalentemente a los extremos 5' de este segmento (Sugino *et al.*, 1980), generando un

¹ G del inglés “gate”

complejo transitorio “cortado” DNA-girasa. A continuación, el ATP se une a las subunidades GyrB (que poseen actividad ATPasa), generando cambios conformacionales que permiten la captura del segmento no cortado (segmento T)² y su paso a través del segmento G y del dímero de subunidades GyrA (Kampranis *et al.*, 1999), evento también conocido como translocación. Finalmente, el segmento G es religado y el T es liberado del complejo DNA-girasa, utilizando para ello una apertura transitoria entre el dímero de las subunidades GyrA. La tensión estructural generada por el superenrollamiento toroidal positivo se compensa por un giro negativo de la molécula al cual se suma otra supervuelta negativa tras el evento de translocación, teniendo un efecto neto de dos supervueltas negativas por cada ciclo catalítico. Este ciclo catalítico lleva implícito un equilibrio entre la reacción de corte y religación del DNA, evitando de este modo la acumulación de DNA con cortes (Reece y Maxwell, 1991).

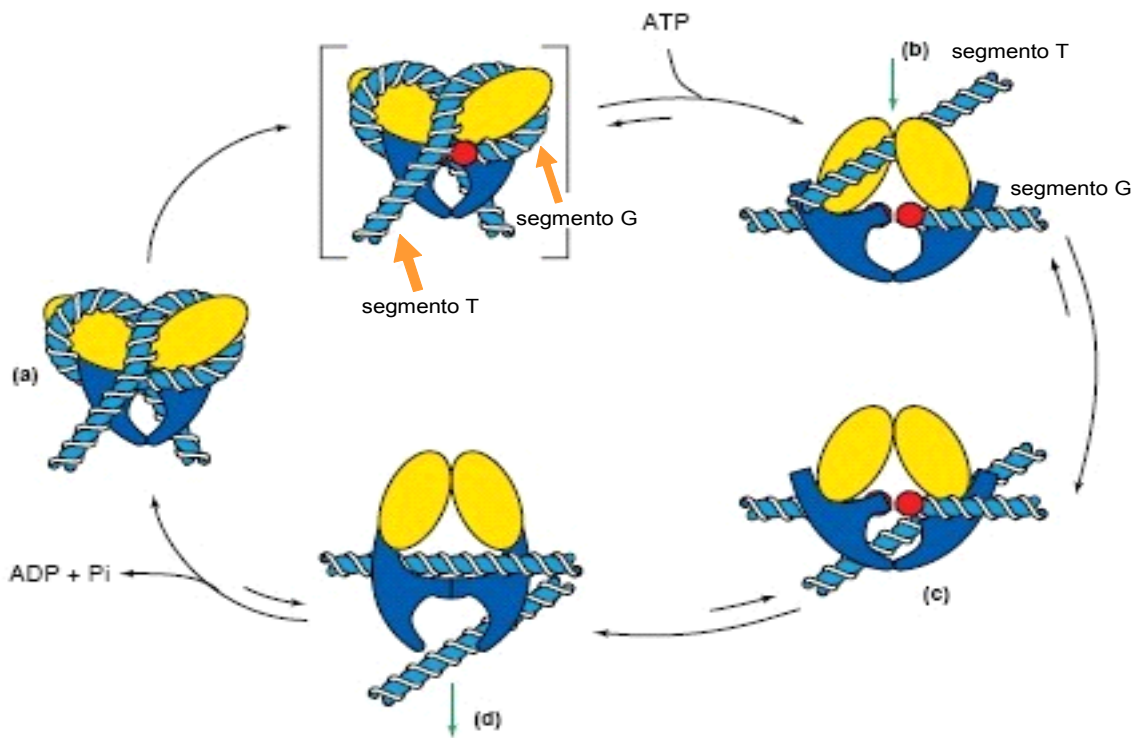


Figura 1. Mecanismo de acción de la proteína girasa de *E. coli* (para los detalles leer el texto). Tomado de Couturier *et al.*, 1998.

Además de girasa, *E. coli* cuenta con otra topoisomerasa clase 2 conocida como Top IV, que al igual que aquella, resulta esencial para la viabilidad celular (Kato *et al.*, 1990). Top IV es también heterotetramérica, homóloga a Top II y está formada por dos proteínas ParE y dos ParC. La secuencia de aminoácidos de ParC es similar a GyrA y la de ParE a GyrB (Corbett y Berger,

² T del inglés *transport*

2004). Top IV corta DNA de doble hebra y requiere ATP (Jun-Ichi *et al.*, 1992); sin embargo, no es del tipo “girasa” (esto es, no superenrolla el DNA). Su función principal es decatenar los cromosomas al final de la replicación, y en menor grado, colaborar con girasa y Top I a ajustar el nivel de superenrollamiento del DNA en la célula, mediante su actividad de relajación del DNA superenrollado (Zechiedrich *et al.*, 2000).

2.2 INHIBIDORES DE GIRASA. NO PROTEICOS: QUINOLONAS, CUMARINAS Y OTROS. PROTEÍCOS: PROTEÍNAS CODIFICADAS EN PLÁSMIDOS O EN EL CROMOSOMA

Ya que girasa es una enzima esencial en la viabilidad de las bacterias, es blanco de algunos agentes antibióticos y otras sustancias de origen natural o sintético. De hecho, los complejos eventos que involucra la reacción de superenrollamiento del DNA, ofrecen múltiples oportunidades para el desarrollo de inhibidores de esta enzima. Así, se han podido caracterizar varias clases de ellos, aunque las quinolonas y las cumarinas son las más estudiadas (Maxwell, 1997; Couturier *et al.*, 1998).

2.2.1 Quinolonas, cumarinas y otros

Las quinolonas, sintetizadas por primera vez en 1962, se caracterizan en su estructura química por la presencia de un anillo de 4-quinolona. Estas sustancias demostraron rápidamente su efecto selectivamente inhibitorio de la síntesis de DNA en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Boyle, 1968). Las quinolonas, ejemplificadas por el ácido nalidíxico (NAL) y la ciprofloxacina (CFX), se han distinguido por sus excelentes propiedades antibacterianas (Maxwell, 1992), entre las cuales destaca su amplio espectro (eficaz contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus sp.*, *Neisseria sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*) y su baja toxicidad a las células eucariontes (Couturier *et al.*, 1998).

El blanco sobre el cual actúan las quinolonas son las topoisomerasas tipo II (girasa y Top IV), siendo la primera el principal blanco. La interacción entre las quinolonas y la girasa, altera el equilibrio entre los eventos de corte y religamiento llevados a cabo por GyrA, lo cual lleva a la estabilización de los complejos cortados DNA-girasa (Snyder y Drlica, 1979). La girasa inhibida por las quinolonas, se convierte así en un agente inductor de lesiones cromosomales, evidenciadas por la libre rotación del DNA en presencia de bromuro de etidio, característica del DNA con cortes de doble hebra (Chen *et al.*, 1996). La bacteriostasis es una de las primeras consecuencias del daño (Drlica y Zhao, 1997), seguido de horquillas de replicación o

transcripción colapsadas por la colisión de las polimerasas de DNA y RNA con los complejos cortados DNA-girasa (Willmott, 1994; Drlica, 2003). Esta serie de eventos a nivel molecular es, para algunos, suficiente para explicar el poder bactericida de las quinolonas (Drlica y Zhao, 1997). No obstante, recientemente se ha sugerido que la inhibición de girasa puede generar algunas especies de radicales oxidativos (“*reactive oxygen species*” o ROS), los cuales pueden contribuir a la muerte celular (Dwyer *et al.*, 2007).

El grupo de antibióticos conocido como cumarinas lo integran productos tales como la cumermicina A₁ y la novobiocina, sintetizados por el género bacteriano *Streptomyces* (Wang, 2000). Estas sustancias interfieren con la síntesis bacteriana de ácidos nucleicos (Maxwell, 1993), al inhibir la actividad de girasa de superenrollamiento del DNA; específicamente, obstruyendo en forma competitiva la unión de ATP a la subunidad GyrB de la enzima. No obstante estas características, carecen de la importancia clínica de las quinolonas, debido a su baja efectividad contra bacterias gram⁻, toxicidad a las células eucariontes y baja solubilidad en agua (Maxwell, 1997).

Además de las cumarinas y las quinolonas, existen otros compuestos que también inhiben a la girasa. Entre ellos están: albicidina, ciclotialidina y cinodina. Las albicidinas son compuestos peptídicos policétidos, producidos mediante una vía no ribosomal por el fitopatógeno *Xanthomonas albilineans*. Las albicidinas son fitotoxinas con un alto potencial antibiótico (mayor que el de las quinolonas) debido a su gran capacidad de inhibir la replicación bacteriana (Hashimi *et al.*, 2007) al presentar un mecanismo de acción similar a aquel descrito anteriormente para las quinolonas (Pierrot, 2003; Drlica, 2003); esto es, atrapar a la girasa en un complejo abortivo cortado DNA-girasa.

La ciclotiadilina y la cinodina, son antibióticos eficaces contra *E. coli*, producidos por *Streptomyces filipinensis* y *Nocardia sp.*, respectivamente. El primero de ellos, es un péptido cíclico que ha demostrado su poder bactericida al inhibir la actividad de superenrollamiento de girasa, sin embargo no actúa en forma análoga a las quinolonas, sino de una forma un tanto similar al modo de acción de las cumarinas, es decir, inhibiendo la actividad ATP-asa de GyrB (Nakada *et al.*, 1995). El segundo es un agente antibiótico de amplio espectro de la clase glicocinamoilespermidina (Greenstein *et al.* 1981), capaz de inhibir la actividad de girasa *in vitro* y con ello la síntesis bacteriana de DNA (Osburne *et al.* 1990).

2.2.2 Proteínas plasmídicas (Microcina B17, CcdB Y Qnr) y proteínas cromosomales

(MfpA y Gyrl).

Además de los inhibidores ya descritos, girasa es blanco de varias proteínas, unas codificadas en plásmidos, como son microcina B17 (MccB17), CcdB, MfpA y Qnr; y Gyrl codificada en el cromosoma bacteriano.

MccB17 es un péptido de 43 aminoácidos con propiedades antibióticas, rico en glicina, con un peso aproximado de 3.2 kDa y cuya producción y modificación postraduccional depende de un operón de 7 genes (*mcbABCDEFG*) localizados en el plásmido pMccB17 y similares (San Millán, 1985). MccB17 se sintetiza a partir de *mcbA*, siendo posteriormente objeto de una gran modificación postraduccional por parte de *mcbBCD* (Yorgey, 1993). Posterior a estas modificaciones, los genes *mcbE* y *mcbF* se encargan de su excreción al medio, mientras que *mcbG* permite a las células productoras de este péptido sobrevivir a su acción bactericida (Garrido *et al.* 1988). Por otra parte, CcdB es una proteína de 11.7 kDa, codificada por el plásmido F. En este plásmido se encuentran codificados distintos programas de muerte celular, también llamados módulos de adicción (Couturier *et al.* 1998). De todos ellos, los sistemas toxina-antitoxina son los mejor estudiados, siendo el módulo *ccdAB* un buen ejemplo. En este sistema, la proteína CcdB inhibe a girasa y al bloquear la transcripción actúa como una toxina (Critchlow, 1997), mientras que CcdA es la antitoxina; ambas son degradadas constantemente por la proteasa Lon, aunque CcdA tiene una menor vida media (Hayes, 2003), de modo que aquellas células incapaces de mantener la antitoxina son eliminadas. MfpA (presente en *Mycobacterium sp.*) y Qnr (aislada de *Klebsiella pneumoniae*), por su parte, son proteínas inhibidoras de girasa que pertenecen a un grupo conocido como familia del pentapéptido repetido (Tran, 2000). Estas dos proteínas, más que antibióticos, han demostrado un papel protector frente a las quinolonas, MccB17 y ligeramente, también contra albicidinas (Vivien *et al.* 2007). Resulta interesante el mecanismo de protección implicado (al menos para MfpA) el cual consiste en la unión de girasa a ésta, antes que a la molécula de quinolona, ya que la estructura de MfpA resulta similar al DNA-B en forma, tamaño y propiedades electrostáticas (Hedge *et al.*, 2005). MfpA, al unirse a girasa e inhibirla, protege de su interacción con las quinolonas y las potenciales lesiones en el DNA (Tran *et al.*, 2005; Hedge *et al.*, 2005). La proteína Gyrl se trata a continuación.

2.3 LA PROTEÍNA Gyrl

2.3.1 Características de Gyrl

El gen *gyrl* (igualmente llamado *sbmC*) codifica a la proteína inhibidora de girasa Gyrl, no obstante, a diferencia de MccB17, CcdB y Qnr, que son proteínas codificadas en plásmidos, Gyrl codificada en el minuto 44.8 del mapa cromosómico de *E. coli* (Baquero *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 1998).

Gyrl es una proteína citoplásmica de 157 aminoácidos y 18 kDa de peso (Baquero *et al.*, 1995). Ensayos de susceptibilidad celular demuestran que durante la fase exponencial de crecimiento, la sobreproducción de Gyrl genera, resistencia al daño en el DNA ocasionado por inhibidores de girasa (MccB17 y en menor grado contra NAL, CFX, CcdB y albicidina) o agentes alquilantes como (mitomicina C (MMC) y N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), pero no contra la luz UV (Baquero *et al.*, 1995; Chatterji *et al.* 2003; Vivien *et al.* 2007). Esta sobreproducción de Gyrl ocasiona además un crecimiento de células formando filamentos, alteraciones en la morfología del nucleóide y disminución de la viabilidad celular (Nakanishi *et al.*, 1998). No obstante, la filamentación y la disminución de la viabilidad también se observan en células incapaces de elaborar la proteína (equivalentes a una cepa *gyrl*⁻), debido a la expresión del RNA “antisentido” de este gen (Nakanishi *et al.*, 1998). La resistencia impartida frente a MccB17 dio originalmente el nombre de *sbmC* (susceptibility to B17 microcin, locus C) a *gyrl*, la cual depende en gran medida de RecA; por ejemplo, las células *gyrl*⁻*recA*⁺ son aproximadamente dos veces más sensibles a MccB17 que las células *gyrl*⁺*recA*⁺, mientras que las células *gyrl*⁺*recA*⁻ son dieciséis veces más sensibles al mismo agente que las células *gyrl*⁺*recA*⁺ (Baquero *et al.*, 1995). Pese a lo anterior, también se ha reportado que la interrupción de *gyrl* no afecta la viabilidad y que su sobreproducción no brinda resistencia contra ampicilina, cloranfenicol, quinolonas, MMC, bleomicina u otras microcinas distintas a MccB17 (Baquero *et al.*, 1995).

Los estudios *in vitro* con Gyrl, han permitido determinar que esta proteína inhibe la reacción de superenrollamiento de girasa, hecho del cual Gyrl toma su nombre (*gyr*ase inhibitor) (Nakanishi *et al.*, 1998; Chatterji y Nagaraja, 2002), siendo sus aminoácidos 89-96 esenciales para la inhibición (Nakanishi *et al.*, 2002) Figura 2A. A diferencia de las quinolonas, Gyrl no estabiliza los complejos cortados DNA-girasa (Nakanishi *et al.*, 2002); el mecanismo propuesto por el cual Gyrl brinda la resistencia antes mencionada, tiene su origen en la disminución de estos complejos al interferir con la unión de girasa al DNA, es decir, “secuestra” a girasa fuera del DNA (Chatterji y Nagaraja, 2002). Cabe aclarar que Gyrl no interactúa por sí sola con éste último (Chatterji y

Nagaraja, 2002). Más interesante aún es que Gyrl también disminuye aquella cantidad basal de cortes en el DNA, inducidos por el ciclo catalítico normal de girasa, esto es como consecuencia del secuestro de girasa (Chatterjii y Nagaraja, 2002).

Por último, un análisis comparativo del genoma de *E. coli* contra el de *Klebsiella pneumoniae* y 3 genomas distintos de *S. entérica* no revela homólogos cercanos (>70% de identidad) a *gyrl* (McClelland *et al.*, 2000). Sin embargo, un estudio más reciente de la secuencia de aminoácidos y la estructura de Gyrl, ha revelado ortólogos putativos de esta proteína en *Salmonella enterica* y *Clostridium acetobutlicum* (entre otras), con porcentajes de identidad del 70 y 21 %, respectivamente (Romanowski *et al.*, 2002). La estructura de Gyrl se muestra compuesta por dos módulos similares entre sí (Romanowski *et al.*, 2002), originados posiblemente por duplicación y fusión del dominio estructural ancestral SHS2 (Ananthamaran y Aravind, 2004). Este hecho caracteriza a una superfamilia de proteínas con el mismo nombre de Gyrl, donde ésta es el prototipo (Ananthamaran y Aravind, 2004). Figura 2B.

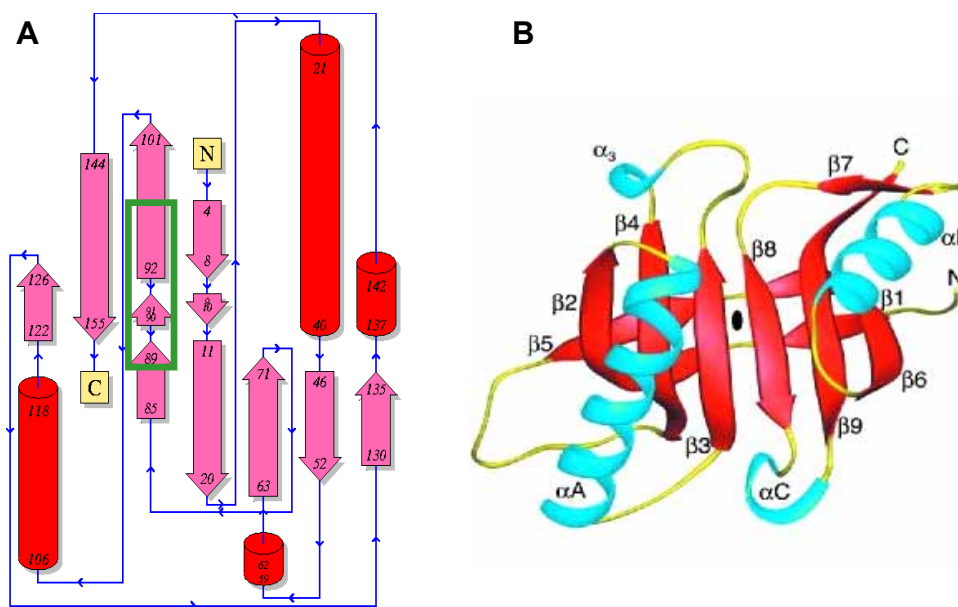


Figura 2. Esquema de Gyrl. A) Algunos elementos de la estructura primaria y secundaria de la proteína. En el rectángulo verde, se destacan aquellos aminoácidos (89-96) esenciales en la inhibición de girasa. B) Modelo tridimensional de Gyrl, que muestra el C y el N terminales, así como el arreglo lineal de los principales elementos estructurales secundarios ($\beta 1$, $\beta 2$, αA , $\beta 3$, α_3 , $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\alpha \beta$, $\beta 7$, $\beta 8$, αC y $\beta 9$). Además, se señala el punto de simetría por un óvalo negro. Fuente: A, Imagen otorgada por el Dr. Mario Calcagno, Facultad de Medicina, UNAM; B, imagen tomada de Romanowski *et al.* 2002.

2.3.2 Regulación de la expresión genética de *gyrl*

Por estudios *in vivo* se sabe que en la regulación de la transcripción de *gyrl* intervienen distintas proteínas, cuya inducción o represión, caracterizan distintos estados fisiológicos en esta

bacteria. Así, se tiene que *gyrI* está regulado por el represor LexA. Este último, junto con la proteína RecA, participa en la inducción de la respuesta celular al daño en el DNA o respuesta SOS, lo cual convierte a este gen en parte de esta respuesta fisiológica (Baquero *et al.*, 1995). Así mismo, durante esta respuesta, la proteína H-NS (moduladora global de la expresión genética en *E. coli*) regula a *gyrI* (Oh *et al.*, 2001). Además de aquellos reguladores, *gyrI* está bajo el control de RpoS, lo cual lleva a este gen a incrementar su expresión al comienzo de la fase estacionaria (Oh *et al.*, 2001; Nakanishi *et al.*, 1998). Cabe mencionar que el empleo de fusiones transcripcionales ha permitido establecer la pertenencia de *gyrI* al ámbito regulatorio de aquellos reguladores globales de la expresión genética en *E. coli* (Baquero *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 2001). De igual forma, las técnicas modernas de micro-arreglos han permitido determinar la dinámica de su transcripción durante la respuesta SOS inducida, cuando menos, por dos agentes que dañan el DNA (MMC y luz UV) (Khil y Camerini-Otero, 2002; Courcelle *et al.*, 2001). Es de destacar que la regulación conjunta por LexA y RpoS, presente en *gyrI*, se repite únicamente en el gen *dinB*, el cual codifica para la polimerasa de DNA Pol IV susceptible a error (Layton y Foster, 2003).

En resumen, *gyrI* (*sbmC*) es un gen cromosomal que codifica para una proteína del mismo nombre, con una capacidad dual de inhibición sobre girasa y de protección sobre el DNA. Ya que la inducción de *gyrI* se lleva a cabo como parte de la respuesta SOS y al inicio de la fase estacionaria (dos estados fisiológicos de gran relevancia en la vida de *E. coli*), se abordan ambos a continuación.

2.4 LA RESPUESTA SOS EN *E. coli*

E. coli tiene que enfrentar agentes físicos y químicos capaces de dañar su DNA e impedir su replicación. Cuando esto sucede, ésta y otras bacterias pueden montar una reacción fisiológica conocida como respuesta SOS, la cual, desde su descubrimiento (Radman, 1975), ha llegado a convertirse en el mejor paradigma para comprender cómo responden las células a lesiones en su genoma (Bénédicte, 2005).

Además de las quinolonas, existen otros agentes químicos capaces de desencadenar la repuesta SOS. Entre estos, la mitomicina C (MMC) sintetizada por *Streptomyces lavendulae* (Mao *et al.* 1999) es un buen inductor de la respuesta SOS, y es preferida para el estudio de esta respuesta, posiblemente a la par de las quinolonas. MMC es un antibiótico capaz de inhibir la síntesis de DNA, actuando sobre el DNA y no directamente sobre girasa, al formar entrecruzamientos entre sus hebras complementarias (Tomasz, 1995).

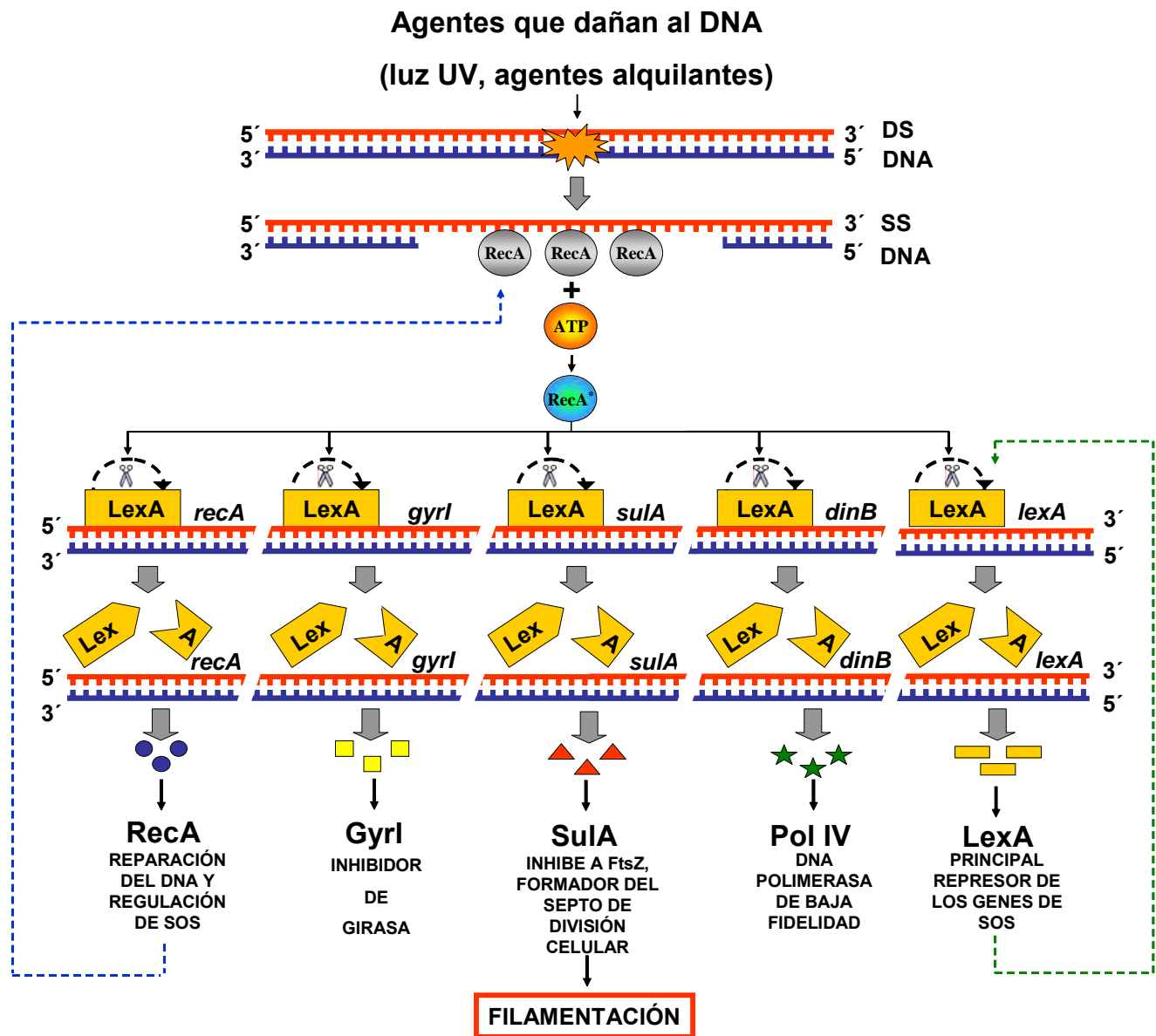


Figura 3. Esquema de la inducción de la respuesta SOS. En presencia de daño en el DNA de doble hebra (DS DNA), se genera DNA de hebra sencilla (SS DNA). Al unirse RecA a ésta última molécula, se activa formando a RecA^{*}, la cual facilita la autólisis del represor LexA. Tras la ruptura de LexA, los genes de SOS (aproximadamente 60) pueden expresarse. Ya que *recA* y *lexA* son genes regulados por el represor LexA, existe un mecanismo de autorregulación, que permite el silenciamiento de SOS una vez que el daño ha sido reparado (para más detalles ver el texto). El producto de los genes inducidos se muestra en figuras de colores azul, amarillo, rojo, verde y naranja. Las líneas punteadas en azul y verde, que parten de RecA y LexA, respectivamente, representan la característica retroalimentativa de la respuesta SOS a diferentes niveles.

2.4.1 Mecanismo de inducción de la respuesta SOS

En *E. coli*, la respuesta celular al daño en el DNA inducida por MMC involucra cambios significativos en el nivel de expresión de más de mil genes (Khil y Camerini-Otero, 2002), de los cuales, más de sesenta pertenecen a la respuesta SOS (Courcelle *et al.*, 2001; Fernández de

Henestrosa *et al.* 2000). Estos últimos genes se encuentran bajo el control principal de la proteína LexA. En una célula sin daño significativo en su DNA, la proteína LexA se une a una secuencia específica ubicada dentro de la región promotora de los genes de SOS, conocida como caja SOS o caja LexA; comportándose como un represor (Little *et al.*, 1981), y formando así el regulón LexA. El gen *gyrI* tiene una caja SOS por lo que pertenece a este regulón (Baquero *et al.* 1995). Cuando se presenta un daño en el DNA, la proteína RecA se une a moléculas de DNA de una sola hebra (ssDNA), dando origen a un filamento nucleoprotéico helicoidal RecA/ssDNA con una dirección de crecimiento 5' a 3' (Cox, 2007). En dicho filamento, RecA pasa a una forma activada RecA* (Cox, 2007) la cual posee una actividad coproteasa que facilita la ruptura autocatalítica de LexA, en un sitio cercano al punto medio de la proteína (Ala⁸⁴-Gly⁸⁵) (Horii *et al.*, 1981). A medida que la concentración celular de LexA disminuye, se incrementa la expresión de los genes del regulón LexA, siendo aquellos que tienen interacciones más débiles DNA-LexA, los primeros en inducirse. RecA y LexA también son parte del regulón SOS (Little *et al.* 1981), funcionando de este modo como un mecanismo de autorregulación negativa. RecA*, además de facilitar la autólisis de LexA, se induce junto con otros genes para permitir que la vía de recombinación *NER* (*Nucleotide Excision Repair*) y el operón *uvrABCD*, reparen el DNA dañado (Rupp, 1996). Figura 3.

Por otra parte, durante la división celular normal (y sin la inducción de SOS), FtsZ, una proteína con actividad GTPasa y homóloga a la tubulina de eucariontes (Löwe y Amos, 1998; Shih y Rothfield, 2006), se polimeriza formando protofilamentos en torno al anillo Z, ubicado en la región media de la célula en división. Cuando este anillo está bien desarrollado, estrangula el cuerpo de la célula dando origen a dos células. En este sentido, un aspecto importante de la respuesta SOS es el fenómeno de crecimiento celular asociado a la falta de división, también conocido como filamentación. La filamentación tiene como responsable al gen de SOS *sulA* o *sfiA* (Huisman y Ari, 1981), el cual, debido a las características de su operador (muy afín a LexA) se induce en forma parcial, aunque relativamente rápido, frente a estímulos débiles de agentes inductores de lesiones en el DNA, como la luz UV o la MMC (Courcelle *et al.* 2001; Khil y Camerini-Otero, 2001); no obstante, frente a dosis más severas de estos mismos estímulos, su expresión se hace 100 veces mayor. Durante la filamentación, la proteína SulA en su forma dimérica se une a la asa T7 de FtsZ, bloqueando su polimerización (Cordell *et al.* 2003) y dando origen a células incapaces de separarse o filamentos. De este modo, SulA es un mecanismo de “*checkpoint*” que termina tras la reparación del DNA, cuando esta proteína es degradada por la proteasa Lon (Lewis, 2000), reiniciándose así el proceso de división celular. Cabe mencionar que

la longitud de los filamentos formados, es proporcional a las lesiones en el material genético, y estas a su vez, de la intensidad del estímulo. Por último, en el caso de que la reparación del DNA no sea efectiva, la célula induce la producción de dos autolisinas, AmiB (N-acetilmuramyl-L-amidasa) y MltB (transglucosilasa lítica unida a la membrana), las cuales terminan con la vida de las células defectuosas (Lewis, 2000). Las características antes mencionadas de la filamentación, y los mecanismos que la generan, permiten que su monitoreo y cuantificación represente una estrategia fiable para determinar la aparición e intensidad de la respuesta SOS en la célula.

Otro aspecto sobresaliente de la respuesta SOS, es su íntima relación con el proceso de la evolución bacteriana, ya que esta respuesta es uno de los principales mecanismos responsables de la generación de variabilidad genética, a través del incremento de la tasa de mutación y el intercambio genético (McKenzie *et al.*, 2000). Las DNA polimerasas II (*polB*), IV (*dinB*) y V (*umuDC*) de *E. coli* son reguladas por LexA (Iwasaki *et al.*, 1990; Goodman, 2002), pero sólo Pol IV y Pol V pertenecen a la familia “Y” de DNA polimerasas o “*error-prone polimerases*”, cuyos miembros se caracterizan por la síntesis de DNA de baja fidelidad (Goodman, 2002). Por su parte, Pol II pertenece a la familia B de DNA polimerasas (Braithwaite e Ito, 1993).

Aun cuando la respuesta SOS se ha llegado a comprender detalladamente a partir de estudios con cultivos celulares, cuyos resultados son el promedio de una población compuesta por 10^8 - 10^9 células/ml, las nuevas técnicas de microscopía de fluorescencia capaces de seguir la inducción de SOS en células individuales han permitido determinar, por una parte, la inexistencia de una inducción poblacional homogénea de SOS, revelándose por el contrario, una alta variabilidad en la intensidad de la respuesta de una célula a otra, aun en células genéticamente idénticas y cultivadas en las mismas condiciones (McCool *et al.*, 2004); por la otra, una nueva concepción de la modulación temporal de SOS, conformada por picos de inducción, enmascarados de otra forma por el promedio poblacional (Friedman *et al.*, 2005).

2.5 LA FASE ESTACIONARIA (FS) EN *E. coli*

Si se colocara una población de bacterias en un medio rico (LB por ejemplo), en condiciones ambientales idóneas y sin competidores o depredadores, dicha población crecería en forma únicamente limitada por la velocidad a la cual se pueden reproducir sus individuos (Nyström, 2004). Esta capacidad reproductiva infinita se llama “potencial biótico” y produce una curva de crecimiento en forma de “J”. No obstante, existen limitaciones inherentes del ambiente que impiden el continuo crecimiento de la población. Este conjunto de factores limitantes se conoce

como resistencia ambiental (McArthur, 2006), siendo el agotamiento de los nutrientes un claro ejemplo.

En el caso de *E. coli* (y muchas otras bacterias) la curva normal de crecimiento, en una cantidad limitada de medio rico LB, se asemeja más a una curva en forma de “S”, misma que puede dividirse en cuatro fases (Huisman *et al.* 1996) las cuales corresponden a distintos estados fisiológicos (EF) (Baev *et al.*, 2006c). Figura 4:

- **Fase de transición A o “lag”/EF I:** comprende el tiempo requerido para recuperarse del ayuno y reiniciar la maquinaria de división celular. Entre muchos otros procesos importantes, se recupera el nivel normal de tensión helicoidal del DNA (Reyes *et al.*, 2003).
- **Fase logarítmica o exponencial (FE)/EF II y III:** es un periodo de crecimiento continuo debido a la abundancia de nutrientes. En el EF II se inducen múltiples sistemas catabólicos que permiten la asimilación de carbohidratos, polioles y ácidos inorgánicos (Baev *et al.*, 2006a). En el EF III se presenta la inducción de las porinas OmpA y OmpC, y sistemas de transporte peptídicos (Payne y Smith, 1994). Además, el acetato liberado previamente al medio es reabsorbido y asimilado (Baev *et al.* 2006c).
- **Fase de transición B/EF IV:** los nutrimentos comienzan a decaer, y con ello, la síntesis de macromoléculas y la velocidad de crecimiento del cultivo, no obstante, la división celular continúa a velocidades similares a las de la fase exponencial (Nyström, 2004). Además, algunas células inician una actividad “scavenger” de algunos nutrientes residuales.
- **Fase Estacionaria (FS)/EF V:** Las características de las células en esta fase son diferentes a las de las células en la fase exponencial:

2.5.1 Cambios en la transcripción: En la FS ocurre una reorganización de las redes de regulación genética, con una tendencia general a la disminución de la expresión de genes. Tabla 1. No obstante, existe un metabolismo basal que permite la sobrevivencia de las células durante semanas, meses (e incluso años) en ausencia de nutrientes (Zinser y Kolter, 2004). Este cambio en la expresión genética, tiene como principal responsable al regulador maestro *rpoS* (σ^s), que auxiliado por otros reguladores (Typas *et al.*, 2007), sustituye a σ^{70} (responsable de la transcripción de genes durante la fase exponencial de crecimiento). RpoS no sólo actúa frente al ayuno, sino también frente a otras condiciones de estrés (osmótico, oxidativo y de pH, entre otros).

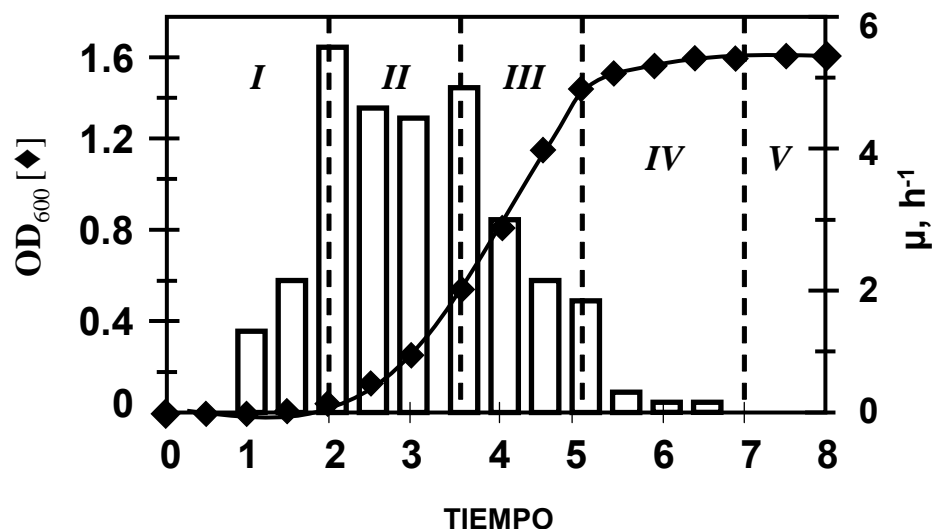


FIGURA 4. Crecimiento característico de *E. coli* MG1655 en medio rico LB, hasta las ocho horas de cultivo. En números romanos se muestran distintos estados fisiológicos que implementa esta bacteria como parte de su estrategia metabólica en medio LB, para los detalles de cada estado ver el texto. Tasa específica de crecimiento μ (barras) y densidad óptica OD_{600} (♦). Tiempo en horas. Tomado de Baev *et al.*, 2006b.

2.5.2 Cambios morfológicos, de membrana citoplásmica y de pared celular: ocurre una considerable reducción del tamaño, resultado de los procesos de división reductiva y de empequeñecimiento o “*dwarfing*” (Nyström, 2004). En la división reductiva las células adquieren una apariencia cocoide, debido a un crecimiento nulo posterior a la división celular y a la expresión de *bolA* (Santos *et al.* 2002). El empequeñecimiento ocurre posterior a la división reductiva (equivale a la autofagia de los eucariontes) y es resultado de la degradación de proteínas y de membrana citoplásmica (Nyström, 2004); pese a lo anterior, se presenta un crecimiento del periplasma, ya que a diferencia de la membrana citoplásmica, la pared escapa de la degradación e incluso aumenta su grosor por la adición de peptidoglicano. Así mismo, en la membrana externa aumenta la cantidad de lipopolisacáridos (Huisman *et al.*, 1996).

2.5.3 Cambios en el nucleóide y el metabolismo del DNA: la carencia de nutrientes lleva a la pérdida del superenrollamiento del DNA, no obstante que girasa se mantiene a cantidades constantes aun a las 72 horas de ayuno, sin importar la degradación de proteínas que caracteriza esta fase (Reyes *et al.*, 2003). Así mismo, ocurre la modificación en la composición del nucleóide, debido a que algunas proteínas que lo conforman, como HU, Fis, IHF, HNS, StpA y Dps, modifican su cantidad. De estas, las cuatro primeras muestran una tendencia a la disminución, aunque es en HU y Fis donde más se observa este fenómeno;

por su parte, Dps tiende a aumentar su cantidad.

Durante la división reductiva la población celular se vuelve altamente heterogénea con respecto al número de cromosomas por célula. De hecho, las células de *E. coli* que crecieron en medio LB llegan a la FS con un número variable de cromosomas (de uno a ocho) siendo lo más común 2 ó 4 por célula. Esto se debe a que algunas células pueden comenzar ciclos de replicación al inicio de la FS, sin embargo, éstas no se dividen ni segregan sus cromosomas hasta que todas las células cuentan con un único cromosoma (Nyström, 2004).

En resumen, estos y otros muchos ajustes al metabolismo, permiten a las células de FS tener mayor resistencia frente a distintos factores de estrés (calórico, osmótico y oxidativo), radiación UV y antibióticos.

Tabla 1. Algunos genes que incrementan o disminuyen su transcripción en la fase estacionaria.

CATEGORÍA FUNCIONAL	GENES QUE INCREMENTAN SU TRANSCRIPCIÓN
Morfología y división celular	<i>bolA, ftsQ, ftsA, ftsZ csgA, csgB, cfa, ybaY</i>
Metabolismo energético	<i>appB, appY, narY, idcC, acnA, acs, aldB, cydA, cydB, cyxAB, frdA, glpD, hmp, nrz, poxB, tam hyaABCDEFGF, galEKT, adhP, amyA, dkgB, fbaB, gabD, hdhA, hycF, idcC, narU, narY, poxB, qor</i>
Metabolismo y biosíntesis de aminoácidos	<i>argH, aroM, astC, astA, astD, astB, astE, adIA, gadA, gadB, gadC, aroL</i>
Resistencia al estrés	<i>dps, osmA, osmB, osmC, osmE, osmY, katE, katG, yhiU, yhiV, mlbB, ecnB, cpxRA, oxyR, pspADCE</i>
Replicación, reparación, recombinación y modificación del DNA, y configuración del nucleóide	<i>hns, ada, aidB, cbpA, dnaN, himD, rob, topA, xthA</i>
Transporte y membrana	<i>ugpC, ugpE, gabP, artM, artI, artP, ansP, blc, mscl, ugpB, ugpC, potF</i>
Regulación	<i>rpoS, chaB, gadE, gadW, gadX, gem</i>
Función no definida o hipotética	<i>aroM, ybaY, ybaS, ydcS, yehX, yhjY, yfcG, yliI, yjbJ, yjbE, ygaU, ygdI, ygaF, yjgR, ydaM, ydcK</i>
CATEGORÍA FUNCIONAL	GENES QUE DISMINUYEN SU TRANSCRIPCIÓN
Metabolismo energético	<i>sdhA, sdhB, sdhC, fumA, mdh, pckA, gltA, acnB, abgB, aceE, aceF, sucA, sucB, atpIBEFHAGDC</i>
Síntesis flagelar	<i>flgM, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, fljC, fljF, fljG, fljH, fljK, fljZ, fljL, fljM, fljN, flgM, flgN</i>
Transporte y membrana	<i>nmpC, ompF, ompW</i>
Resistencia al estrés	<i>uspE</i>
Regulación	<i>fnr, fljA</i>

Tomada de Ramírez et al. 2005.

3. JUSTIFICACIÓN

El gen *gyrl* aumenta su expresión en dos condiciones: durante la respuesta a daño al DNA (SOS) y al inicio de la fase estacionaria. La función propuesta para la proteína Gyrl es la de proteger a la célula contra el efecto de algunos agentes que inhiben a la girasa o que dañan el DNA e impiden el avance de las horquillas de transcripción o replicación. Este papel protector se manifiesta como un incremento en la sobrevivencia de las células en presencia de estos agentes y una disminución en el daño en su DNA. Sin embargo, la función protectora se ha estudiado en condiciones de sobreexpresión de Gyrl, donde su nivel es muy superior al nivel normal. El único agente que se analizó en condiciones fisiológicas fue Microcin B17, detectándose una protección pequeña de máximo dos veces. Por otra parte, todos los estudios de protección *in vivo* se realizaron en células en la fase exponencial de crecimiento.

En base a esto se propone explorar la función biológica de Gyrl en el inicio de la fase estacionaria y durante la respuesta SOS, que es cuando se incrementa la expresión de *gyrl*.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible papel protector de la proteína Gyrl en condiciones fisiológicas contra el daño en el DNA inducido por agentes que dañan esta molécula o por inhibidores de la girasa.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar en células en fase exponencial la intensidad de la respuesta SOS inducida en respuesta a NAL, un inhibidor de girasa, y MMC, un agente que daña el DNA. Para esto se va a determinar el porcentaje de filamentos celulares y el tamaño de éstos, así como la viabilidad celular durante la respuesta SOS.
2. Estudiar la intensidad de SOS en respuesta a NAL y MMC en células en fase estacionaria temprana, utilizando la misma metodología.

5. HIPÓTESIS

Considerando que:

- La unión de Gyrl a girasa interfiere con la unión de esta enzima al DNA.
- La interrupción del avance de girasa, ya sea por alguno de sus inhibidores, por agentes alquilantes del DNA o por la falta de ATP, permite la colisión de las horquillas de replicación o transcripción liberando los cortes no religados por la enzima.
- Girasa no cambia su concentración en fase exponencial y fase estacionaria.

Se propone la siguiente hipótesis:

En la respuesta SOS y durante la fase estacionaria temprana, al aumentar la cantidad de Gyrl, disminuye el número de moléculas de girasa unidas al DNA. Esto genera, por una parte, la reducción del número de moléculas de girasa incapaces de avanzar en su ciclo catalítico, lo que disminuye el número potencial de cortes (daño) en el DNA; por otra parte, genera la disminución del superenrollamiento negativo del DNA reduciendo el número de moléculas de MMC capaces de intercalarse entre las hebras del DNA. Siendo así, Gyrl podría ser un protector del daño al DNA, ocasionado principalmente por dos fuentes: *i*) por la colisión de la horquilla de replicación o transcripción con una girasa incapaz de completar su ciclo catalítico, debido a que alguno de sus inhibidores se presenta en el medio o por un bajo ATP consecuencia de la carencia de nutrientes; *ii*) por la formación de entrecruzamientos entre las hebras complementarias de la molécula de DNA debido al intercalamiento de MMC. Este efecto protector se manifestaría en una respuesta SOS menor y mayor sobrevida frente a este tipo de daño. Es decir, a una misma dosis de NAL o MMC, el daño en el DNA es mayor en una mutante *gyrI* que en la silvestre y por tanto la respuesta SOS es más intensa en la mutante y las células sobreviven menos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron: la MG1655 F^- , λ^- , $ilvG^-$, rfb^- , $rph-1$ (en lo posterior $gyrI^+$ o silvestre) y la FB20566 que es como la MG1655 pero $sbmC::Tn5kan^R$ ($gyrI::Tn5Kan^R$, en lo posterior $gyrI^+$). Ambas cepas se compraron a F.R. Blattner, (laboratorio de genética de la Universidad de Wisconsin-Madison, en los Estados Unidos de America). La construcción de la mutación $sbmC::Tn5kan^R$ se describe en Kang *et al.* 2004.

6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DE NAL Y DE MMC

Se disolvieron 0.2 g de NAL (Sigma-Aldrich) en 10 ml de una solución KOH 0.5 N para una concentración final de 20 mg/ml. La MMC (Sigma-Aldrich) se preparó y almacenó como lo indica el proveedor. En breve, el contenido del vial original (2 mg MMC + 48 mg de NaCl) se disolvió en 4 ml de agua esterilizada por filtración y se almacenó a 4° C en la oscuridad.

6.3 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS

Todos los experimentos se realizaron con bacterias cultivadas en el medio rico de cultivo Luria Bertani LB (Sambrook *et al.* 1989):

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

El volumen se aforó a un litro con agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con 1ml de solución de NaOH (Baker) 2.5 N. El medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 121° C a una presión de 22 libras. Cuando se requirió medio LB con kanamicina, ésta se añadió posterior a la esterilización a una concentración final de 25 µg/ml. Cuando se requirió medio LB sólido se añadieron 20 g/l de agar (Difco).

Los cultivos bacterianos se iniciaron a partir de células almacenadas en medio LB con glicerol al 20% a una temperatura de -70° C. Para ello, primero se inocularon 3 ml de medio LB con 50 µl de las células a -70° C y se incubaron toda la noche (12 horas) a 37° C en agitación constante a 180 rpm. De este cultivo se extrajeron 100 µl los cuales se añadieron a un matraz nefelométrico

de 125 ml con 10 ml de medio LB. El matraz se incubó a 37° C en agitación constante. El crecimiento del cultivo se siguió determinando cada media hora la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic. Para inducir SOS en la fase exponencial (0.4 D.O._{600 nm}) o fase estacionaria (1.6 D.O._{600 nm}) se añadió 5 µg/ml de NAL ó 0.15 µg/ml de MMC. Esta dosis se nombró *dosis 1X* de NAL o de MMC. Los cultivos se continuaron a la misma temperatura y agitación por dos horas. Al término de este tiempo se procedió a la observación de las células al microscopio óptico o a la determinación de la viabilidad celular.

6.4 OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS BACTERIANAS AL MICROSCOPIO ÓPTICO

A partir de los cultivos bacterianos de fase exponencial de crecimiento o de fase estacionaria se tomaron muestras de 1 ml. A 1 ml de esta dilución se añadió azida de sodio (NaN₃) a una concentración final de 0.03 % para disminuir el movimiento celular y detener su crecimiento (Herman y Soule, 1943). Para observar las células, se utilizó un microscopio Nikon E600 a 60X de aumento, utilizando la técnica de iluminación DIC (*“differential interference contrast”*). Para capturar las imágenes (escogidas aleatoriamente) se utilizó una cámara digital Hamamatsu Orca-II. Las imágenes capturadas se amplificaron a igual tamaño y se procesaron con el programa computacional Microsoft Photo Editor.

6.5 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE Y MAGNITUD DE FILAMENTACIÓN

La determinación de la longitud de las células se hizo midiendo la longitud de las mismas sobre las imágenes impresas, teniendo como unidad el milímetro. Por cada uno de los ensayos realizados con NAL o MMC se tomó la longitud de 100 células. En total, para los experimentos se determinó la longitud de 600 células para NAL y 600 para MMC (200 por cada repetición del experimento). Se consideró arbitrariamente como filamento sólo aquellas células mayores o iguales a 6.5 mm (aproximadamente más de 2.5 veces el valor de la longitud promedio de las células sin tratamiento) y que no presentaran un septum visible (ver tabla 2 y anexo).

6.6 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS VIVAS O CUENTAS VIABLES

Para determinar la cuenta viable de los cultivos, se recurrió al método de diluciones seriales en una solución de MgSO₄ 10 mM: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, etc. De las diluciones 10⁻⁷, 10⁻⁸ o 10⁻⁹ se tomaron 100 µl los cuales se sembraron en cajas de Petri con medio LB sólido. Las cajas se incubaron a 37° C por 18-24 hrs y se contaron las colonias en las diluciones adecuadas para calcular el

número de células/ml en el cultivo. Para ello las células se crecieron en las condiciones anteriormente descritas en el punto 6.3. El número de unidades formadoras de colonia (UFC) se contó en un contador de colonias.

6.7 PURIFICACIÓN DEL DNA BACTERIANO Y AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GENE *gyrI* MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA (PCR)

El DNA cromosomal empleado se extrajo de las cepas *gyrI* silvestre y *gyrI*⁻ por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). La amplificación de un fragmento del gen *gyrI* se realizó con la técnica de PCR. Los oligonucleótidos usados fueron GyrI5 “forward” (5'-GACCTTTCTTTTGCAGCAGACTGG-3') y GyrI3 “reverse” (5-ACACACCGCCCTGAGATGAATTAG). Estos oligonucleótidos hibridan a partir de la base 96 a la base 120 hacia arriba del codón ATG de inicio de la transcripción de mRNA de *gyrI*, y 467 a 491 hacia abajo del ATG, respectivamente. A partir de DNA de la cepa *gyrI* silvestre, se espera que con estos oligonucleótidos se amplifique un fragmento de 625 pb; mientras que en el caso de la cepa con la mutación por inserción *gyrI::Tn5kan^R* se predice un fragmento de 1800 pb. Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de amplificación fueron:

- ✓ Un ciclo de desnaturalización a 94° C por 2 minutos
- ✓ 30 ciclos de síntesis, cada uno de los cuales consistió en: 94° C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos y 72° C por 2 minutos
- ✓ un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72° C

La reacción se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600, con la siguiente mezcla de reacción, de acuerdo al proveedor Invitrogene:

Reactivo / concentración	Cantidad (µl)
Agua Pisa	18.3
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.0
Nucleótidos 10 mM	0.5
Oligonucleótidos GyrI5´ 20 pmol/µl	0.5
Oligonucleótidos GyrI3´ 20 pmol/µl	0.5
Enzima Taq polimerasa 5 unidades/µl	0.2
DNA cromosomal <i>gyrI</i> ⁺ o <i>gyrI</i> ⁻	1.5
volumen final	25 µl

6.8 SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA de *gyrI* OBTENIDOS POR AMPLIFICACIÓN POR PCR

Los fragmentos de DNA producto de la reacción de amplificación por PCR se separaron por electroforesis a 75 volts en un gel de agarosa al 1% durante una hora en amortiguador TBE 1X. Para observar el resultado de la electroforesis, el gel se sumergió 10 minutos en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 2.5 µg/ml ([Sambrook *et al.*, 1989](#)), se enjuagó, posteriormente el DNA se visualizo con luz UV y la imagen se capturó con el sistema “Gel Logic 200 Imagin System” de Kodak.

7. RESULTADOS

7.1 VERIFICACIÓN DE LOS FENOTIPOS Kan^R o Kan^S Y DEL GENOTIPO *gyrI* SILVESTRE Y *sbmC::Tn5kan^R (gyrI)* DE LAS CEPAS MG1655 Y FB20566 DE *E. coli*

La verificación del fenotipo de las cepas de *E. coli* con el alelo *gyrI* silvestre y *gyrI::Tn5kan^R* se llevó a cabo mediante su siembra en medio selectivo LB sólido + kanamicina 25 µg/ml encontrándose que la cepa *gyrI* fue la única capaz de crecer en este medio.

La verificación del genotipo se llevó a cabo mediante la amplificación de una región del gen *gyrI* por medio de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos GyrI3 y GyrI5, y las condiciones para la reacción de PCR descritos en el apartado de Materiales y Métodos. El fragmento amplificado predicho para el gen silvestre es de 614 pb, y para el gen *gyrI* (interrumpido por un gen de resistencia a kanamicina) de 1800 pb.. En la Figura 5 se presenta el resultado de este ensayo, el cual demuestra que ambos fragmentos corresponden al tamaño esperado. A partir de la cepa silvestre se recuperó un fragmento de ~625 pb (Figura 5, línea 2). Por su parte, a partir de la cepa *gyrI* se recuperó un fragmento de ~1800 pb (Figura 5, línea 3).

7.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PROTECTORA DE *GyrI* DURANTE LA RESPUESTA SOS EN CÉLULAS EN FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO

Con el objeto de estudiar el posible papel protector de la proteína GyrI en células expuestas a inhibidores de girasa o agentes que dañan directamente al DNA, probamos el efecto de NAL y MMC en el porcentaje de filamentación de células de *E. coli* creciendo activamente. El estudio se realizó en células silvestres y en células incapaces de expresar la proteína GyrI debido a la mutación por inserción de un gen de resistencia a kanamicina (*gyrI::Tn5kan^R* o *gyrI*). Para ello, primero se determinaron las condiciones experimentales adecuadas: concentración de NAL y de MMC, y tiempo de exposición a estos compuestos. Posteriormente se determinó el porcentaje de filamentos celulares en los cultivos bacterianos expuestos a NAL o MMC, el cual refleja indirectamente la cantidad de daño en el DNA y por tanto la intensidad de la respuesta SOS.

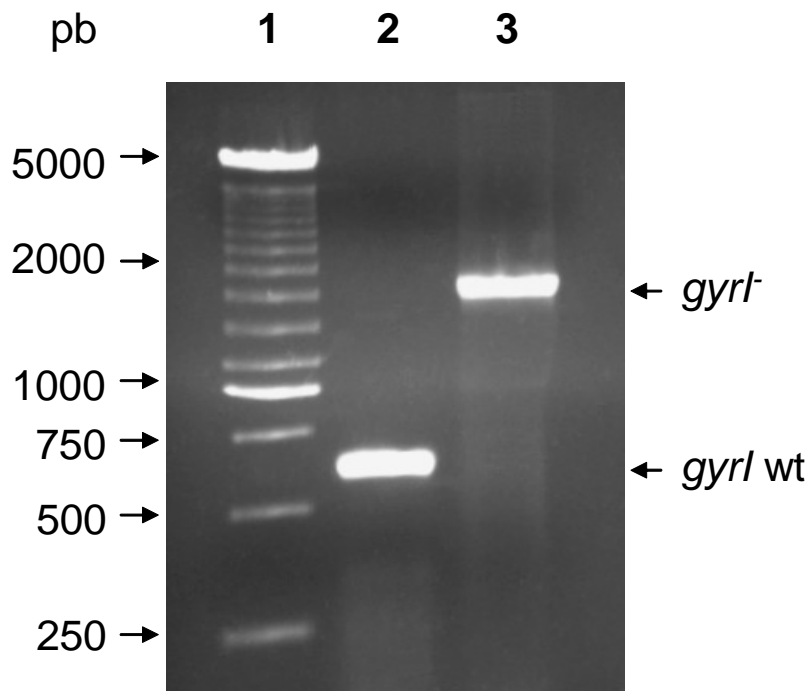


Figura 5. Amplificación de un fragmento del gen *gyrl* silvestre (wt) y *gyrl* (*gyrl::Tn5kan^R*). La verificación se determinó mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos Gyrl3 y Gyrl5. Las condiciones en que se llevó a cabo la amplificación se describen en los Materiales y Métodos. (1) Marcadores de peso molecular (250 pb), (2) *gyrl* silvestre, (3) *gyrl*. Gel de agarosa al 1%, corrido a 75 volts durante una hora en amortiguador TBE 1X.

7.2.1 Establecimiento de las condiciones experimentales de la respuesta SOS inducida por NAL y MMC para la adecuada observación de filamentos celulares.

El porcentaje de filamentación celular que se observa durante la respuesta SOS resulta proporcional al grado de inducción de la expresión de *sulA*, un gen importante en esta respuesta. SulA es una proteína que inhibe la formación del septum celular lo que genera crecimiento celular sin división o filamentación celular. Con la finalidad de cuantificar la intensidad de la respuesta SOS inducida por NAL ó MMC en células silvestres y *gyrl* se hicieron dos ensayos que permitieron encontrar las dosis para ambas sustancias, capaces de producir un porcentaje de filamentación >30 pero <70. Este rango arbitrario obedeció a que un porcentaje menor o mayor, podría dificultar el definir una diferencia en la filamentación, en el caso de que la ausencia de Gyrl tuviera un papel protector, según la hipótesis planteada.

Tabla 2. Descripción de los intervalos de longitud relativa, empleados en las gráficas de distribución porcentual.

TAMAÑO	INTERVALO DE LONGITUD
1X	células = 1.0 mm pero < 1.9 mm
2X	células > 1.9 mm pero < 3.9 mm
3X	células > 3.9 mm pero < 5.9 mm
4X	células > 5.9 mm pero < 7.9 mm
5X	células > 7.9 mm pero < 9.9 mm
6X	células > 9.9 mm pero < 11.9 mm
7X	células > 11.9 mm pero < 13.9 mm
8X	células > 13.9 mm pero < 15.9 mm
9X	células > 15.9 mm pero < 17.9 mm
10X	células > 17.9 mm

A partir de imágenes similares a las que se muestran en la Figura 6 se realizó una medición en milímetros (mm) de cada célula, obteniéndose distintos rangos (para más detalles consultar el apartado de Materiales y Métodos). Se definió como filamento sólo a aquellas células que fueran mayores a 6.5 mm y que no presentaran un septum visible. Las imágenes que se muestran tienen un tamaño menor al de las imágenes que se utilizaron para realizar estas mediciones.

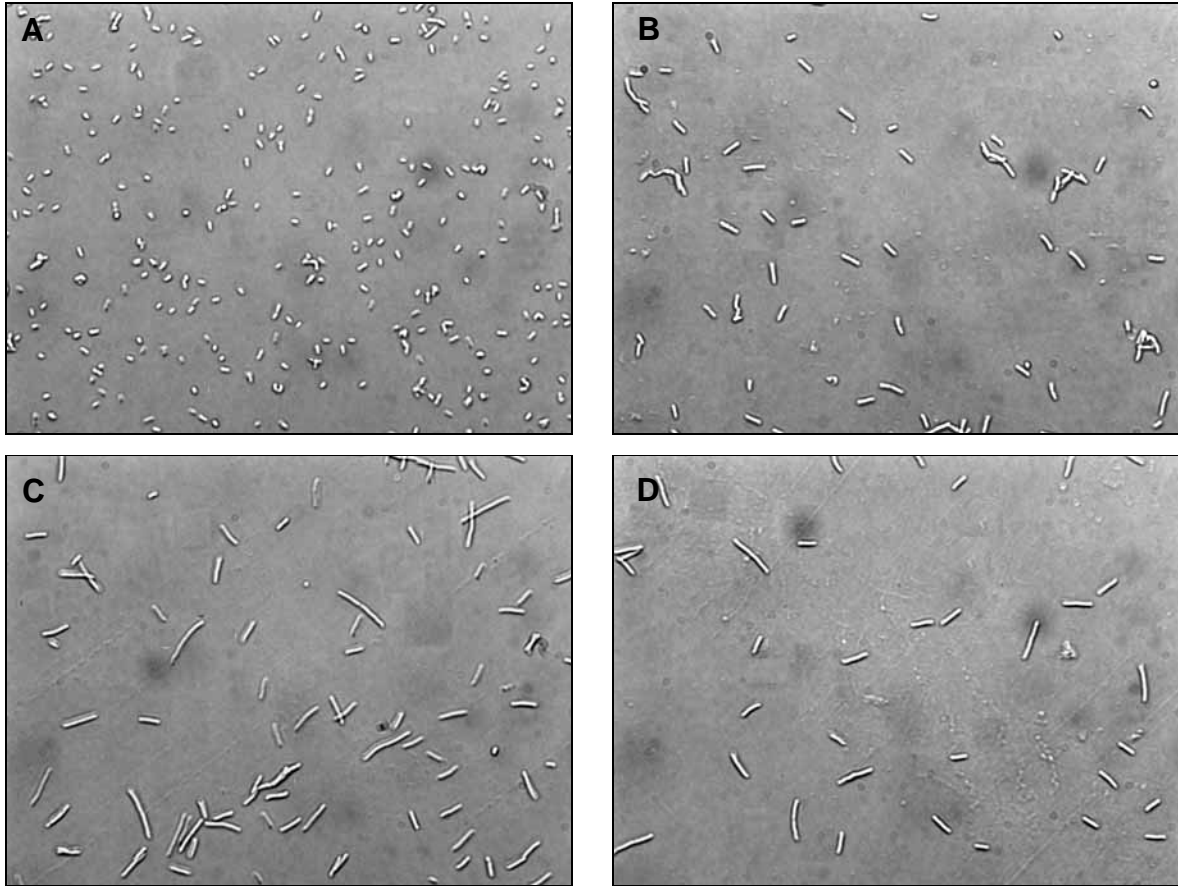
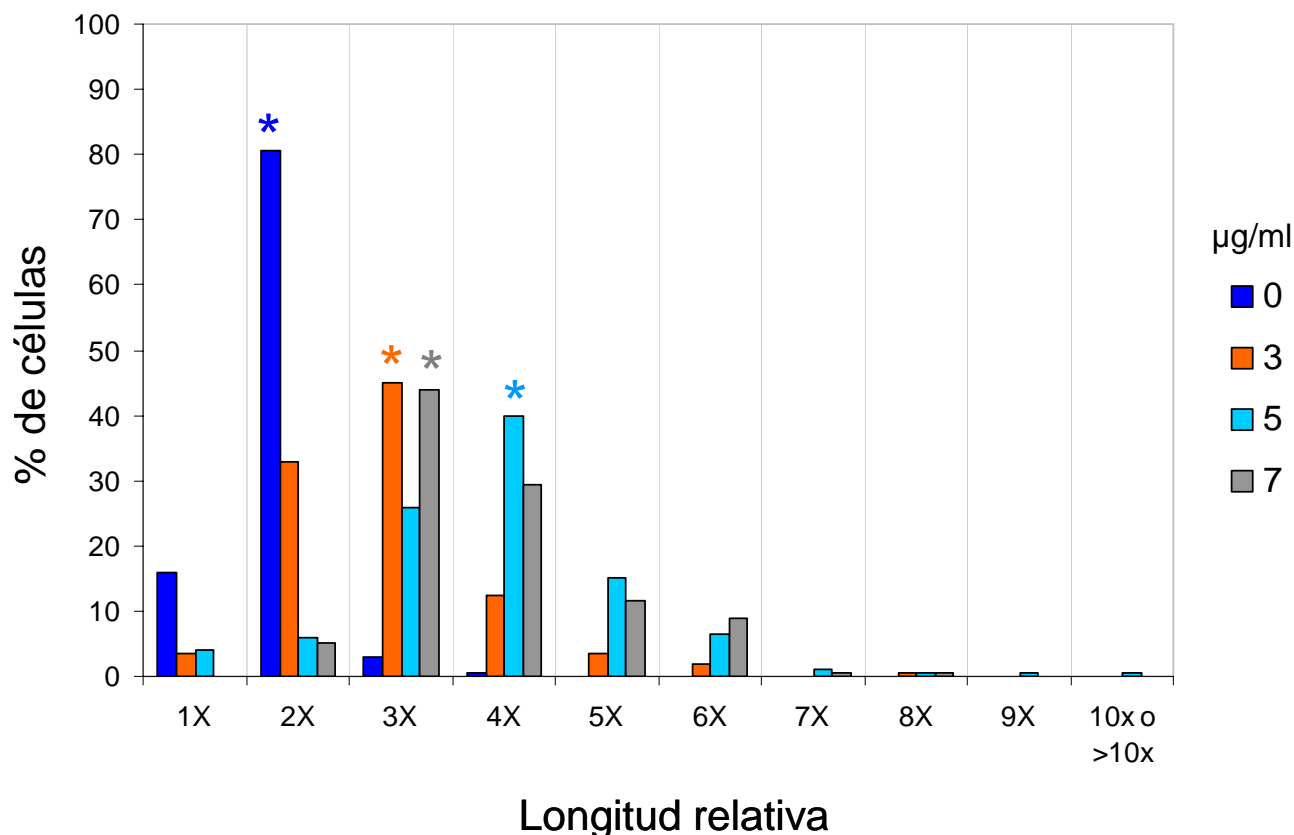


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de ácido nalidíxico (NAL) en la filamentación de células silvestres (*gyrI*⁺). Las células se crecieron a 37° C en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió NAL. Se continuó el cultivo por dos horas, se hicieron observaciones al microscopio y se tomaron fotografías. Para la inmovilización de las células se añadió instantes antes de la observación azida de sodio (0.03 %). Para más detalles de las condiciones del cultivo y de la técnica de microscopia empleada, consultar los Materiales y Métodos. Las imágenes que se muestran tienen un tamaño menor al de las imágenes que se utilizaron para realizar estas mediciones. A: control, B: 3 µg/ml, C: 5 µg/ml y D: 7 µg/ml.

En el caso de NAL se probaron las concentraciones de 3, 5 y 7 µg/ml, seleccionadas en base a reportes previos del uso de este compuesto para la inducción de SOS y para la formación de filamentos celulares ([Greenstein et al. 1981](#); [Chatterji et al. 2003](#)). Del mismo modo se seleccionó el momento oportuno para añadir el antibiótico, 0.4 unidades de absorbancia a D.O._{600 nm}, y el tiempo de exposición, 2 horas, necesario para que se realizaran varios ciclos de división celular con inhibición de la formación del septum para que se pudieran observar filamentos de un tamaño apreciable. Estas concentraciones produjeron distintos grados de filamentación, proporcionales a la dosis empleada. Como se esperaba, la ausencia de NAL en el cultivo permitió observar al microscopio una población celular altamente homogénea en cuanto a su longitud. Al tratar las células con 3 µg/ml, estas se mostraron más alargadas que las anteriores.

Del mismo modo, la concentración de 5 µg/ml permitió observar células aún más alargadas. No obstante, la dosis de 7 µg/ml produjo una ligera disminución en el porcentaje de filamentos así como en el promedio de la longitud de las células (Figura 6, Gráfica 1 y Tabla 3). Es posible que esta alta dosis afecte de manera importante la fisiología y la producción de masa celular, lo que se traduce en una disminución moderada en el porcentaje de filamentos. En base a estos resultados se eligió la dosis de 5 µg/ml como la adecuada para la inducción de SOS y formación de filamentos celulares.

En el caso de MMC, las concentraciones probadas fueron 0.03, 0.075, 0.15, 0.3 y 1 µg/ml. Estas dosis, el momento de su adición al cultivo y el tiempo esperado para su observación al microscopio, se determinaron (como en el caso de NAL) en base a reportes previos que han utilizado este compuesto para la inducción de la respuesta SOS.



Gráfica 1. Distribución porcentual de células silvestres en fase exponencial, de acuerdo a su longitud, tras dos horas de exposición a diferentes concentraciones (0, 3, 5 y 7 µg/ml) de ácido nalidíxico (NAL). Las condiciones del cultivo son las mismas que se describen en la Figura 6. Los asteriscos sobre las barras denotan los máximos obtenidos para esa dosis. Total de células analizadas para cada concentración de NAL: 200. Para la adecuada interpretación de las unidades de longitud relativa, referirse a la Tabla 2.

Tabla 3. Efecto de distintas concentraciones de ácido nalidíxico (NAL) en el porcentaje y longitud de células y filamentos.

DOSIS		0	3	5	7
µg/ml					
% FIL		0.00	11.50	34.00	30.50
L*	PROM	2.36 ± 0.66	4.40 ± 1.86	6.30 ± 2.62	6.11 ± 2.21
	MAX	6.00	14.00	22.00	15.00

L = longitud, PROM = promedio, MAX = máximo.

L* Longitud en milímetros (para más detalles ver Materiales y Métodos).

El tiempo de exposición a NAL fue de dos horas.

Las condiciones del cultivo son las descritas en la Figura 6.

Al igual que con NAL, la adición de MMC al cultivo produjo un porcentaje creciente de filamentación dependiente de la dosis. En ausencia de MMC la población se mostró altamente homogénea en cuanto a su longitud (Figura 7 control); sin embargo, la adición de MMC a concentraciones cada vez mayores incrementó sucesivamente el promedio de la longitud, la longitud máxima y heterogenizó la población (incrementó la desviación estándar) como se observa en la Gráfica 2 y Tabla 4. Dado que las dos concentraciones de MMC más bajas (0.03 y 0.075 µg/ml) produjeron un porcentaje pequeño de filamentación, mientras que las dos más altas (0.3 y 1 µg/ml) un porcentaje muy alto de filamentación, se escogió la dosis de 0.15 µg/ml para emplearla como inductor de SOS en los siguientes experimentos. A diferencia de NAL, que a grandes dosis ya no incrementó el porcentaje de filamentos, el tratamiento con MMC en su dosis más alta permitió observar una población celular integrada casi exclusivamente por filamentos de una longitud muy superior al del promedio de las células sin tratamiento con MMC (Tabla 4).

7.2.2 Efecto de NAL y MMC en la filamentación de células silvestres y *gyrI* de fase exponencial

Una vez establecidas las condiciones experimentales adecuadas, se crecieron las células *gyrI* silvestres y *gyrI* en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió a ambos cultivos, una dosis de NAL o MMC de 5 ó 0.15 µg/ml, respectivamente. Estas concentraciones para NAL o MMC se definen como dosis 1X. Posterior a la adición de estos agentes, se continuó el cultivo por un tiempo de dos horas, al término del cual, se realizaron

observaciones al microscopio óptico y se tomaron fotografías (Figuras 8 y 9).

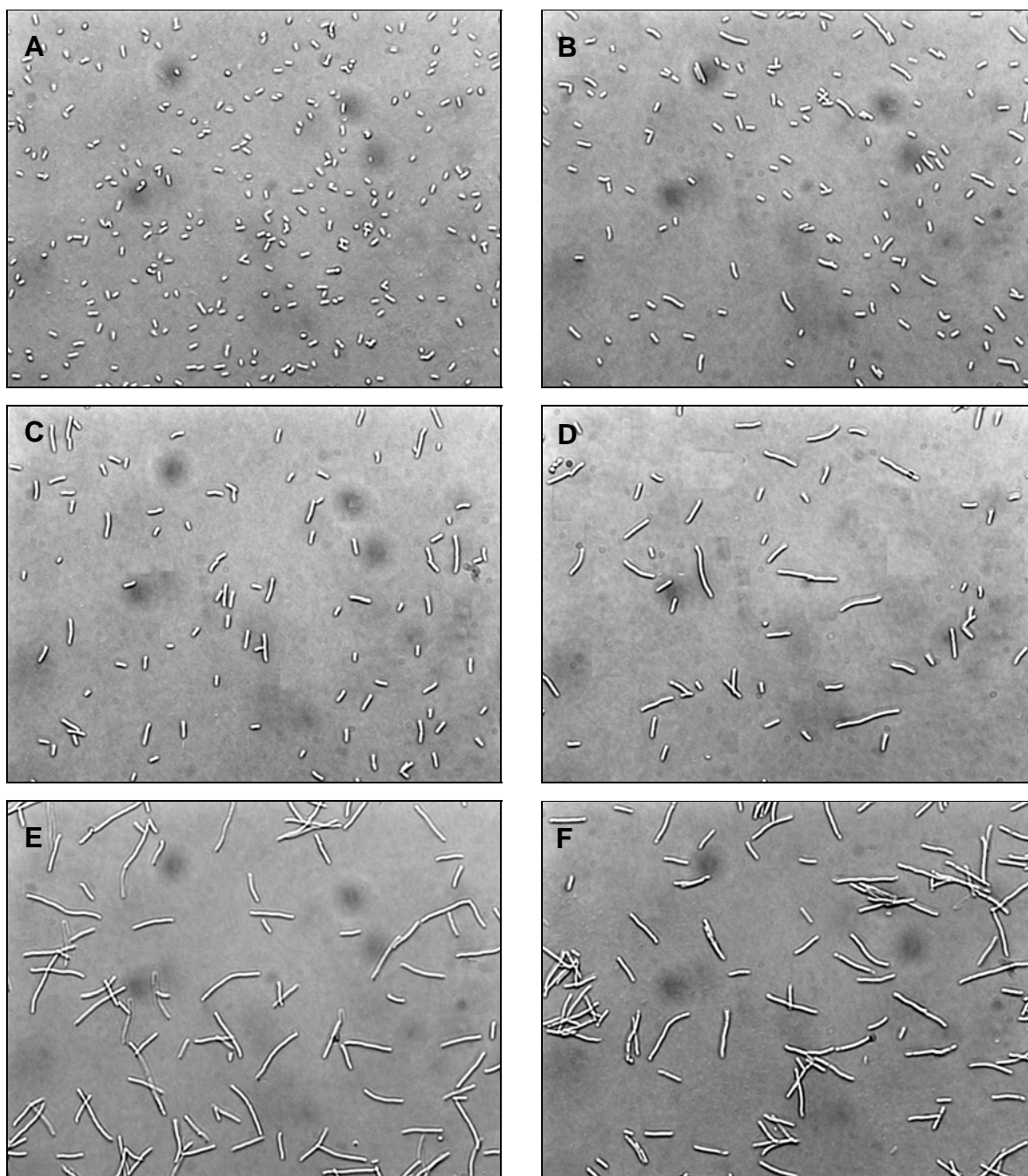
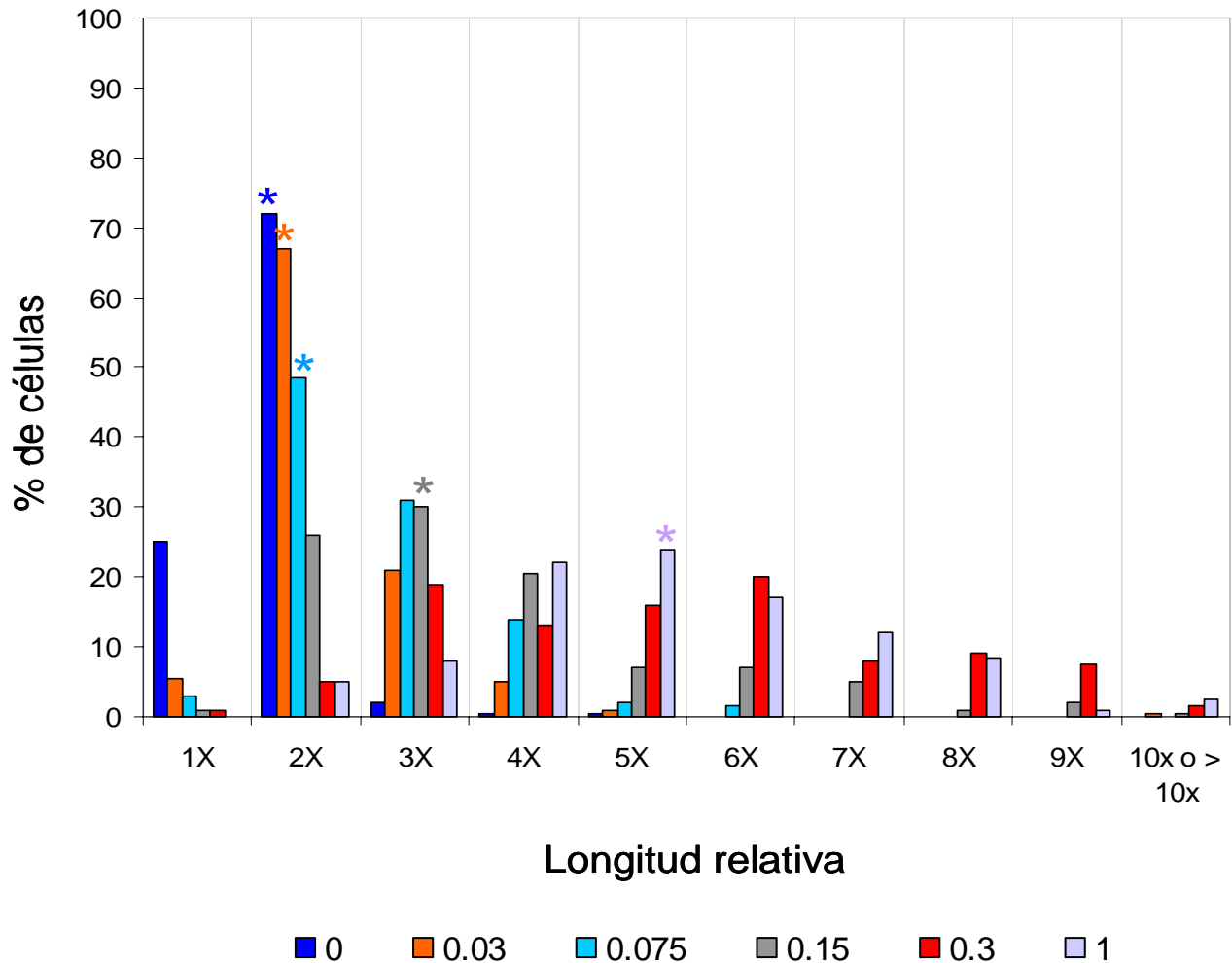


Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de mitomicina C (MMC) en la filamentación de células silvestres. Las células se crecieron a 37° C en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió MMC. Se continuó el cultivo por dos horas, se hicieron observaciones al microscopio y se tomaron fotografías. Para la inmovilización de las células se añadió instantes antes de la observación azida de sodio (0.03 %). Para más detalles de las condiciones del cultivo y de la técnica de microscopía empleada, consultar los Materiales y Métodos. A: control, B: 0.03 µg/ml, C: 0.075 µg/ml, D: 0.150 µg/ml, E: 0.30 µg/ml y F: 1 µg/ml.

En imágenes impresas similares a las de las Figuras 8 y 9, se realizó una medición de la longitud de 200 células. Como puede observarse en las Gráficas 3 y 4, la distribución por longitud celular de la población de células *gyrI^t* y *gyrI* fue muy similar en ausencia de NAL o MMC. En ambos casos, la ausencia de estos agentes produjo poblaciones sumamente homogéneas en cuanto a su morfología (Figuras 8 y 9) con valores promedio de longitud muy cercanos a la media, esto es 2.13 y 2.84 mm, respectivamente (Tablas 5 y 6).



Gráfica 2. Distribución porcentual de células silvestres, de acuerdo a su longitud, tras dos horas de exposición a diferentes concentraciones (0, 0.03, 0.075, 0.15, 0.3 y 1 µg/ml) de mitomicina C (MMC). Las condiciones del cultivo son las descritas en la Figura 7. Los asteriscos sobre las barras denotan los máximos obtenidos para esa dosis. Total de células analizadas para cada concentración de MMC: 200. Para la interpretación adecuada de las unidades de longitud relativa, referirse a la Tabla 2.

En el caso de la adición de NAL a las células *gyrI^t* y *gyrI*, se presentaron ligeras diferencias.

Por una parte, el porcentaje de filamentación de las células silvestres fue de 29.33, mientras que el de las células *gyrI* fue de 35.17, o sea 5.84 % mayor que en aquellas; por otra parte, el registro de la longitud máxima tras el tratamiento con NAL fue muy superior en la cepa *gyrI* (39 mm) alcanzando un valor casi tres veces mayor que en la *gyrI*⁺ (14 mm) (Tabla 5), lo cual se ve reflejado en la distribución poblacional por longitud celular, que también mostró un ligero desplazamiento hacia las mayores longitudes, con respecto a la distribución de las células *gyrI*⁺ (Gráfica 3).

Tabla 4. Efecto de distintas concentraciones de mitomicina C (MMC) en el porcentaje y longitud de células y filamentos en la cepa MG1655.

DOSIS		0	0.03	0.075	0.15	0.3	1
µg/ml							
% FIL		0.5	4	15	41.5	71.5	84
L*	PROM	2.20 ± 0.76	3.25 ± 1.96	4.02 ± 1.77	6.09 ± 2.44	9.47 ± 4.07	9.39 ± 30.87
	MAX	8.5	24.0	11.0	20.0	23.0	30.0

L = longitud, PROM = promedio, MAX = máxima longitud.

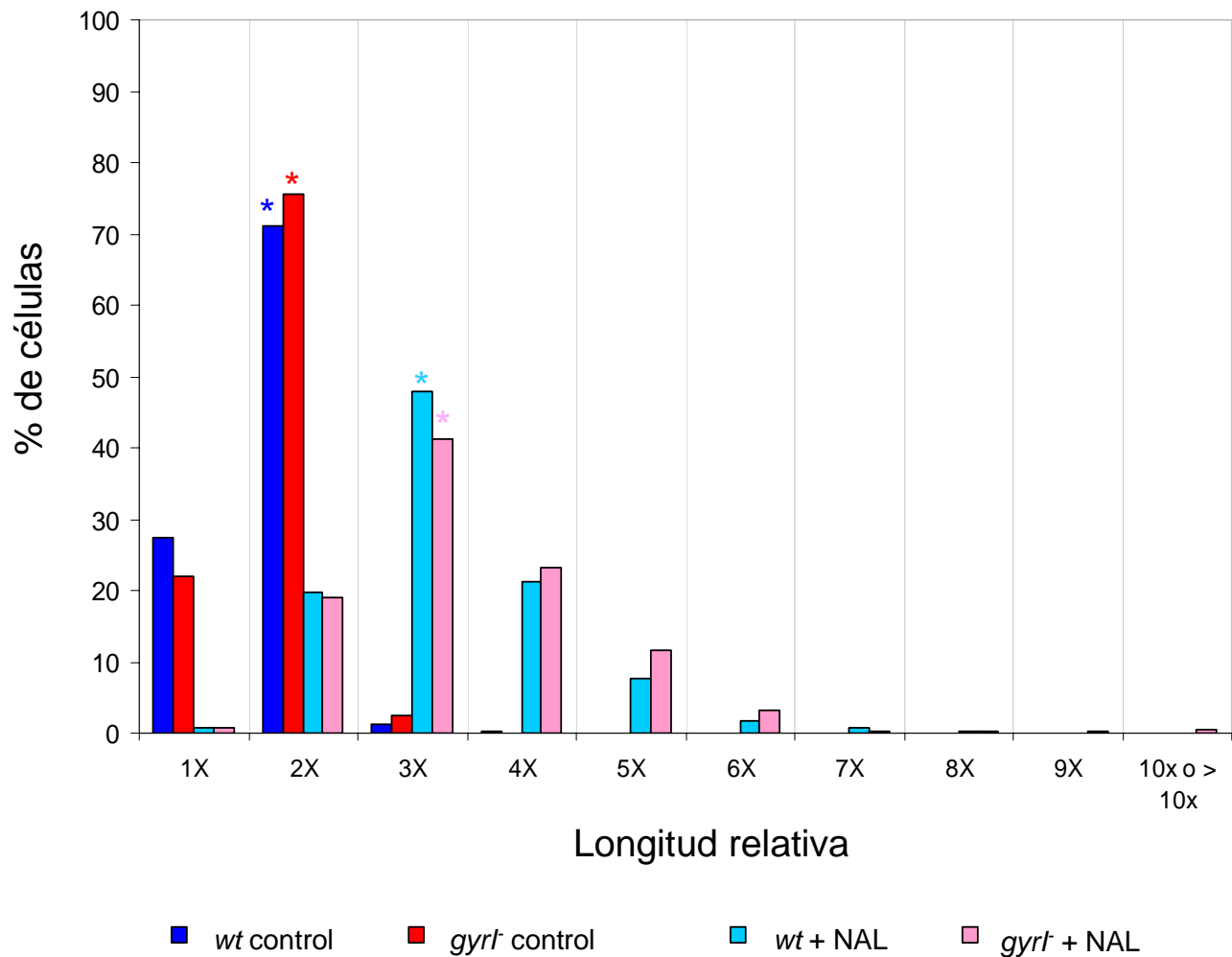
L* Longitud en milímetros (para más detalles ver Materiales y Métodos).

Las condiciones del cultivo son las descritas en la Figura 6.

En el caso de las células tratadas con mitomicina C, el registro de la longitud mayor correspondió a las células *gyrI* con un valor de 40 mm, mientras que en la *gyrI*⁺ fue de 23 mm (1.7 veces menor), sin embargo, las células *gyrI*⁺ obtuvieron un porcentaje de filamentación de un valor casi 15 % mayor que el de las células *gyrI* (44.17 % y 30.17 %, respectivamente) (Gráfica 4 y Tabla 6), situación contraria a la adición de NAL.

Recapitulando, se tiene que la intensidad de la respuesta SOS inducida por NAL, un inhibidor de la subunidad GyrA de Girasa, es moderadamente más intensa en las células *gyrI* que en las células silvestres. Así, se tiene que el porcentaje de filamentación en *gyrI*⁺ y *gyrI* es de 29.3 contra 35.1 % y la longitud promedio de los filamentos de 14 contra 39 mm, respectivamente. Este resultado sugiere que durante la respuesta SOS, el aumento en la cantidad de Gyrl en las células silvestres, protege ligeramente a estas células del efecto de NAL, posiblemente debido al secuestro de girasa. En el caso del SOS inducido por MMC, una molécula que, como ya se mencionó, se intercala en el DNA y se une covalentemente a las dos hebras, no se observó esta

protección. Al contrario, los resultados con MMC muestran que el porcentaje de filamentos y la longitud promedio de éstos son mayores en la cepa silvestre que en la *gyrf*, teniendo un valor de 44.17 contra 30.1% y de 6.0 contra 5.4mm, respectivamente.



Gráfica 3. Distribución porcentual de células de *gyrf* silvestre (*wt*) y *gyrf*, de acuerdo a su longitud, tras dos horas de exposición ácido nalidíxico (NAL) a una concentración de 5 µg/ml. Las células se crecieron en medio rico LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió NAL. Los asteriscos denotan el máximo obtenido para esa categoría. Resultado de tres experimentos cada uno con 200 células medidas. Para la adecuada interpretación de las unidades de longitud relativa referirse a la Tabla 2.

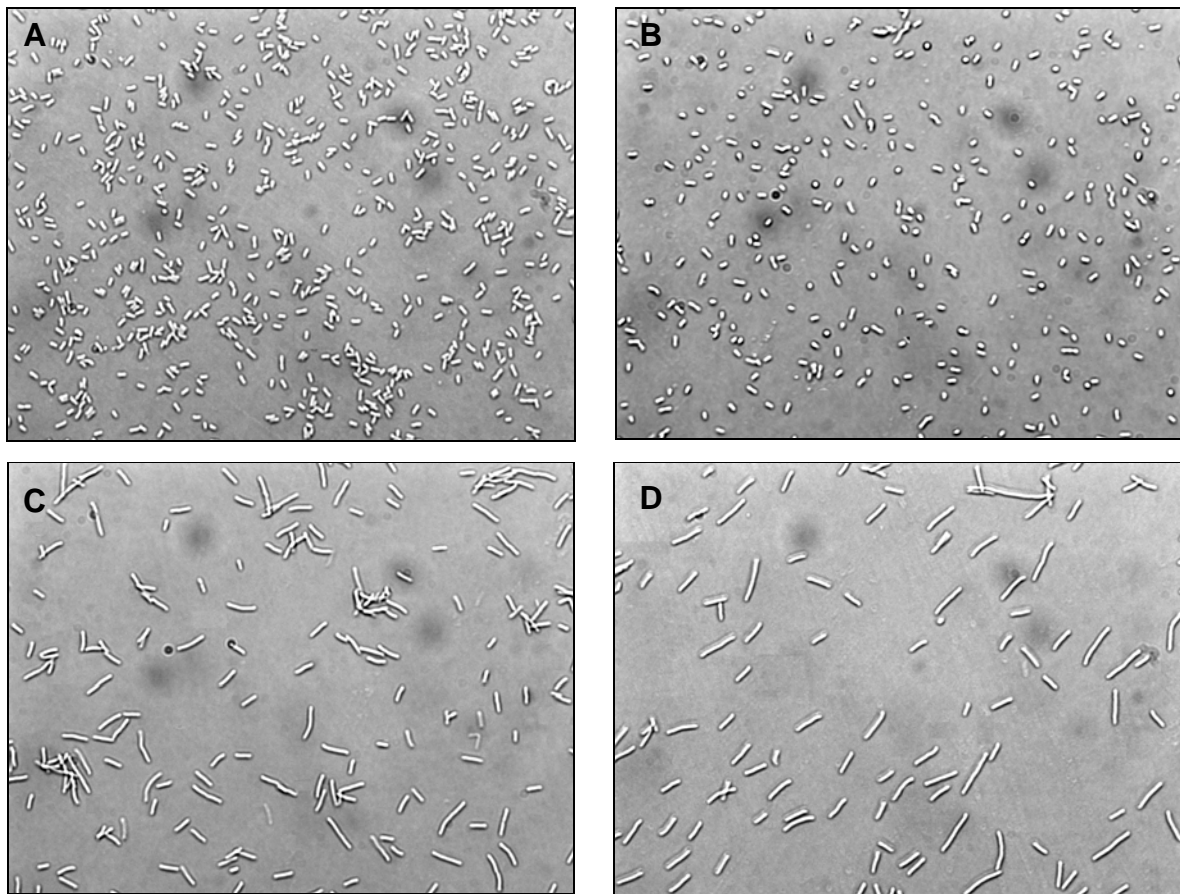


Figura 8. Efecto de ácido nalidíxico (NAL) en la filamentación de células silvestres y *gyrI*. Las células se crecieron a 37° C en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió NAL. Se continuó el cultivo por dos horas, se hicieron observaciones al microscopio y se tomaron fotografías. Para la inmovilización de las células se añadió instantes antes de la observación azida de sodio (0.03 %). Para más detalles de las condiciones del cultivo y de la técnica de microscopía empleada, consultar los Materiales y Métodos. A: *gyrI* silvestre control, B: *gyrI* control, C: *gyrI* silvestre + NAL y D: *gyrI*+ NAL.

Tabla 5. Efecto de 5 µg/ml de ácido nalidíxico (NAL) en el porcentaje y la longitud de células y filamentos de fase exponencial, tras dos horas de exposición a este agente.

CÉLULAS		<i>wt</i>	<i>gyrI</i>	<i>wt</i>	<i>gyrI</i>
NAL		-	-	+	+
% FIL		0.17	0.00	29.33	35.17
L*	PROM	2.13 ± 0.67	2.25 ± 0.65	5.16 ± 1.92	5.55 ± 2.71
	MAX	7.00	5.00	14.00	39.00

L = longitud, PROM = longitud promedio, MAX = máxima longitud.

L* Longitud en milímetros (para más detalles ver Materiales y Métodos).

7.2.3 Efecto de NAL y MMC en la sobrevivencia de células silvestres y *gyrI* de fase exponencial

Con el objetivo de corroborar los resultados anteriores sobre la respuesta al daño en el DNA inducida por NAL o MMC, se determinó el efecto de estos mismos compuestos en la sobrevivencia de ambos tipos de células (*gyrI*⁺ y *gyrI*⁻). Para ello se utilizó el método de cuentas viables por diluciones seriales y las condiciones de crecimiento y concentraciones de NAL y MMC, descritos en los anteriores experimentos. En resumen, se crecieron dos cultivos (uno para células *gyrI*⁺ y otro para células *gyrI*⁻) en medio LB, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se extrajo una muestra para determinar su viabilidad. A este momento se le llamó *tiempo 1*, o T1. Inmediatamente después se añadió a ambos cultivos una dosis de NAL o de MMC (5 y 0.15 µg/ml, respectivamente), y se continuó el crecimiento por espacio de dos horas. Al término de este tiempo, se volvió a extraer una muestra para determinar la viabilidad. A este segundo momento se le llamó *tiempo 2* o T2.

En la gráfica 5 se muestra el resultado de un experimento, representativo de seis repeticiones del ensayo de viabilidad anteriormente descrito. Como se observa en la Gráfica 5, en el *tiempo 1* (previo al tratamiento con los agentes) ambos tipos de células (*gyrI*⁺ y *gyrI*⁻), alcanzan un número muy similar de UFC/ml (~ 3-5 X 10⁸), lo cual sugiere que la proteína Gyrl no es importante para la viabilidad celular, como reportó Nakanishi *et al.* 1998, tras observar que la expresión del mRNA antisentido de *gyrI* disminuía la viabilidad. Esto también se observa en el *tiempo 2* en ausencia de cualquiera de los dos agentes inductores de SOS, alcanzando ambas ~2 X 10⁹ UFC/ml. Por otra parte, tras dos horas de exposición a NAL se aprecia una muy ligera diferencia entre las células *gyrI*⁺ y *gyrI*⁻, siendo este último tipo de células las más afectadas por el agente, sin embargo, esta ligera diferencia no resultó reproducible en todas las repeticiones del experimento, encontrándose por el contrario fluctuaciones sin una tendencia clara. En el caso de la exposición a MMC se observa en ambas cepas un poder letal menor que el observado anteriormente para NAL, sin embargo, tampoco se apreciaron diferencias totalmente reproducibles entre la viabilidad de ambos tipos celulares. Es de destacar que trabajos previos que determinaron la viabilidad frente a MMC a dosis similares a las empleadas en este trabajo, corroboran nuestros datos de viabilidad con este agente (Suzuki y Kilgore, 1966; Otsuji, 1967).

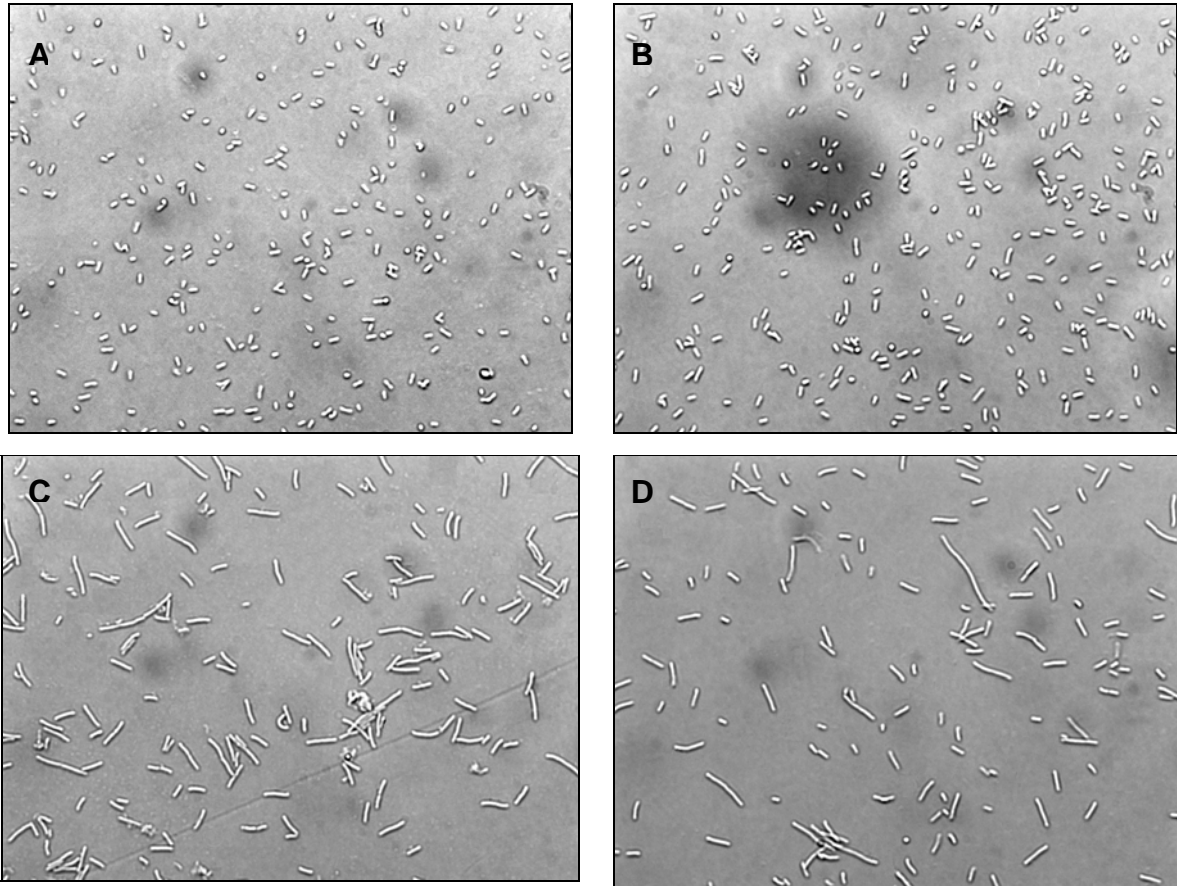
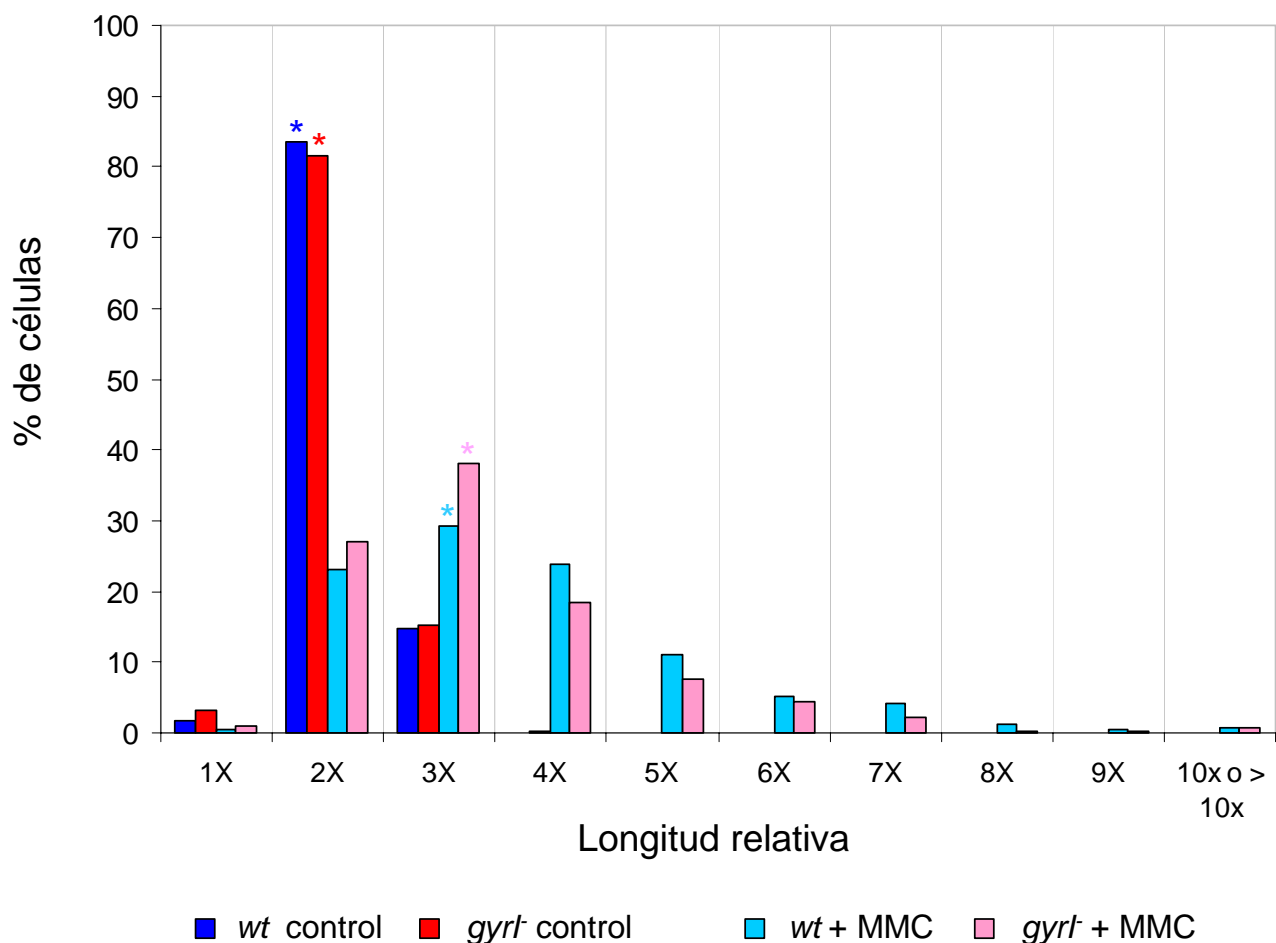


Figura 9. Efecto de 0.15 $\mu\text{g/ml}$ MMC en la filamentación de células silvestres (*gyrI*⁺) y *gyrI*⁻. Las células se crecieron a 37° C en medio LB hasta una D.O._{600nm} de 0.4, momento en el cual se añadió MMC. Se continuó el cultivo por dos horas, se hicieron observaciones al microscopio y se tomaron fotografías. Para la inmovilización de las células se añadió instantes antes de la observación azida de sodio (0.03 %). Para más detalles de las condiciones del cultivo y de la técnica de microscopia empleada, consultar los Materiales y Métodos. A: *gyrI*⁺ control, B: *gyrI*⁻ control, C: *gyrI*⁺ + MMC, D: *gyrI*⁻ + MMC.



Gráfica 4. Distribución porcentual de células silvestres (*wt*) y *gyrI*, de acuerdo a su longitud, tras dos horas de exposición a mitomicina C (MMC) en una dosis de 0.15 µg/ml. Las células se crecieron en medio rico LB hasta una D.O. _{600nm} de 0.4 momento en el cual se añadió la MMC. Los asteriscos sobre las barras denotan los máximos obtenidos para esa dosis. Resultado de tres experimentos, en cada uno se midieron 200 células. Para la adecuada interpretación de las unidades de longitud relativa referirse a la Tabla 2.

Tabla 6. Efecto de 0.15 µg/ml de MMC en el porcentaje y la longitud de células y filamentos de fase exponencial, tras dos horas de exposición a este agente.

CÉLULAS		<i>wt</i>	<i>gyrI</i>	<i>wt</i>	<i>gyrI</i>
MMC		-	-	+	+
% FIL		0.00	0.00	44.17	30.17
L	PROM	2.84 ± 0.72	2.83 ± 0.72	6.09 ± 3.17	5.43 ± 3.41
	MAX	5.50	6.00	23.00	40.00

L = longitud, PROM = longitud promedio, MAX = longitud máxima.

L* Longitud * En milímetros (para más detalles ver Materiales y Métodos).

7.3 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN PROTECTORA DE *Gyrl* CONTRA AGENTES QUE DAÑAN EL DNA, NAL Y MMC, EN CÉLULAS EN FASE ESTACIONARIA TEMPRANA

Como se ha mencionado anteriormente, *gyrl* incrementa su expresión en fase estacionaria temprana, pues está regulado positivamente por RpoS. Esto llevó a suponer que aún cuando el papel protector de *Gyrl* no se había observado claramente en fase exponencial, posiblemente sí se podría observar en fase estacionaria temprana, cuando todavía quedan células que pueden continuar creciendo con cantidades traza de nutrientes o reutilizando algunos de ellos. Este crecimiento limitado, en presencia de daño espontáneo o inducido (NAL, MMC) en el DNA, puede también generar filamentación celular. Una posibilidad, en el caso de daño espontáneo, es que al no aumentar la cantidad de *Gyrl* en la fase estacionaria temprana en células *gyrl*⁻, el número de moléculas de girasa unidas al DNA es mayor. Girasa, en condiciones de limitación de nutrimentos y por tanto de bajo ATP, podría no religar eficientemente el DNA generando daño en esta molécula e induciendo la respuesta SOS. En las células silvestres, el aumento en la cantidad de *Gyrl* en el inicio de la fase estacionaria tendría una función de protección al daño en el DNA, ya que su interacción con girasa disminuiría el número de girasas unidas al DNA.

7.3.1 Efecto de dosis 1X y 5X de NAL y MMC en la filamentación de células silvestres y *gyrl* de fase estacionaria temprana

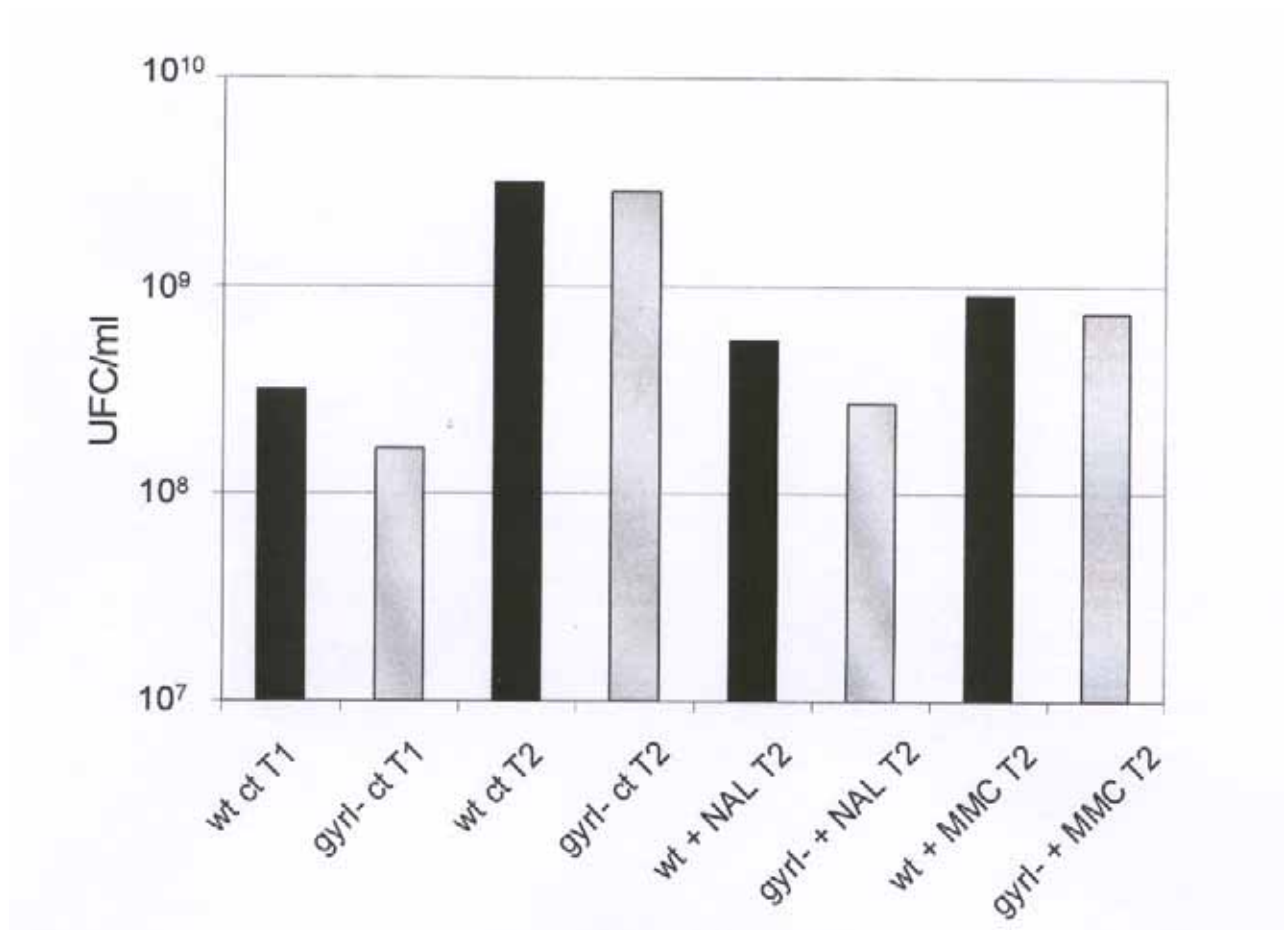
Para este estudio se recurrió a las mismas metodologías empleadas en la fase exponencial, es decir, observación y cuantificación de filamentos celulares al microscopio y determinación de la viabilidad celular, pero en fase estacionaria. En breve, se crecieron cultivos celulares en condiciones similares a las anteriormente descritas para la fase exponencial: medio LB, 37° C, agitación y aireación constante, etc., excepto que la adición de NAL o MMC se llevó a cabo hasta que el cultivo alcanzó un valor de D.O.₆₀₀ de 1.6, momento que también se llamó *tiempo 1* ó T1. Posterior a la adición de uno u otro agente, se continuó el cultivo por dos horas, se hicieron las observaciones al microscopio y se capturaron las imágenes.

Las imágenes obtenidas al microscopio para la observación de filamentos celulares de fase estacionaria temprana se presentan en la Figura 10. Como puede observarse en todas las imágenes, no se observa filamentación celular en las células tratadas con alguno de los agentes inductores de SOS (datos de longitud celular, longitud promedio y desviación omitidos). Debido a esto, se repitió el experimento aumentando la concentración cinco veces (dosis 5X) para ambos agentes, sin apreciarse nuevamente filamentación celular (imágenes y datos de longitud

promedio, máxima y desviación omitidos).

7.3.2 Efecto de NAL y MMC en la sobrevivencia de células silvestres y *gyrI* de fase estacionaria

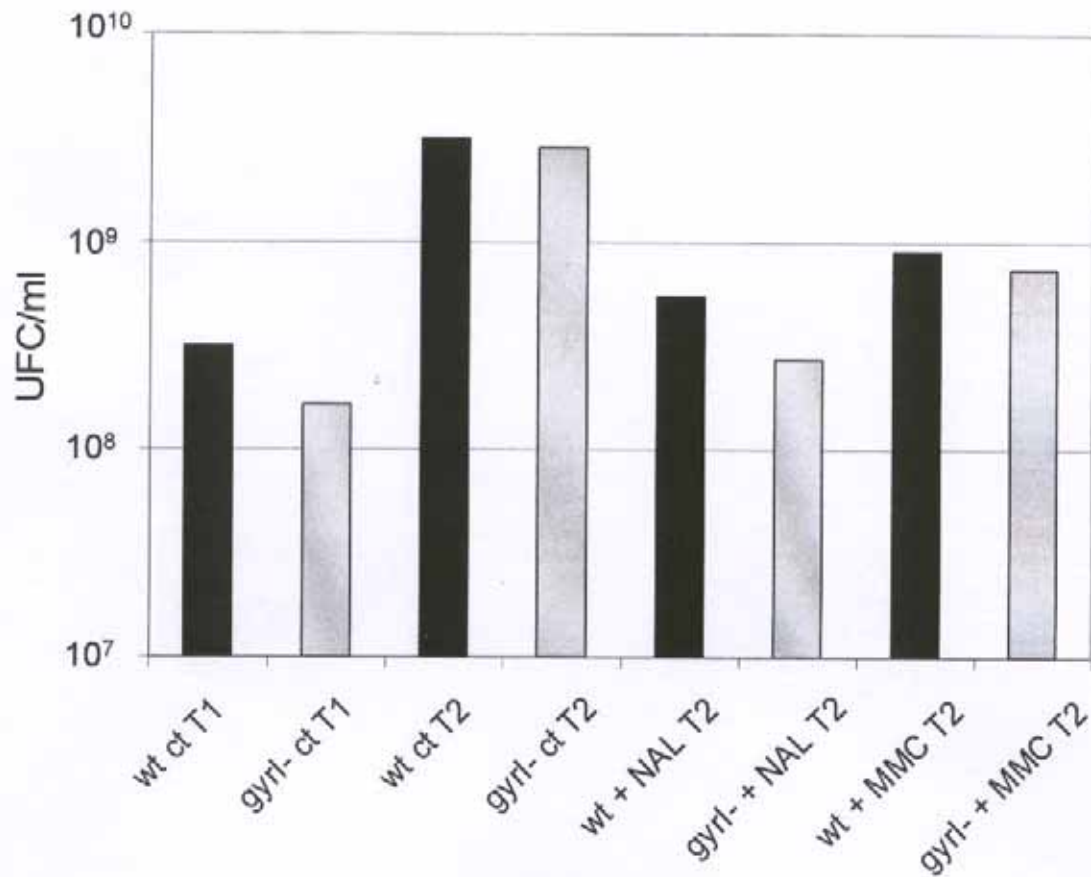
Ya que la filamentación no permitió definir diferencias en la fase estacionaria, se empleó la viabilidad como monitor alternativo del daño al DNA, empleando las condiciones de cultivo y concentraciones de NAL y MMC utilizados para los experimentos de filamentación de fase estacionaria. Como se mencionó anteriormente, en esta fase se utilizaron dos concentraciones de ambos agentes (1X y 5X).



Gráfica 5. Efecto del ácido nalidíxico (NAL) o mitomicina C (MMC) en la viabilidad de células silvestres (*wt*) y *gyrI* durante la fase exponencial (0.4 O.D. _{600 nm} = 3 horas de crecimiento). Las células se crecieron en medio LB hasta alcanzar esta densidad, momento en el cual se añadió una dosis de NAL o MMC de 5 y 0.15 µg/ml, respectivamente. T1 = momento previo a la adición de NAL o MMC. T2 = dos horas después de T1. ct representa experimento sin NAL o MMC. Se muestran los valores de un experimento, representativo de 6 repeticiones.

Como muestra la gráfica 6, el número de UFC se mantiene estable a la entrada de la fase estacionaria (T1) y dos horas después (T2), con ligeras diferencias de poca relevancia. Esto concuerda con las expectativas dado que la viabilidad en cultivos con medio LB decae en forma significativa a partir de las 30 horas; teniendo para las 50 horas en fase estacionaria un promedio de 65% de células viables, 30% de células muertas y un 5% de células incapaces de reanudar el crecimiento (Ericsson *et al.* 2000). Por otra parte, cuando las células con el alelo *gyrI* silvestre y *gyrI* se enfrentaron a NAL 1X, no se observan diferencias en la viabilidad de una cepa con respecto a la otra, ni de éstas últimas con aquellas sin NAL. Por su parte, con la dosis 5X de este mismo agente, se observa una apenas apreciable disminución de la viabilidad tanto en la cepa silvestre como en la *gyrI*. Cabe mencionar que esta pequeña disminución en la viabilidad se ha observado aun a dosis de 10 µg/ml en fase estacionaria (Greenstein *et al.*, 1981). En el caso de las células tratadas con MMC, la Figura 6 muestra que el efecto letal de esta sustancia es apenas mayor que el de NAL, sin embargo, tampoco se revelaron diferencias de importancia en la viabilidad, entre las cepas silvestre y *gyrI*, para ambas dosis (1X y 5X).

Los resultados obtenidos con células en fase estacionaria temprana, al igual que los de células de fase exponencial, sugieren que la función protectora de Gyrl en ausencia o en presencia de inductores de la respuesta SOS como las quinolonas (NAL) que inhiben a girasa, o agentes que dañan directamente el DNA (MMC), no es muy importante en condiciones fisiológicas.



Gráfica 6. Efecto de a. nalidíxico (NAL) y mitomicina C (MMC) en la viabilidad de células silvestres (*wt*) y *gyrl*⁻ durante la fase estacionaria temprana (1.6 D.O._{600 nm} = 6 horas de crecimiento). Las células se crecieron en medio LB, hasta ésta densidad, momento en el cual se añadió una dosis 1X de NAL o MMC de 5 y 0.15 µg/ml, respectivamente. T1 es el momento previo de la adición de NAL o MMC. T2 significa dos horas después de T1. 5X representa una dosis cinco veces mayor. ct representa experimento sin NAL o MMC. Se muestran los valores de un experimento, representativo de seis repeticiones.

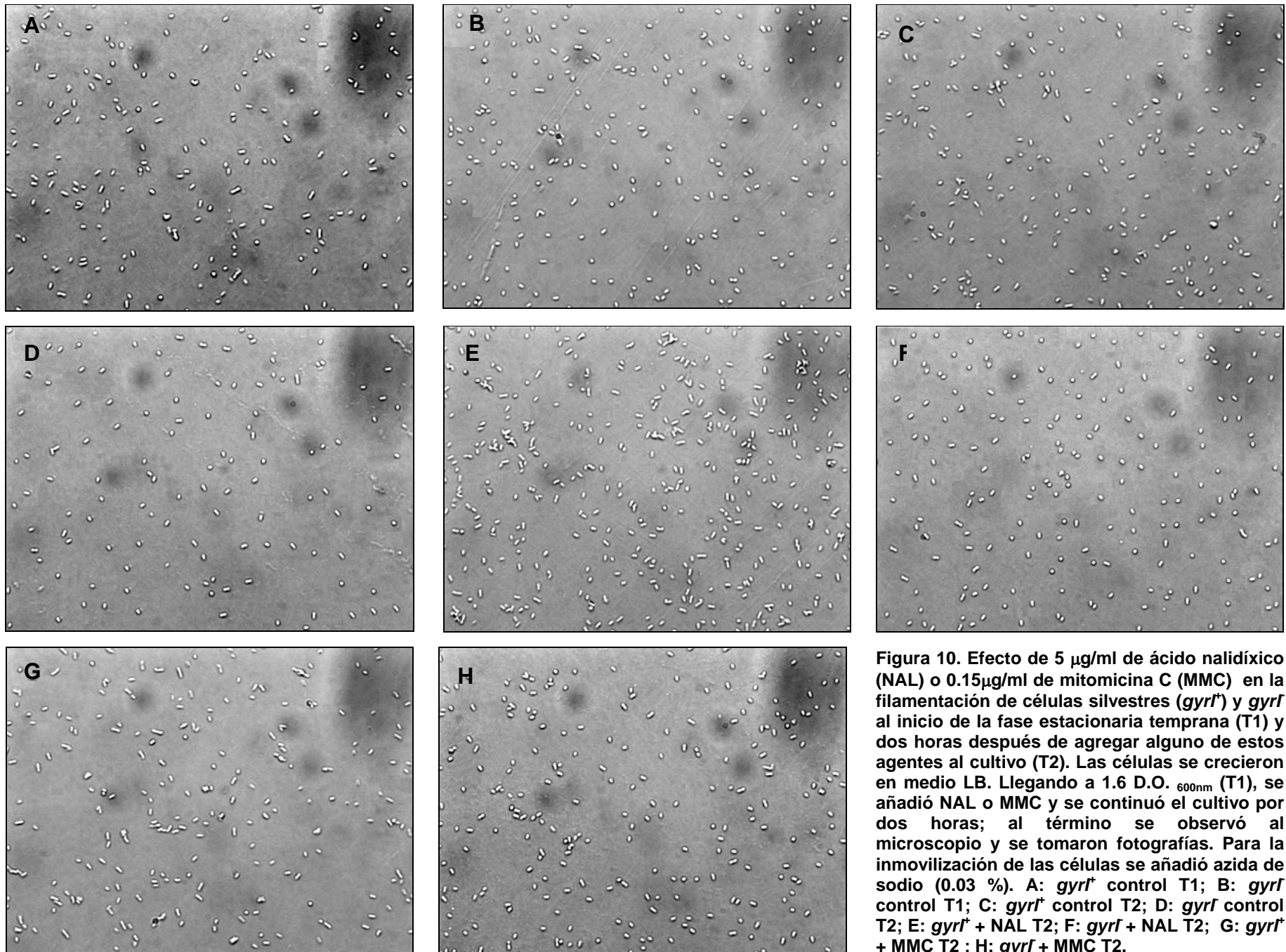


Figura 10. Efecto de 5 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico (NAL) o 0.15 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (MMC) en la filamentación de células silvestres (*gyrf+*) y *gyrf-* al inicio de la fase estacionaria temprana (T1) y dos horas después de agregar alguno de estos agentes al cultivo (T2). Las células se crecieron en medio LB. Llegando a 1.6 D.O. $_{600\text{nm}}$ (T1), se añadió NAL o MMC y se continuó el cultivo por dos horas; al término se observó al microscopio y se tomaron fotografías. Para la inmovilización de las células se añadió azida de sodio (0.03 %). A: *gyrf+* control T1; B: *gyrf+* control T1; C: *gyrf+* control T2; D: *gyrf-* control T2; E: *gyrf+* + NAL T2; F: *gyrf-* + NAL T2; G: *gyrf+* + MMC T2 ; H: *gyrf-* + MMC T2.

8. DISCUSIÓN

La función de la proteína Gyrl en condiciones fisiológicas, si bien ha sido estudiada por varios grupos de investigación, no está clara, puesto que su función se ha estudiado principalmente en condiciones *in vitro* o en células en fase exponencial en las que se indujo su sobreexpresión. En conjunto los resultados publicados muestran que la proteína Gyrl es un inhibidor de girasa que “secuestra” a la enzima impidiendo su unión al DNA y a la vez es una proteína importante para proteger a la célula del daño en el DNA causado por varios inhibidores de la enzima (MccB17, CcdB y quinolonas) y por agentes que dañan directamente al DNA (MMC, MNNG). Sin embargo existen resultados contradictorios sobre su función protectora. Por ejemplo, se ha reportado que su sobreproducción protege contra el daño ocasionado por quinolonas (Chatterji *et al.* 2003), MccB17 (Baquero *et al.* 1995) y MMC (Wei, 2004); sin embargo, este papel protector no se puede generalizar ya que al menos un grupo no observa una protección similar contra MMC y quinolonas (Baquero *et al.* 1995). De igual forma, se ha reportado que la ausencia o sobreproducción de Gyrl disminuye la viabilidad y altera la morfología de la célula (formando filamentos) y del nucleoide; sin embargo, Baquero *et al.* 1995 encuentran que la interrupción del mismo gen por inserciones de DNA no tiene efecto en la viabilidad.

En cuanto a la regulación de la expresión de *gyrl*, se ha reportado que la región promotora de este gen tiene una “caja LexA” la cual es una característica que comparte con otros genes importantes que integran la respuesta SOS. Esta “caja LexA” al ser mutada (*lexA1*) impide que la expresión de *gyrl* aumente cuando se daña el DNA con MccB17 o MMC y se induce el regulón LexA de la respuesta SOS (Baquero *et al.* 1995). Además de este trabajo, otros autores han corroborado la inducción de *gyrl* en células tratadas con MMC (Khil y Camerini-Otero, 2002), quinolonas y UV (Chatterji *et al.* 2003). Por otra parte, Baquero *et al.* 1995 y Nakanishi *et al.* 1997 encuentran que *gyrl* también se induce al inicio de la fase estacionaria en forma dependiente de RpoS (Oh *et al.*, 2001). A la fecha, los únicos genes conocidos que están regulados por LexA y RpoS son *gyrl* y *dinB* que codifica para la polimerasa de DNA Pol IV (Layton y Foster, 2003).

Actualmente se sabe que otras bacterias y eucariontes tienen proteínas con una función similar a la proteína Gyrl de *E. coli*. Estas proteínas, Qnr, MfpA, y Mms22p, también otorgan resistencia contra las quinolonas, o en el caso de mMS22P una proteína de levadura, contra inhibidores de la Topoisomerasa II, reduciendo la cantidad de complejos estables girasa-DNA o cortes al DNA (Tran *et al.* 2005). Estas funciones aparentemente contradictorias de inhibición de la topoisomerasa II de bacterias o girasa y de la topoisomerasa II de eucariontes, y de resistencia

frente a inhibidores de la enzima se plantean como una ventaja final de estas proteínas, ya que la reducción en la actividad de la topoisomerasa II puede ser compensada por el control homeostático de las otras topoisomerasas celulares, mientras que bastan unos cuantos cortes en la molécula de DNA para ocasionar la muerte celular (Chatterji y Nagaraja, 2002).

En este trabajo se evaluó el posible papel protector que otorga la proteína Gyrl a las células que se enfrentan a moléculas, que por mecanismos distintos, son capaces de dañar el DNA, detener la replicación e inducir la respuesta SOS. Esta evaluación se llevó a cabo en dos condiciones que inducen un incremento de la expresión de la proteína: inducción de la respuesta SOS en células en fase exponencial por NAL, un inhibidor de girasa, o MMC, un alquilante de DNA y exposición a estos dos agentes de células en la fase estacionaria. Los experimentos se realizaron en las cepas de *E. coli* MG1655 y FB20566 (MG1655 pero *gyrl*) sin recurrir a la sobreproducción de la proteína Gyrl. Para estudiar la respuesta celular en presencia o ausencia de la proteína Gyrl se determinaron dos parámetros. Por una otra parte, se realizó un análisis morfológico de las células para determinar el porcentaje de filamentos y su longitud. Este análisis es un método sencillo y confiable para evaluar la intensidad de la respuesta SOS. Si bien existe al menos una vía alterna de filamentación, independiente de la inducción de *sulA* (*sfiA*), esta última, al igual que aquella, depende de *lexA* y de la presencia de DNA dañado (Hill, 1997). Por otra se determinó la viabilidad celular para evaluar el posible papel protector de Gyrl ante dos agentes que dañan al DNA.

Los resultados obtenidos de la inducción de la respuesta SOS con NAL en fase exponencial permiten observar una ligera diferencia entre las células *gyrl* silvestre y *gyrl*, siendo en éstas últimas donde el porcentaje de filamentos celulares y la longitud de los mismos es mayor. Esto podría sugerir que en presencia de Gyrl hay un daño menor al DNA y por tanto una respuesta SOS menos intensa, lo que se refleja en un número menor de células filamentadas en el cultivo. Esta ligera diferencia no se refleja en la viabilidad determinada por el método de diluciones seriales. Este método en general proporciona datos con una desviación estándar grande lo que no permite detectar diferencias pequeñas entre el número de células viables presentes en cultivos en condiciones experimentales diferentes (Niemelä, 2003). No obstante, la ligera protección *in vivo* (filamentación) que aquí se reporta, concuerda con la protección que observa Chatterji *et al.* por otros métodos también *in vivo* (diámetro de la zona de inhibición y actividad de B-galactosidasa en una fusión *sbmC-lacZ*). Por otra parte, los resultados de filamentación en fase exponencial con MMC también muestran diferencias entre ambas cepas, aunque en este caso es la cepa silvestre la que mostró mayor filamentación. Si bien no se esperaba una mayor

filamentación en la cepa silvestre, sino algo similar a lo observado con el tratamiento de NAL, esto puede deberse a la diferencia que existe entre ambas sustancias en su mecanismo de acción a nivel molecular. Por otra parte, las pruebas de viabilidad frente a MMC presentaron problemas para la reproducibilidad; sin embargo, no mostraron diferencias ni tendencias claras hacia una cepa o la otra. De nuevo, fue el análisis célula por célula de la magnitud de SOS lo que sí mostró diferencias ligeras aunque constantes entre las células *gyrl* silvestre o *gyrl*. Estas ligeras diferencias en la inducción de SOS a nivel de células individuales muestra claramente que la población celular no responde en forma homogénea al tratamiento con ninguno de los dos agentes empleados (NAL o MMC), hecho que también se ha reportado con el uso de fusiones *sulAp-gfp*, lo cual ha permitido distinguir en una misma población genéticamente idéntica una variedad de grados de inducción de SOS de célula a célula (McCool *et al.* 2004). Es importante hacer notar que tanto el método que se empleó para determinar la magnitud de SOS como el mencionado anteriormente, capturan una imagen y no un proceso, esto es, que permite ver únicamente un instante en la respuesta de las bacterias, mas no la dinámica total de la respuesta, desde que alguna de las dos sustancias se agrega al medio hasta que se genera la muerte, o hasta que el daño es reparado y continua la división celular.

Los resultados de la inducción de SOS en fase estacionaria no presentaron filamentos. Esto pudo deberse a varios motivos. Muy probablemente el número de células capaces de formar filamentos en estas condiciones (de muy bajos nutrientes) es bajo, y para detectar la presencia de filamentos se tiene que observar un número muy grande de células, si es que las hubiese. Otra posibilidad se puede atribuir a que la respuesta SOS no fue inducida, tal cual sucede con las células en condiciones de ayuno de arginina (fase estacionaria) y tratadas con UV (que también daña el DNA) las cuales responden al daño induciendo la respuesta SOS únicamente hasta que se reasume el crecimiento, teniendo al glicerol como única fuente de carbono (Janion *et al.*, 2002). El tercer motivo, tiene que ver con el incremento en la resistencia frente a antibióticos y otros agentes dañinos que muestran las células en la fase estacionaria, ya sea debido a la activación de los genes de esta fase, muchos de ellos activos también durante condiciones de estrés (tabla 1), o a los cambios en la pared y membrana celulares, los cuales pudieran impedir el ingreso de dichos agentes a la célula.

Pese a las limitaciones de los métodos empleados, los resultados obtenidos en las condiciones experimentales descritas en este trabajo permiten descartar a Gyrl como un protector importante en estas condiciones y sugieren que dicha proteína carece de la función protectora global que se le ha atribuido (Chatterji *et al.* 2003), la cual se observa únicamente mediante su

sobreproducción y dependiendo el fondo genético o cepa utilizado. Esto último se hace evidente en los trabajos de Baquero *et al.* 1995 y Wei *et al.* 2003 quienes trabajando con cepas diferentes de *E. coli* encuentran sensibilidad (el primero) y resistencia frente a MMC (el segundo). Es de destacar que Wei *et al.* 2003 también reporta la resistencia frente a MMC con la sobreproducción de otras proteínas de *E. coli*, que comparten con Gyrl el dominio estructural SHS2. Pareciera entonces que la función protectora de Gyrl se puede observar únicamente en ciertas cepas de *E. coli* y mediante su sobreproducción, la cual pudiera significar únicamente una modificación importante a la fisiología normal de la célula causada por la cantidad tan grande de Gyrl, algo que resulta un problema común en los experimentos que emplean la sobreproducción de proteínas, y cuyos ejemplos están ampliamente reportados (Housey *et al.* 1988; Kurlang y Dong, 1996; Velkov *et al.* 1999).

Ya que se descarta un papel protector de Gyrl por sí sola, es muy probable que esta proteína tenga una función en conjunto con otras más, como parte de una respuesta fisiológica más general que la mera protección contra un agente antibiótico. En este caso, cabe pensar que Gyrl, al inhibir a girasa, tiene dos posibles funciones. La primera es la de colaborar en la modulación de la expresión de ciertos genes cuya inducción o represión es susceptible al superenrollamiento del DNA. No obstante, Chatterji *et al.*, 2003 reporta que la sobreproducción de Gyrl no altera el superenrollamiento del DNA *in vivo*. La segunda es ayudar, junto con otras proteínas, a disminuir o evitar la replicación del genoma, ya que la disminución de la replicación es una consecuencia natural de la fase estacionaria, pues al carecer de nutrientes, la célula no replica su genoma. De igual modo, durante la respuesta SOS es importante disminuir la replicación pues aún cuando se inducen DNA polimerasas susceptibles a error que generan variabilidad genética gracias a las mutaciones que permiten durante su avance, un gran número de estas podría ser letal. Visto de esta forma, parece bastante razonable la peculiar inducción de *gyrl* durante ambos eventos, SOS y fase estacionaria. En favor a lo anterior, es de mencionar que durante la respuesta SOS inducida por daño con MMC, disminuye la expresión de varias subunidades de la principal polimerasa de DNA de la célula o replicasa (Khil y Camerini-Otero, 2002).

Para corroborar los resultados de este trabajo y explorar más a la proteína Gyrl, podría ser de utilidad continuar su estudio empleando un espectro más amplio de dosis de las sustancias aquí empleadas, o de otras sustancias inhibidoras de girasa, así como de los tiempos de exposición de la célula hasta una fase estacionaria más avanzada, cuando ya se han diferenciado distintas poblaciones celulares en el cultivo (Zinser y Kolter, 2004). Finalmente, el seguimiento de la viabilidad en células individuales empleando la técnica de tinción Live/Dead Bac Ligth (green/red)

junto con citometría de flujo ([Berney et al. 2007](#)), podría ser útil para esclarecer las posibles diferencias entre las células *gyrI*⁺ y *gyrI*⁻, no detectadas por la técnica que se empleó en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en estas condiciones experimentales permiten concluir que:

- ✓ durante la fase exponencial de crecimiento, la proteína Gyrl protege ligeramente contra el daño ocasionado por el NAL, un inhibidor de girasa; sin embargo, no protege contra el daño ocasionado por MMC, un agente alquilante del DNA
- ✓ durante la fase estacionaria temprana, Gyrl no protege contra el daño ocasionado por NAL o MMC
- ✓ durante la fase exponencial de crecimiento, Gyrl no es un protector importante contra estas dos sustancias

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar el posible papel protector de la proteína Gyrl frente a otros inhibidores de girasa, sin recurrir a su sobreproducción.
- ✓ Confirmar si los filamentos observados durante la respuesta SOS son *sulA*-dependientes.
- ✓ Determinar la viabilidad celular frente a NAL y MMC, empleando métodos más precisos, tales como las tinciones diferenciales Live/Dead Bac Light red/green, en espera de encontrar una subpoblación que muere más o menos rápido al tratamiento con dichas sustancias.
- ✓ Emplear fusiones *gyrl-gfp* que permitan determinar la dinámica de la expresión de *gyrl* durante un periodo amplio de tiempo posterior a la inducción de SOS.

11. REFERENCIAS

1. Anantharaman, V. y Aravind, L. 2004. The SHS2 module is a common structural theme in functionally diverse protein groups, like Rpb7p, FtsA, Gyrl and MTH1598/Tm1083 superfamilies. *Proteins* 56: 795-807
2. Baev, M., Baev, D., Radek, A. y Campbell, J. 2006a. Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols and organic acids with transcriptional microarrays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 310–316
3. Baev, M., Baev, D., Radek, A. y Campbell, J. 2006b. Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: determining metabolic strategy with transcriptional microarrays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 323-328
4. Baquero, M., Bouzon, M., Varea, J. y Moreno, F. 1995. *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gen, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol. Microbiol.* 18: 301-311
5. Bénédicte, M. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biology* 3: 1174-1176
6. Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H. y Egli, T. 2007. Assessing and interpreting bacterial viability using LIVE/DEAD[®] BacLight™ kit in combination with flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* En prensa.
7. Blattner, F. y otros 16 autores. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462
8. Boyle, J., Cook, T. y Goss, W. 1969. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 97: 230-236
9. Braithwaite D. e Ito, J. 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 21: 787–802
10. Champoux, J. 2001. DNA topoisomerases: Structure, Function and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 2001. 70: 369–413
11. Chatterji, M. y Nagaraja, V. 2002. Gyrl: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO reports* 31: 261-267
12. Chatterji, M., Sengupta, S. y Nagaraja, V. 2003. Chromosomally encoded gyrase inhibitor Gyrl protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch. Microbiol.* 180: 339-346
13. Chen, C., Malik, M., Snyder, M. y Drlica, K. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 258: 627–637
14. Cook, T., Goss, W. y Deitz, W. 1966. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. V. Possible mutagenic effect. *J. Bacteriol.* 91: 780-783
15. Corbett, K. y Berger J. 2004. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 95–118
16. Cordell, S., Robinson, E. y Löwe, J. 2003. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7889–7894
17. Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. y Hanawalt, P. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158: 41-64

18. Couturier, M., Bahassi, E. y Van Melderen, L. 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol.* 6: 269-275
19. Cox, M. 2007. Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 42: 41-63
20. Critchlow, S., O'Dea, M., Howells, A., Couturier, M., Gellert, M. y Maxwell, A. 1997. The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with gyrase: Induction of DNA cleavage and blocking of transcription, *J. Mol. Biol.* 273: 826-839
21. Digate, R. y Mariani, K. 1989. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* 264: 17924-17930
22. Drlica, K. y Zhao, X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Rev.* 61: 377-392
23. Dwyer, D., Kohanski, M., Hayete, B. y Collins, J. 2007. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Systems Biol.* 91: 1-15
24. Einstein, A. en Sagan, C. 2002. El mundo y sus demonios. La ciencia como una luz en la oscuridad. Planeta. pp: 18.
25. Ericsson, M., Hanstorp, H., Hagberg, P. Enher, J. y Nyström. 2000. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J. Bacteriol.* 182: 5551-5555
26. Fernández de Henestrosa, A., Ogi, T., Aoyagi S., Chafin, D., Hayes, J. *et al.* 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35: 1560–1572
27. Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D. y Serre, M. 2007. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie.* 89: 427-446
28. Friedman, N., Vardi, S., Ronen, M., Alon, U. y Stavans, J. 2005. Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biology* 3: 1261-1268
29. Garrido, M., Herrero, M. y Moreno, F. 1988. The export of the DNA replication inhibitor MccB17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* 7: 1853-1862
30. Gellert, M., Mizuchi, K., O'Dea, M. y Nash, H. 1976a. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4474-4478
31. Goodman, M. 2002. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 17-50
32. Greenstein, M., Speth, J. y Maiese, W. 1981. Mechanism of action of cinodine, a glycocinnamoylpermidine antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 425-432
33. Hashimi, S., Wall, M., Smith, A., Maxwell, A. y Birch, R. 2007. The phytotoxin Albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 51: 181-187
34. Hayes, F. 2003. Toxin-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death and cell cycle. *Science* 301: 1496-1499
35. Hegde, S., Vetting, M., Roderick, S., Mitchenall, L., Maxwell, A., Takiff, H. y Blanchard, J. 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308: 1480-1483
36. Hengge-Aronis, R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. pp. 161-178. En G. Storz y R. Hengge-Aronis (Eds). *Bacterial Stress Responses*, American Society for Microbiology, Washington D.C.

37. Herman, L. y Soule, M. 1943. Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration. The action of sodium azide on microbic growth. *J. Bacteriol.*
38. Hill, T., Sharma, B., Valjavec-Gratian, M. y Smith, J. 1997. *sfh*-Independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* 179: 1931-1939
39. Holmes, V. y Cozzarelli, N. 2000. Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1322–1324
40. Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H. y Ogawa, H. 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleavage by the RecA protein. *Cell* 27: 515-522
41. Housey, G., Johnson, M., Hsiao, W., O'Brian, C., Murphy, J., Kirschmeier, P. y Weinstein, I. 1988. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell* 52: 343-354.
42. Huisman, O. y D'Ari, R. 1981. An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature* 290: 797-799
43. Huisman, G., Siegele, D., Zambrano, M. y Kolter, R. 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase, pp. 1672-1682. En F.C. Neidhardt (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology, Washington D.C.
44. Iwasaki, H., Nakata, A., Walker, G. y Shinagawa, H. 1990. The *Escherichia coli polB* gen, which encodes DNA polymerase II, is regulated by the SOS system. *J. Bacteriol.* 172: 6268–6273.
45. Janion, C., Sikora, A., Nowosielska, A. y Grzesiuk, E. 2002. Induction of the SOS response in starved *Escherichia coli*. *Env. and Mol.Mutagen.* 40: 129-133
46. Kampranis, S., Bates, A. y Maxwell A. 1999. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8414–8419
47. Kang, Y. *et al.* 2004. Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome. *J. Bacteriol.* 186: 4924-4930
48. Kato, J., Susuki H. e Ikeda, H. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 25676-25684
49. Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higada, S. y Suzuki, H. 1990. New topoisomerase for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63: 393-404
50. Khil, P. y Camerini-Otero, R. 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44: 89-105
51. Krauzwer, K y Cozzarelli, N. 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* 140: 424-435
52. Kurland, C. y Dong, H. 1996. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol. Microbiol.* 21: 1-4
53. Layton, J. y Foster, P. 2003. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 50: 549–561
54. Lewis, K. 2000. Programmed Death in Bacteria. *Microbiol. and Mol. Biol. Rews.* 64: 503–514
55. Lichten, H. y Soule, M. 1943a. Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration. *J. Bacteriol.* 221-230
56. Little, J. 1993. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J. Bacteriol.* 175: 4943-4950

57. Little, J., Mount, D. y Yanish-Perron, C. 1981. Purified LexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4199-4203
58. Löwe, J. y Amos, L. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. Nature 391: 203-206
59. Manjunatha, H., Maxwell, A., y Nagaraja, V. 2005. A monoclonal antibody that inhibits mycobacterial DNA gyrase by a novel mechanism. Nucleic. Acids. Res. 33: 3085-3094
60. Mao, Y., Varoglu, M. y Sherman, D. 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lawendulae* NRRL 2564. Chem. and Biol. 6: 251-263
61. Matin, A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 3-10
62. Maxwell, A. 1992. The molecular basis of quinolone action. J. Antimicrob. Chemother. 30: 409-416
63. Maxwell, A. 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. Mol. Microbiol. 9: 681-686.
64. Maxwell, A. 1997. DNA gyrase as a drug target. T. in microbiol. 5: 102-109
65. McArthur, J. 2006. Microbial ecology. An evolutionary approach. Academic Press. pp. 250
66. McCool, J., Long, E., Petrosino, J., Sandler, H., Rosenberg, S. y Sandler, S. 2004. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. Mol. Microbiol. 53: 1343-1357
67. McKenzie, J., Reuben, S., Lee, P. y Rosenberg, S. 2000. The SOS response regulates adaptive mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6646-6651
68. Menzel, R. y Gellert, M. 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. Cell 34: 105-113
69. Mizusawa, S. y Gottesman, S. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of the SulA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 358-362
70. Mizzuchi, K., O'Dea, M. y Gellert, M. 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5960-5963
71. Nakada, N., Gmunder, H., Hirata, T. y Arisawa, M. 1995. Characterization of the binding site for cyclothialidine on the B subunit of DNA gyrase. J. Biol. Chem. 270: 14286-14291
72. Nakanishi, T., Oshida, T., Matsushita, S., Imajoh-Ohmi, T. Ohnuki, 1998. Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 273: 1933-1938
73. Nakanishi, A., Imajoh-Ohmi, S. y Hanaoka, F. 2002. Characterization of the interaction between DNA gyrase inhibitor and DNA gyrase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277: 8949-8954
74. Niemelä, S. 2003. Measurement uncertainty of microbiological viable counts. Accred. Qual. Azur. 8: 559-563
75. Nyström, T. 2004. Stationary-phase physiology. Annu. Rev. Microbiol. 58: 161-181
76. Oh, T., Jung, L. y Kim, G. 2001. The *Escherichia coli* SOS gene *sbmC* is regulated by H-NS and RpoS during the SOS induction and stationary growth phase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288: 1052-1058
77. Osburne, M., Maiese, W. y Greenstein, M. 1990. In vitro inhibition of bacterial DNA gyrase by cinodine, a glycocinnamoylspermidine antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1450-1452
78. Payne, J. y M. Smith. 1994. Peptide transport by microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 36: 1-80
79. Pierrat, O. y Maxwell, A. 2003. The action of the bacterial toxin Microcin B17: Insight into the cleavage-

- religation reaction of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 278: 35016-35023
80. Radman, M. 1975. SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* 5A: 355–367
 81. Reece, R. y Maxwell, A. 1991. DNA gyrase: structure y function. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 26: 335-375
 82. Reyes, Y., Contreras, G., Ramírez, J., Membrillo, J. y Gómez, C. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary phase cells. *J. Bacteriol.* 185: 1097-1100.
 83. Romanowski, M., Gibney, S. y Burley, S. 2002. Crystal structure of the *Escherichia coli* SbmC protein that protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Proteins* 47: 403-407
 84. Rupp, W. 1996. DNA repair mechanisms. En Neidhart, F., Curtis, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, K., Magasanik, B. Resnikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H. (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press. Washington. D.C.
 85. Ryter, A. 1968. Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study. *Bacteriol. Rev.* 32: 39-54
 86. Sambrook, J., Fritsch, C. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 87. San Millán, J., Kolter, R. y Moreno, F. 1985. Plasmid Genes Required for Microcin B17 Production. *J. Bacteriol.* 163: 1016-1020
 88. Shih, Y. y Rothfield. L. 2006. The Bacterial Cytoskeleton. *Microbiol. and Mol. Biol. Revs.* 70:729–754
 89. Stonington, O. y Pettijohn, D. 1971. The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a Protein-DNA-DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 6-9
 90. Sugino, A., Higgins, N. y Cozzarelli, N. 1980. DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* 8: 3865-3874
 91. Suzuki, H. y Kilgore, W. 1966. Effects of Mitomycin C on the macromolecular synthesis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93: 675-682
 92. Tang, M., Shen, X., Frank, G., O'donnell, M., Woodgate, R. y Goodman, M. 1999. UmuD*2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Biochemistry* 96: 8919–8924
 93. Tomasz, M. 1995. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem. Biol.* 2: 575–579
 94. Tran, J., Jacoby, G. y Hooper, D. 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 118-125
 95. Typas, A., Barembuch, C., Possling, A. y Hengge, R. 2007. Stationary phase reorganization of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of σ^S activity and levels. *EMBO Journal.* 26: 1569–1578
 96. Vivien, E., Pitorre, Cociancich, D. Pieretti, S. Gabriel, I., Rott, D. y Royer, M. 2007. Heterologous production of Albicidin: a promising approach to overproducing and characterizing this potent inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 51: 1549–1552
 97. Wagner, J., Gruz, P., Kim, S., Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R. y Nohmi, T. 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA Pol IV, involved in mutagenesis. *Molecular Cell* 4: 281–286
 98. Wall, M., Mitchenall, L. y Maxwell, A. 2004. *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplast and mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7821-7826

99. Wang, J. 1991. DNA Topoisomerases: Why So Many? *The J. of Biol. Chem.* 266: 6659-6662
100. Wang, J. 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein. *J. Mol. Biol.* 55: 523-533
101. Wang, J. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 635–692
102. Wang, Z., Li, S. y Heide, L. 2000. Identification of the Coumermycin A1 Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 44: 3040–3048
103. Wei, Y., Vollmer, A. y LaRossa, R. 2001. In vivo titration of Mitomycin C action by four *Escherichia coli* genomic regions on multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* 183: 2259-2264
104. White, D. 2000. *The physiology and Biochemistry of Prokaryotes.* Oxford University Press. pp 37-65
105. Willmott, C., Critchlow, S., Eperon, I. y Maxwell, A. 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 242: 351–363
106. Worcel, A. y Burgi, E. 1972. On the chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 71, 127-147
107. Yorgey, P., Davagnino, J., Kolter, R. 1993. The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 9: 897–905.
108. Zechiedrich, E., Khodursky, A., Bachellier, S., Schneider, Chen D. *et al.* 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 8103–13
109. Zinser, E. y Kolter, R. 2004. *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res. in Microbiol.* 155: 328–336

12. ANEXO

A continuación se muestra a manera de ejemplo, los datos de longitud de las células tratadas con ácido nalidíxico en fase exponencial. En esta tabla se han juntado los resultados de las 200 células consideradas en el análisis (100 por cada ensayo independiente) y se presentan en orden ascendente. Cada color define una categoría de longitud, y en rojo se destacan los filamentos (células > ó = a 6.5 mm). Un análisis similar también se aplicó para las imágenes obtenidas de las células tratadas con NAL en fase estacionaria y para MMC en fase exponencial y estacionaria, pero se han omitido por razones de espacio.

célula	Dosis NAL ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	3	5	7
	Longitud (mm)			
1	1.00	1.00	1.00	2.00
2	1.00	1.00	1.00	2.00
3	1.00	1.50	1.00	2.00
4	1.50	1.50	1.50	2.00
5	1.50	1.50	1.50	2.50
6	1.50	1.50	1.50	3.00
7	1.50	1.50	1.50	3.00
8	1.50	2.00	1.50	3.00
9	1.50	2.00	2.00	3.50
10	1.50	2.00	2.00	3.50
11	1.50	2.00	2.50	4.00
12	1.50	2.00	2.50	4.00
13	1.50	2.00	2.50	4.00
14	1.50	2.00	2.50	4.00
15	1.50	2.50	2.50	4.00
16	1.50	2.50	2.50	4.00
17	1.50	2.50	3.00	4.00
18	1.50	2.50	3.00	4.00
19	1.50	2.50	3.00	4.00
20	1.50	2.50	3.00	4.00
21	1.50	2.50	4.00	4.00
22	1.50	3.00	4.00	4.00

23	1.50	3.00	4.00	4.00
24	1.50	3.00	4.00	4.00
25	1.50	3.00	4.00	4.00
26	1.50	3.00	4.00	4.00
27	1.50	3.00	4.00	4.00
28	1.50	3.00	4.00	4.00
29	1.50	3.00	4.00	4.00
30	1.50	3.00	4.50	4.00
31	1.50	3.00	4.50	4.00
32	1.50	3.00	4.50	4.00
33	2.00	3.00	4.50	4.50
34	2.00	3.00	4.50	4.50
35	2.00	3.00	4.50	4.50
36	2.00	3.00	4.50	4.50
37	2.00	3.00	5.00	4.50
38	2.00	3.00	5.00	4.50
39	2.00	3.00	5.00	4.50
40	2.00	3.00	5.00	4.50
41	2.00	3.00	5.00	4.50
42	2.00	3.00	5.00	4.50
43	2.00	3.00	5.00	4.50
44	2.00	3.00	5.00	4.50
45	2.00	3.00	5.00	4.50
46	2.00	3.00	5.00	4.50
47	2.00	3.00	5.00	4.50
48	2.00	3.00	5.00	4.50
49	2.00	3.00	5.00	4.50
50	2.00	3.50	5.00	4.50
51	2.00	3.50	5.00	4.50
52	2.00	3.50	5.00	4.50
53	2.00	3.50	5.00	4.50
54	2.00	3.50	5.00	4.50
55	2.00	3.50	5.00	4.50
56	2.00	3.50	5.00	4.50
57	2.00	3.50	5.00	4.50
58	2.00	3.50	5.00	5.00
59	2.00	3.50	5.00	5.00

60	2.00	3.50	5.00	5.00
61	2.00	3.50	5.00	5.00
62	2.00	3.50	5.00	5.00
63	2.00	3.50	5.00	5.00
64	2.00	3.50	5.00	5.00
65	2.00	3.50	5.00	5.00
66	2.00	3.50	5.00	5.00
67	2.00	3.50	5.00	5.00
68	2.00	3.50	5.50	5.00
69	2.00	3.50	5.50	5.00
70	2.00	3.50	5.50	5.00
71	2.00	3.50	5.50	5.00
72	2.00	3.50	5.50	5.00
73	2.00	3.50	6.00	5.00
74	2.00	4.00	6.00	5.00
75	2.00	4.00	6.00	5.00
76	2.00	4.00	6.00	5.00
77	2.00	4.00	6.00	5.00
78	2.00	4.00	6.00	5.00
79	2.00	4.00	6.00	5.00
80	2.00	4.00	6.00	5.00
81	2.50	4.00	6.00	5.00
82	2.50	4.00	6.00	5.00
83	2.50	4.00	6.00	5.00
84	2.50	4.00	6.00	5.00
85	2.50	4.00	6.00	5.00
86	2.50	4.00	6.00	5.00
87	2.50	4.00	6.00	5.50
88	2.50	4.00	6.00	5.50
89	2.50	4.00	6.00	5.50
90	2.50	4.00	6.00	5.50
91	2.50	4.00	6.00	5.50
92	2.50	4.00	6.00	5.50
93	2.50	4.00	6.00	5.50
94	2.50	4.00	6.00	5.50
95	2.50	4.00	6.00	5.50
96	2.50	4.00	6.00	5.50

97	2.50	4.00	6.00	5.50
98	2.50	4.00	6.00	5.50
99	2.50	4.00	6.00	6.00
100	2.50	4.00	6.00	6.00
101	2.50	4.00	6.00	6.00
102	2.50	4.00	6.00	6.00
103	2.50	4.00	6.00	6.00
104	2.50	4.00	6.00	6.00
105	2.50	4.00	6.00	6.00
106	2.50	4.00	6.00	6.00
107	2.50	4.00	6.00	6.00
108	2.50	4.00	6.00	6.00
109	2.50	4.00	6.00	6.00
110	2.50	4.00	6.00	6.00
111	2.50	4.00	6.00	6.00
112	2.50	4.00	6.00	6.00
113	2.50	4.00	6.00	6.00
114	2.50	4.00	6.00	6.00
115	2.50	4.00	6.00	6.00
116	2.50	4.00	6.00	6.00
117	2.50	4.00	6.00	6.00
118	2.50	4.00	6.00	6.00
119	2.50	4.50	6.00	6.00
120	2.50	4.50	6.00	6.00
121	2.50	4.50	6.00	6.00
122	2.50	4.50	6.00	6.00
123	2.50	4.50	6.00	6.00
124	2.50	4.50	6.00	6.00
125	2.50	4.50	6.00	6.00
126	2.50	4.50	6.00	6.00
127	2.50	4.50	6.00	6.00
128	2.50	4.50	6.00	6.00
129	2.50	4.50	6.00	6.00
130	2.50	4.50	6.00	6.00
131	2.50	4.50	6.00	6.00
132	2.50	4.50	6.00	6.00
133	2.50	4.50	6.50	6.00

134	2.50	4.50	6.50	6.00
135	2.50	4.50	6.50	6.00
136	2.50	4.50	7.00	6.00
137	2.50	4.50	7.00	6.00
138	2.50	4.50	7.00	6.00
139	2.50	4.50	7.00	6.00
140	2.50	4.50	7.00	6.50
141	2.50	4.50	7.00	6.50
142	2.50	5.00	7.00	6.50
143	2.50	5.00	7.00	6.50
144	2.50	5.00	7.00	6.50
145	2.50	5.00	7.00	6.50
146	2.50	5.00	7.00	6.50
147	2.50	5.00	7.00	6.50
148	2.50	5.00	7.00	6.50
149	2.50	5.00	7.00	6.50
150	2.50	5.00	7.00	6.50
151	2.50	5.00	7.50	6.50
152	2.50	5.00	7.50	7.00
153	2.50	5.00	8.00	7.00
154	2.50	5.00	8.00	7.00
155	2.50	5.00	8.00	7.00
156	2.50	5.50	8.00	7.50
157	2.50	5.50	8.00	7.50
158	2.50	5.50	8.00	8.00
159	2.50	5.50	8.00	8.00
160	2.50	5.50	8.00	8.00
161	2.50	5.50	8.00	8.00
162	2.50	5.50	8.00	8.00
163	2.50	5.50	8.50	8.00
164	2.50	6.00	8.50	8.00
165	2.50	6.00	8.50	8.50
166	2.50	6.00	8.50	8.50
167	2.50	6.00	9.00	8.50
168	2.50	6.00	9.00	8.50
169	2.50	6.00	9.00	8.50
170	3.00	6.00	9.00	9.00

171	3.00	6.00	9.00	9.00
172	3.00	6.00	9.00	9.00
173	3.00	6.00	9.00	9.00
174	3.00	6.00	9.00	9.00
175	3.00	6.00	9.00	9.00
176	3.00	6.00	9.00	9.50
177	3.00	6.00	9.00	9.50
178	3.00	6.50	9.00	9.50
179	3.00	6.50	9.00	9.50
180	3.00	6.50	9.00	9.50
181	3.00	6.50	9.00	10.00
182	3.00	6.50	9.00	10.00
183	3.00	6.50	10.00	10.00
184	3.00	6.50	10.00	10.00
185	3.00	6.50	10.00	10.00
186	3.00	7.00	10.00	10.00
187	3.50	7.00	10.00	10.00
188	3.50	7.00	10.50	10.00
189	3.50	8.00	10.50	10.00
190	3.50	8.50	10.50	10.00
191	3.50	8.50	10.50	10.00
192	3.50	8.50	10.50	11.00
193	3.50	9.00	11.00	11.00
194	4.00	9.00	11.00	11.00
195	4.00	9.00	11.00	11.00
196	4.00	10.00	12.00	11.50
197	4.50	10.50	12.00	11.50
198	4.50	10.50	14.00	11.50
199	4.50	11.00	16.00	13.00
200	6.00	14.00	22.00	15.00
% filamentación	0.00	11.50	34.00	30.50
Promedio	2.36	4.40	6.30	6.11
Mínimo	1.00	1.00	1.00	2.00
Máximo	6.00	14.00	22.00	15.00
Desviación Estándar	0.66	1.86	2.62	2.21

