



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Estudio de las condiciones que favorecen la
expresión del gen cromosomal *gef* como
inductor del suicidio celular en *Escherichia
coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

CARLOS MAURICIO BELMAN RAMOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIMITRIS GEORGELLIS

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ
EICHELMANN, DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

MÉXICO, D. F

NOVIEMBRE, 2010



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
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/551/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de septiembre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL) del (la) alumno (a) BELMAN RAMOS CARLOS MAURICIO con número de cuenta 98086780 con la tesis titulada "ESTUDIO DE LAS CONDICIONES QUE FAVORECEN LA EXPRESIÓN DEL GEN CROMOSOMAL *gef* COMO INDUCTOR DEL SUICIDIO CELULAR EN *Escherichia coli*", realizada bajo la dirección del (la) DR. DIMITRIS GEORGELLIS:

Presidente: DRA. MARIA DEL CARMEN GOMEZ EICHELMMANN
Vocal: DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL
Secretario: DR. DIMITRIS GEORGELLIS
Suplente: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Suplente: DRA. BERTHA MARIA JOSEFINA GONZALEZ PEDRAJO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de noviembre de 2010.


Dr. Juan Nunez Farfan
Coordinador del Programa

JNF/DCRV/ASR/grf*

Agradecimientos:

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por haberme brindado el honor de pertenecer a su programa.

Así mismo, agradezco enormemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Proyecto # 80684) por los recursos que hicieron posible este proyecto y por la beca que me otorgó durante la duración de mis estudios. También agradezco: al Presupuesto UNAM, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, Proyecto # IN219709) y al International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB proyecto # CRPMEX008-02).

También quisiera agradecer a los miembros de mi comité tutor: Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann y Dra. Bertha González Pedrajo, pues sus valiosos comentarios durante el desarrollo de este proyecto, permitieron enriquecer y mejorar mi trabajo. Particularmente agradezco a mi tutor director de tesis, Dr. Dimitris Georgellis, por brindarme su confianza y haberme apoyado siempre, pese a la adversidad.

Finalmente, quisiera agradecer a los miembros del jurado (Dra. Yolanda López Vidal y Dr. Rafael Camacho Carranza), quienes aportando la enorme experiencia en su campo de investigación, hicieron sugerencias, correcciones o comentarios de profundo valor para la versión final de este trabajo.

Agradecimientos personales:

Anteriormente, en la licenciatura, ya te lo había dicho, y ahora con más razón te lo digo:

GRACIAS MAMÁ, POR SER MI MADRE

Por otra parte quiero agradecer con mención especial a mis entrañables amigas de hace tanto tiempo, las Gemelitas **Martha Alejandra** y **Mónica Alejandra**. Así mismo, con igual grado de importancia, a agradezco a mi casi hermano **Moisés Martínez Ayala** y su tan apreciable familia. A ustedes les debo gran parte de esto, pues me han visto caer en numerosas ocasiones, y siempre he contado con su apoyo para levantarme, aún cuando ni yo mismo sentía las fuerzas para hacerlo. Definitivamente qué haría sin ustedes.

Tampoco puedo dejar de agradecer a la **Sra. Paz Mizrahi** e hija, la Sra. **Michelle Cherem**, y por supuesto a la Sra. **Odette Charabati**, quienes con su apoyo en varios sentidos también han contribuido a hacer posible este sueño, que se veía tan lejano.

Quiero también agradecer a ustedes, mis compañeros de laboratorio (M. en C. Claudia Rodríguez, Dr. Adrián Álvarez, M. en C. Carlos Barba, M. en C. Griselda Salas, Biol. Ricardo Chávez, Biol. Óscar Sánchez y al Sr. Pedro (Peter) por haberme permitido compartir con ustedes no sólo el trabajo propiamente académico, sino también otras muchas cosas de tipo personal, las cuales, doquiera que vaya en un futuro, llevaré conmigo para reír o reflexionar. A todos y cada uno de ustedes, GRACIAS.

No podía dejar de mencionar a las siguientes personas: Biol. Onasis Vicente Fermín, Biol. Ivonne Kury, Biol. Violeta Piña, Dr. Jesús Ramírez Santos y al Sr. José Rómulo Sosa Ortíz, compañero de tantos y tantos pasajes de mi vida.

Finalmente, quiero agradecer a la mujer que me devolvió la sonrisa con su amor INCONDICIONAL, me refiero a la Lic. Jennifert Macías:

¡TE AMO JENN!

A la mujer que me dio la vida, mi Madre

A la mujer que amo, Jennifert

Gracias

*Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
y sin embargo es lo máspreciado
que tenemos.*

ALBERT EINSTEIN
(1879-1955)

Índice

1. Índice de figuras y tablas.....	ix
2. Resumen.....	xi
3. Abstract.....	xii
4. Introducción.....	1
4.1 Muerte postsegregacional en células libres de plásmidos.....	1
4.2 Sistemas TA en los cuales el factor de muerte es una proteína y el antídoto un RNA antisentido.....	2
4.3 Regulación del RNA de <i>hok</i> por un RNA antisentido.....	6
4.4 Genes <i>hok</i> cromosomales.....	9
4.5 Posibles funciones de los sistemas TA cromosomales.....	12
4.6 El gen <i>hokC</i> o <i>gef</i>	14
5. Objetivos.....	18
6. Hipótesis.....	19
7. Justificación.....	20
8. Materiales y métodos.....	21
8.1 Construcción de fusiones <i>gef-lacZ</i> y <i>sof-lacZ</i> para el monitoreo de la actividad transcripcional.....	21
8.2 Los Plásmidos CRIM.....	21
8.3 Construcción de los plásmidos de integración pMX901 (<i>pAH125+gef-lacZ</i>) y pMX902 (<i>pAH125+sof-lacZ</i>).....	22
8.4 Construcción de la cepa receptora MC4100/pINT-ts.....	27
8.5 Integración de los plásmidos de fusión al cromosoma de la cepa hospedera MC4100.....	28
8.6 Pruebas de PCR para identificar a las colonias con integración sencilla al cromosoma de los plásmidos pMX901 y pMX902.....	29
8.7 Ensayos de β -galactosidasa.....	31
8.8 Transducción con el fago P1.....	32
8.9 Construcción de la cepa MC4100 carente de los genes <i>hok</i> cromosomales ($\Delta 5$).....	32
8.10 Observación de las células al microscopio óptico.....	34
9. Resultados.....	35
9.1 Construcción de los plásmidos de integración pMX901 (<i>pAH125+gef-lacZ</i>) y pMX902 (<i>pAH125+sof-lacZ</i>).....	35
9.2 Integración de las fusiones <i>gef-lacZ</i> y <i>sof-lacZ</i> al cromosoma de la cepa MC4100.....	38

9.3	Determinación de la actividad transcripcional de los genes <i>gef</i> y <i>sof</i> durante distintas condiciones de estrés.....	44
9.3.1	Estrés nutricional.....	44
9.3.2	Estrés calórico.....	48
9.3.3	Estrés por el fago P1.....	55
9.4	Comparación de la sobrevivencia en fase estacionaria entre una cepa wt y una cepa sin los genes <i>hok</i> cromosomales.....	58
10.	Discusión.....	60
11.	Conclusiones.....	65
12.	Perspectivas.....	66
13.	Referencias.....	67

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Representación de tres distintos mecanismos de estabilización de plásmidos (pag. 2).

Figura 2. Organización estructural del sistema *hok-sok-mok* del plásmido R1 (pag 3).

Figura 3. Potencial de membrana ($^3\text{H}[\text{TTPP}^+]$) y consumo de oxígeno de la cepa CM12, portadora del plásmido pKG341 (*hok*⁺ con un promotor termoactivable (41°C) (pag 4).

Figura 4. Viabilidad y densidad celular de un cultivo en el cual se indujo la sobreexpresión del gen *hok* mediante un promotor termoactivable (41° C) (pag 5).

Figura 5. Fotografía de microscopía óptica de una muestra de un cultivo celular en el cual se indujo la sobreexpresión del gen *hok* mediante un promotor termoactivable (41° C) (pag 6).

Figura 6. Modelo molecular que explica la activación de la traducción de *hok* en células sin plásmido (pag 8).

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los cinco genes *hok* cromosomales y el gen *hok* del plásmido R1 (pag 9).

Figura 8. Estructura y organización de los cinco genes cromosomales *hok* (pag 12).

Figura 9. Actividad transcripcional de *gef* y *sof* durante diferentes etapas de crecimiento (pag 15).

Figura 10. Crecimiento (DO₆₀₀) de las cepas reporteras de los genes *gef-lacZ* y *sof-lacZ* durante diferentes etapas de crecimiento (pag 17).

Figura 11. Ejemplo del proceso de integración de un plásmido CRIM (pAH70) con sitios de unión a fago *attHK022* (pag 22).

Figura 12. Plásmido CRIM pAH125 utilizado en la construcción de las fusiones *gef-lacZ* y *sof-lacZ* (pag 23).

Figura 13. Ubicación de las regiones de apareamiento de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la región promotora de *gef* (pag 24).

Figura 14. Estrategia de clonación de la región promotora de *gef* para la construcción del plásmido de integración pMX901 (CRIM pAH125+*gef-lacZ*) (pag 25).

Figura 15. Ubicación de las regiones de apareamiento de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la región promotora de *sof* (pag 26).

Figura 16. Estrategia de clonación de la región promotora de *sof* para la construcción del plásmido de integración pMX902 (CRIM pAH125+*sof-lacZ*) (pag 27).

Figura 17. Imágenes de algunas colonias obtenidas de los procesos de integración de los plásmidos pMX901 y pMX902 (pag 29).

Figura 18. Ejemplo de la estrategia para la eliminación de los genes *hok* empleando los genes interrumpidos por un cassette de resistencia a kanamicina de la colección *Keio* (pag 34).

Figura 19. Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los genes *gef* y *sof*, con los oligonucleótidos Gef Fw/Gef Rv y Sof Fw/Sof Rv (respectivamente) (pag 36).

Figura 20. Digestión del plásmido pGEM-T Easy *gef* (pag 37).

Figura 21. Verificación de la correcta construcción de los plásmidos pMX901 y pMX902 (pag 38).

Figura 22. PCR de cuatro colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) utilizando el protocolo de Haldimann y Wanner (2001), con el plásmido helper pINT-ts con sitios *attB* para λ (pag 39).

Figura 23. PCR de cuatro colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) utilizando el protocolo de Haldimann y Wanner (2001), con el plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ (pag 41).

Figura 24. PCR de 11 colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) empleando al plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ (pag 42).

Figura 25. PCR de 5 colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) empleando al plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ (pag 43).

Figura 26. PCR de algunas colonias candidatas de integración del plásmido pMX901 (pag 44).

Figura 27. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* durante las primeras 72 horas de crecimiento (pag 46).

Figura 28. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante las primeras 72 horas de crecimiento (pag 47).

Figura 29. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés calórico a 42° C (pag 50).

Figura 30. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante tres horas de crecimiento a 37° C y tres horas a 42° C (pag 51).

Figura 31. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés calórico a 52° C (pag 52).

Figura 32. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante tres horas de crecimiento a 37° C y tres horas a 52° C (pag 54).

Figura 33. Imágenes obtenidas mediante microscopia de contraste de fases de los cultivos de la cepa MC4100, portadora del gen reportero *gef-lacZ* o *sof-lacZ*, durante su crecimiento en medio LB a 37 y/o a 52° C (pag 55).

Figura 34. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés frente al fago P1 (pag 57).

Figura 35. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* en respuesta al estrés frente al fago P1 (pag 58).

Figura 36. Crecimiento (DO_{600}) y viabilidad (UFC's) de la cepa MC4100 wt y su derivada ($\Delta 5$) que carece de todos los genes *hok* cromosomales (pag 60).

Tablas

Tabla 1. Pruebas de PCR para la integración de los plásmidos CRIM (pag 43).

RESUMEN

El plásmido R1 de bacterias Gram⁻ codifica para el sistema genético *hok/sok/mok*, capaz de estabilizar al plásmido en la población. *hok* (host killing) es un gen que codifica para la proteína transmembranal Hok de 52 aminoácidos, cuya sobreproducción es muy tóxica para la célula. *mok* (modulator of killing) es un ORF apenas río arriba de *hok*. *sok* (suppressor of killing) se sobrelapa con *mok* y codifica para un RNA antisentido, que al unirse a *mok*, impide la traducción de *hok*, sirviendo como antitoxina. El RNAm de *hok* se transcribe constitutivamente mediante un promotor muy débil y tiene una vida media promedio de 30 minutos. El RNA antisentido de *sok* tiene una vida promedio de 30 segundos, sin embargo, su transcripción la impulsa un promotor mucho más fuerte que el de *hok*. En células sin plásmido, se abate rápidamente el RNA antisentido de *sok*, el RNAm de *hok* puede traducirse y la célula muere adquiriendo un fenotipo llamado “ghost cell”. Se ha propuesto que el blanco de Hok es algún componente de la cadena respiratoria; sin embargo, resultados previos de este laboratorio lo descartan. Se ha reportado que la presencia de este sistema en un plásmido de alto número de copias protege en forma específica contra el fago T4. El cromosoma de *E. coli* K-12 tiene cinco genes *hok* homólogos al gen *hok* del plásmido R1 (*hokA*, *hokB*, *hokC* (*gef*), *hokD* y *hokE*). Todos ellos codifican para proteínas tóxicas para la célula, sin embargo, algunos ya no conservan los elementos regulatorios *sok*, *mok* o ambos. Se sabe que ninguno de estos genes cromosomales es capaz de estabilizar plásmidos. Hasta la fecha se desconoce en qué condiciones pudieran ser ventajosos estos genes *hok* cromosomales. Resultados preliminares de este laboratorio con fusiones transcripcionales *hokC-lacZ* y *sokC-lacZ* (*sof*) muestran un incremento de la transcripción de *hokC* y la disminución de la transcripción de *sokC* en fase estacionaria temprana (FET), lo que sugiere una función “altruista” en esta fase. La hipótesis de una función altruista se probó en este trabajo. Para ello se estudió la transcripción de *gef* y *sof* durante distintas condiciones de estrés (nutrimental (72 horas), calórico (52°C) y por fago) mediante fusiones transcripcionales *gef-lacZ* y *sof-lacZ*. Por otra parte se construyó una cepa sin los cinco genes *hok* cromosomales ($\Delta 5$), en la cual se determinó la muerte celular en FET. Los resultados sobre transcripción de los genes reporteros (*gef-lacZ* y *sof-lacZ*) descartan la hipótesis altruista frente al estrés nutrimental y por fago. En estrés calórico se observó una ligera disminución de la expresión de *sokC*, sin incremento de *hokC*. Por otra parte, los ensayos de viabilidad de la cepa wt y $\Delta 5$ no muestran diferencias. La función de los genes *hok* cromosomales aún se desconoce.

Abstract

The R1 plasmid from Gram⁻ bacteria encodes the genetic system *hok/sok/mok* which stabilizes the plasmid in the population. *hok* encodes the transmembranal protein Hok of 52 a.a. The overproduction of Hok is very toxic for the cell. *mok* is an ORF just upstream of *hok*. *sok* overlaps with *mok* and encodes an antisense RNA that align with *mok*. Since translation of *mok* is necessary for *hok* translation, *sok* indirectly prevents the *hok* translation, functioning like an antitoxin. The *hok* RNAm is constitutively synthesized from a weak promoter but is very stable (30 min). By contrast, *sok* RNA is driven by a strong promoter but is very unstable (30 sec). In plasmid free cells the pool of *sok* RNA decay quickly, this leads to the cell killing with a characteristic morphological change called *ghost cell*. It has been proposed that the target of Hok is a component of the respiratory chain. Also has been reported exclusion of T4 phage in cells containing *hok/sok* on a high copy number plasmid. Moreover, the chromosome of *E. coli* K-12 codes for five *hok* homologues loci (*hokA*, *hokB*, *hokC* (*gef*), *hokD* and *hokE*), all of which specifies Hok-like toxins, although some of these no longer preserve regulatory elements like *sok*, *mok* or both. None of these chromosomal genes can stabilize plasmids. To date is unknown the conditions in which the chromosomal *hok* genes may represent an advantage. Preliminary results with *gef-lacZ* and *sof-lacZ* transcriptional fusions shown an increase and a decrease in the expression of *hokC* and *sokC*, respectively, at the early stationary phase (ESP), suggesting a potential altruistic role.

Using new transcriptional fusions *hokC-lacZ* and *sokC-lacZ* we determinate the transcriptional pattern of these genes during three distinct stress conditions (i.e. nutritional (starved for 72 hours), heat (50° C) and against phage). In addition we have generated a strain without any of the five *hok* chromosomal genes ($\Delta 5$) in hope of massive cell death in ESP.

Our results discard the respiratory chain as the target of Hok. Also, the reporter strains (*gef-lacZ* and *sof-lacZ*) reject the altruistic hypothesis in starvation and against phage. Moreover, in heat shock we observe a slightly diminish of *sokC* expression without an increase in the expression of *hokC*, although *ghost cells* are not found. Finally, wild type and derivative $\Delta 5$ showed the same behavior in viability assays along the growth curve.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias comúnmente albergan plásmidos y fagos, y aunque podría esperarse una coexistencia estable entre estos elementos con sus hospederos, debido a su dependencia por la maquinaria celular, los fagos son buenos ejemplos de depredadores moleculares debido al daño letal que ocasionan a la célula como parte de su ciclo de “vida”. Por otra parte, en el caso de los plásmidos, es cada vez mayor el número de estas moléculas en las cuales se encuentran genes capaces de inducir la muerte celular.

Muerte postsegregacional en células libres de plásmidos

Generalmente, tras la división de una célula madre que contiene algún tipo de plásmido, las células hijas heredan, cada una, un número equitativo de copias de éste. No obstante, la unión física del plásmido a una de las dos células o la falta de replicación del mismo, podrían dar origen a su distribución no equitativa, originando células sin plásmido. Existen distintos mecanismos que aseguran el mantenimiento o la estabilización de los plásmidos en la población bacteriana. Algunos de ellos incrementan la probabilidad de que ambas células hijas reciban una copia del plásmido (Hiraga, 1992), otros llevan a cabo la resolución eficiente de multímeros (Wu y Errington, 2004), mientras que otros mecanismos, llamados de muerte postsegregacional (*post segregational killing* o PSK) son capaces de matar en forma selectiva a aquellas células que después de la división celular no recibieron plásmido (figura 1). El fenómeno PSK ha sido observado con los plásmidos R1 y F (Loh, Cram y Skurray, 1988).

Los sistemas PSK constan de dos componentes, uno de ellos es una toxina estable, el otro un factor inestable que funciona como antídoto para la primera (o que evita su transcripción), motivo por el cual estos sistemas también se han

llamado sistemas toxina-antitoxina (TA) o módulos de adicción (puesto que la célula que contiene el plásmido depende de su permanencia dentro de ella para seguir viviendo). Por otra parte, mientras que el factor de muerte (o toxina) siempre es una proteína, la antitoxina puede ser una proteína o un RNA.

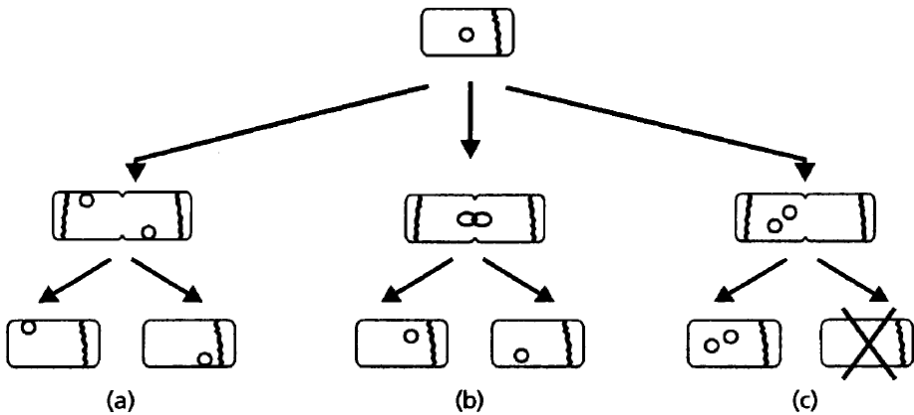


Fig. 1. Representación de tres distintos mecanismos de estabilización de plásmidos: (a) Algunos plásmidos son selectivamente posicionados dentro de la célula bacteriana, lo cual asegura que cada célula hija reciba una copia del plásmido. (b) Mecanismo de resolución de multímeros a monómeros, que incrementa la probabilidad de que cada célula hija reciba, al menos, una copia del plásmido. (c) Sistema de muerte postsegregacional que mata selectivamente a las células hijas que no reciben una copia del plásmido, asegurando así el enriquecimiento de una subpoblación con plásmido (Tomado de Holcik e Iyer, 1997).

Sistemas TA en los cuales el factor de muerte es una proteína y el antídoto un RNA antisentido

Entre los sistemas TA en los cuales la antitoxina es un RNA, el mejor caracterizado es el del locus *parB* del plásmido R1 (Gerdes, Rasmussen y Molin, 1986a). Este locus codifica para 3 genes: *hok* (host killing), *sok* (suppressor of killing) y *mok* (modulation of killing) (figura 2).

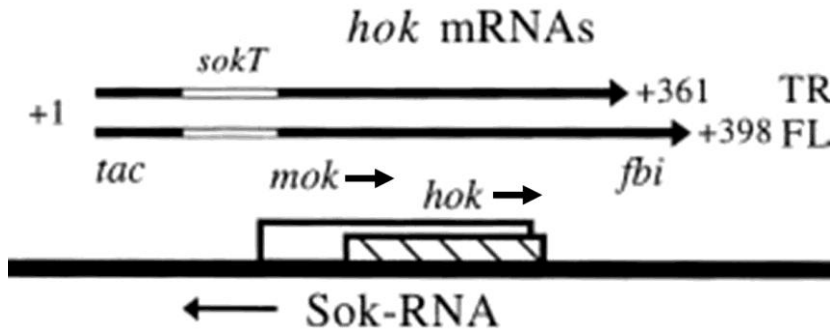


Figura 2. Organización estructural del sistema *hok-sok-mok* del plásmido R1. *hok* (host killing), *sok* (suppressor of killing), *mok* (mediator of killing), *sokT* (sok antisense RNA target), *fbi* (foldback inhibition element), *tac* (translational activation element), FL (full length) y TR (truncated) (Tomado de Pedersen y Gerdes, 1999).

hok da origen a un producto con un perfil polipeptídico hidrofóbico de 52 aminoácidos, el cual se asocia a la membrana plasmática y cuya sobreexpresión induce una rápida disminución del consumo de oxígeno en la célula, disminución del potencial electroquímico de la membrana (figura 3) y finalmente la muerte celular (figura 4) (Gerdes, 1986b). Así mismo, existe un cambio morfológico en las células en las cuales se sobreexpresa Hok. Este cambio, llamado en conjunto *ghost cell*, se caracteriza por la formación de células no viables, transparentes y con condensación celular en los polos (figura 5). Estas observaciones son el fundamento de dos posibles modelos que explican la toxicidad de Hok. En uno de ellos el blanco potencial de Hok es un componente de la cadena respiratoria (Gerdes *et al.*, 1986). En el otro modelo se propone que Hok forma poros en la membrana celular (Ronchel *et al.*, 1998), los cuales permitirían su permeabilización, la salida de material celular y la entrada de líquido, lo cual pudiera explicar la aparición de las *ghost cells* (Gerdes *et al.*, 1986). Cabe destacar que resultados preliminares de nuestro laboratorio, aún no publicados, sugieren fuertemente que el blanco de Gef no es la cadena

respiratoria, dado que el consumo de oxígeno puede reactivarse si se añade al medio donde se sobreexpresó Gef (células muertas) un sustrato de la cadena respiratoria, como es el NADH.

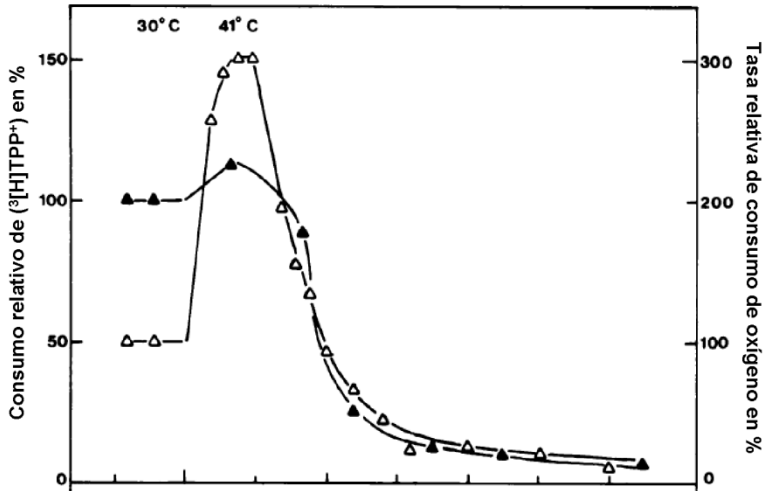


Figura 3. Potencial de membrana ($^3\text{[H]TPP}^+$) y consumo de oxígeno de la cepa CM12, portadora del plásmido pKG341 (*hok*⁺ con un promotor termoactivable (41°C)). Potencial de membrana (▲), consumo de oxígeno (△). Tomado de Gerdes *et al.*, 1986b.

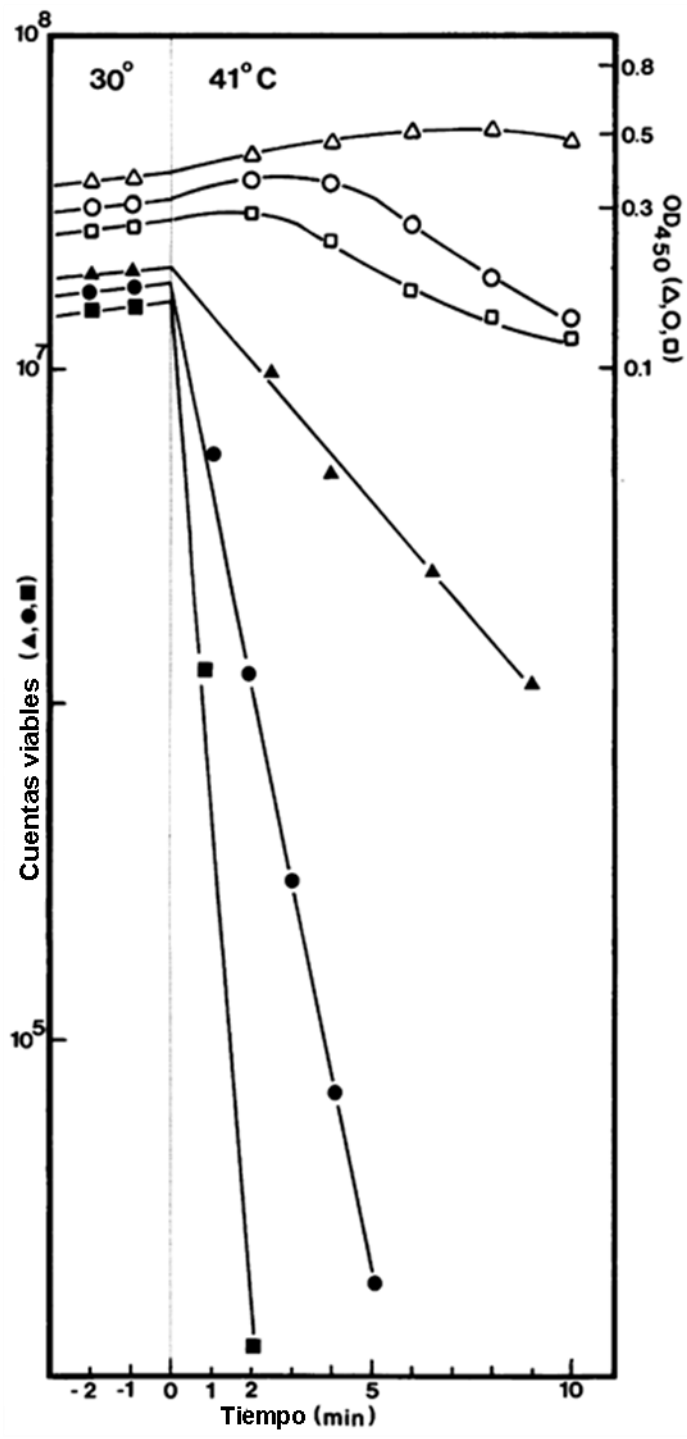


Figura 4. Viabilidad y densidad celular de un cultivo en el cual se indujo la sobreexpresión del gen *hok* mediante un promotor termoactivable (41° C). Símbolos abiertos: OD₄₅₀. Símbolos cerrados: cuentas viables. ▲ □ (*sok*⁺ *hok*⁺), □ ■ (*relF*⁺), ○ ● (*hok*⁺). Tomado de Gerdes *et al.*, 1986b.

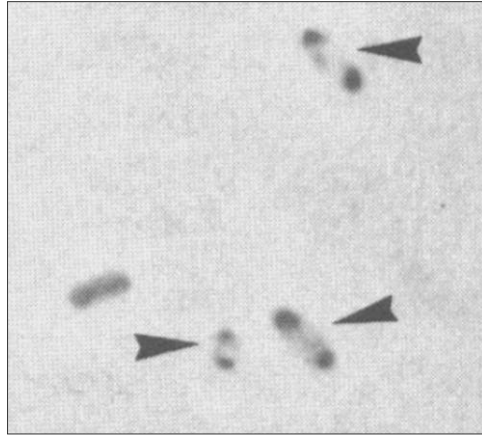


Figura 5. Fotografía de microscopía óptica de una muestra de un cultivo celular en el cual se indujo la sobreexpresión del gen *hok* mediante un promotor termoactivable (41° C). Las flechas muestran a las *ghost cells*, fenotipo característico de la sobreexpresión de *hok*. Tomado de Gerdes *et al.*, 1986b.

Regulación del RNA de hok por un RNA antisentido

La expresión de *hok* está regulada a nivel postranscripcional por un RNA antisentido de 67 nucleótidos llamado *mok*, el cual se transcribe en dirección opuesta (figura 2). *mok* se sobrelapa con *hok* y se requiere para su traducción. Por su parte, el RNA de *sok* bloquea la traducción de *mok*, y debido a que la traducción de *hok* depende de la traducción de *mok*, *sok* indirectamente inhibe la traducción de *hok* (Thiested, Nielsen y Gerdes, 1994a). Esto ocurre porque el blanco del RNA de *sok* (SokT) está en el RNAm *leader* de *hok* (Thiested, Nielsen

y Gerdes, 1994a). Esta región se traslapa con la región de inicio de la traducción (TIR) de *mok*, evitando de este modo la entrada de los ribosomas a esta zona (figura 2) (Thiested, Sorensen y Gerdes, 1995).

Para que los sistemas TA funcionen adecuadamente en la muerte postsegregacional, las estabildades de la toxina y la antitoxina deben ser distintas. Esto se ha encontrado en los genes del locus *parB*. Por una parte, *sok* se transcribe a partir de un promotor muy fuerte, sin embargo, la vida media de su RNA es muy corta (~30 segundos); caso contrario es el RNAm de *hok*, el cual se transcribe a partir de un promotor muy débil, pero que es muy estable (~30 minutos) (Franch, Gulyaev y Gerdes, 1997). Durante el crecimiento celular activo, el RNA de *sok* está en un exceso molar considerable con respecto al RNAm de *hok*, lo cual impide su traducción, sin embargo, en células que han perdido el plásmido R1, *hok* puede traducirse llevando a la muerte postsegregacional (Thiested, Sorensen y Gerdes, 1995).

Profundizando un poco en el mecanismo de inhibición de *sok* sobre *hok*, cabe comentar que el RNA de *sok* y el RNAm de *hok* forman un RNA dúplex completo que es cortado por la RNasa III (Gerdes *et al.*, 1992). En un principio, el RNAm naciente de *hok* es estable e inactivo. A medida que este RNAm continúa su transcripción, adopta una conformación que es inaccesible para la entrada de los ribosomas y para el RNA de *sok* (Nagel *et al.*, 1999). Al final de la transcripción de *hok* se obtiene un RNA completo (Full lenght = FL) (figura 6 A). Posteriormente, el RNAm de *hok* es procesado en su extremo 3', convirtiéndose en un RNAm maduro, el cual es traducible y capaz de unirse al RNA de *sok* (figura 6 A) (Gerdes, Thiested y Martinussen, 1990b). En las células que conservan el plásmido R1, el RNA de *sok* puede unirse a la forma madura del RNAm de *hok* y evitar su traducción (figura 6 B); sin embargo, en aquellas células que han perdido el plásmido ya no existe RNA de *sok*, acumulándose de esta forma RNAm maduro (traducible) de *hok*, el cual al traducirse, mata a las células (figura 6 C). El RNAm completo de *hok* (RNA FL) se distingue del RNAm maduro (procesado en 3') por 39 nucleótidos. Sin embargo, sus diferencias en

estabilidad se derivan del hecho de que el RNAm FL de *hok* está altamente estructurado y que sus extremos 5' y 3' forman un apareamiento como (*fbi-tac*).

El paso más importante de activación (procesamiento 3') de este RNA FL está dictado por un cambio conformacional del extremo 5' que crea una estructura tallo-asa a la cual el RNA de *sok* puede unirse (Franch, Gultyaev y Gerdes, 1997). Esta estructura contiene una estructura vuelta U (U-turn) que incrementa la tasa de unión del RNA de *sok* aproximadamente 10 veces (Franch, Gultyaev y Gerdes, 1997) (figura 6).

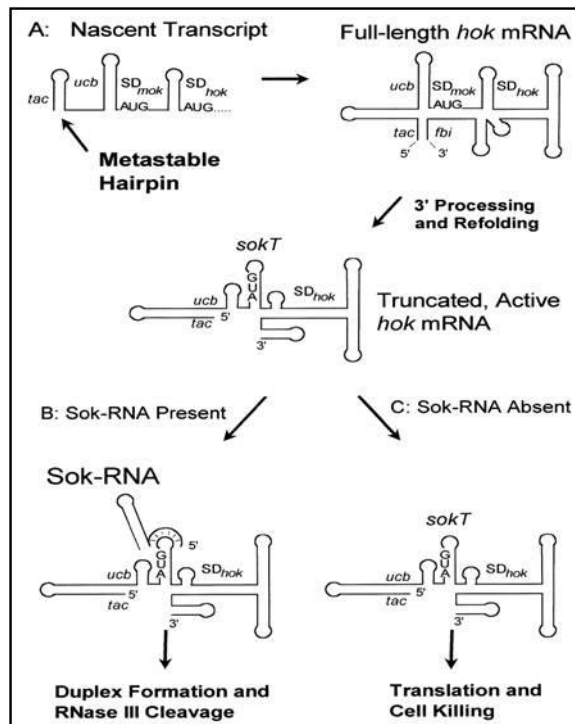


Figura 6. Modelo molecular que explica la activación de la traducción de *hok* en células sin plásmido. (Pedersen y Gerdes, 1999). A) Ruta de plegamiento del RNAm de *hok*. Durante la transcripción, una asa metaestable en el extremo 5' del RNAm evita la formación del fragmento del *tac* (translational *activation*). La formación del fragmento *tac* en el transcrito nascente puede llevar a la activación prematura de la traducción o a la unión del RNA antisentido. En el transcrito completo (FL), el elemento *fbi* (*fold-back inhibition*) se aparea con *tac* cerrando el RNAm en una conformación inerte. En este estado la región

sokT (*sok* Target) está protegida por una estructura *fold back*. Durante el crecimiento celular activo, el RNA FL se acumula en las células que tienen plásmido. Este RNA FL es activado por un procesamiento en su extremo 3', el cual remueve el elemento *fbi*. La remoción del elemento *fbi* desencadena un replegamiento del extremo 5' del RNAm con la formación de las asas *tac* y blanco para el RNA antisentido (blanco de *sok*). B) En las células que tienen el plásmido, el RNAm truncado es secuestrado rápidamente por el RNA de *sok*, el cual evita su traducción. Subsecuentemente, el RNA híbrido es cortado por la RNasa III. c) En células sin plásmido, en las cuales el RNA antisentido ya se ha degradado, la traducción del RNA truncado de *hok* puede llevarse a cabo, matando a la célula.

Cabe comentar que aunque está bien establecida la función estabilizadora de plásmidos del locus *parB* (*hok/sok*) de R1, Pecota y Wood (1996) demostraron que después de la infección con fago T4, la densidad óptica (DO₆₀₀) de una cepa que contiene el sistema *hok/sok* en un plásmido de alto número de copias continúa creciendo, mientras que la DO₆₀₀ de una cepa sin este locus, disminuye rápidamente.

Genes *hok* cromosomales

En el cromosoma de *Escherichia coli* K-12 se tienen 5 homólogos del gen *hok* del plásmido R1, llamados *hokA*, *hokB*, *hokC* (sinónimo de *gef*), *hokD* (sinónimo de *relF*) y *hokE*, los cuales se localizan, respectivamente, en los minutos 80.1, 32.2, 0.4, 35.4 y 13.1 del mapa cromosómico de *E. coli* K-12 (Blattner *et al.*, 1997). Un alineamiento de la secuencia de los péptidos que codifican estos genes permite observar que conservan entre todos ellos (y entre ellos con el gen *hok* del plásmido R1) un número considerable de aminoácidos (figura 7) y elementos regulatorios (figura 8) (Pedersen y Gerdes, 1999).

Hok,R1	MKLPRSSLVW	CVLIVCLTLL	IFTYLTRKSL	CEIRYRDGHR	EVAAFMAYES	GK
HokA, C	MPOOKYRLL-	SLIVICFTLL	FFTWMIRDSL	CELHIKQESY	ELAAFLACKL	KE
HokB, K12	-MKHNPLVV-	CLLIICITIL	TFTLLTROTL	YELRFRDGDK	EVAALMACTS	R-
HokC, Ecor24	MKQHKAMIV-	ALIVICITAV	VAALVTRKDL	CEVHIRTGQT	EVAVFTAYES	E-
HokD, K12	MKQOKAMLI-	ALIVICLTVI	VTALVTRKDL	CEVRIIRDQT	EVAVFTAYEP	EE
HokE, K12	-MLTKYALA-	AVIVLCLTVL	GFTLLVGDSL	CEFTVKERNI	EFKAVLAYEP	KK

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los cinco genes *hok* cromosomales y el gen *hok* del plásmido R1. (Pedersen y Gerdes, 1999). Un mismo color corresponde a un mismo tipo de aminoácido.

Estos cinco genes cromosomales han sido clonados y sobreexpresados a partir de un promotor inducible con IPTG (*hokA*, *hokB* y *hokC*) o termoinducible (*hokD* y *hokF*), observándose un efecto tóxico con consecuencias muy similares a las obtenidas con la sobreexpresión de la proteína Hok del plásmido R1 (Pedersen y Gerdes, 1999; Gerdes *et al.*, 1986). No obstante, su función en cantidades fisiológicas se desconoce.

En el gen *hokA* un elemento IS150 está insertado 32 pares de bases río arriba de su codón de inicio (figura 8 A). Si la secuencia de este IS es removida de la secuencia del gen *hokA* se observa un sistema homólogo al gen *hok* del plásmido R1, con un promotor potencial para RNAm de *hokA*, así como los elementos regulatorios *fbi* y *tac* característicos de *hok* (R1), lo cual sugiere que el elemento IS150 pudo haber inactivado al gen (Pedersen y Gerdes, 1999) (figura 8 A). De forma similar, en el gen *hokC* (*gef*) se encuentra un elemento IS186, 22 pares de bases río abajo del marco de lectura que codifica para la proteína Gef (figura 8 C). Al igual que en el caso de *hokA*, la secuencia de DNA para el locus *hokC* (eliminando al IS186) muestra un sistema *hok* similar al de R1, con elementos *fbi*, *tac*, *sok* y *mok* (Pedersen y Gerdes, 1999). Una situación muy similar se encuentra para el gen *hokE*, el cual también tiene un elemento IS186, aunque a 21 pares de bases río abajo del marco de lectura para la proteína tóxica (Pedersen y Gerdes, 1999) (figura 8 E).

En el caso de *hokB* se encuentra un locus con todos los elementos regulatorios tipo *hok* de R1, sin observarse elementos IS en su secuencia que lo pudieran inactivar (Pedersen y Gerdes, 1999) (figura 8 B). El cuarto homólogo a *hok* de R1, *hokD* (también conocido como *relF*) es el tercer gen del operón *relB*, cuyos dos primeros genes forman un sistema TA probablemente independiente (Gotfredsen y Gerdes, 1998). En el caso de *hokD* se encuentra un elemento

potencial *fbi*, sin embargo, los elementos regulatorios río arriba no se encuentran, lo cual sugiere que este gen es un relicto de un sistema genético funcional tipo *hok* de R1 (Pedersen y Gerdes, 1999) (figura 8 D). Resulta muy interesante que estos cinco genes cromosomales (con y sin elementos de inserción que pudieran inactivarlos) no llevan a cabo el proceso de muerte postsegregacional ni la consecuente estabilización del plásmido en la población, como sí observa con el gen *hok* de R1 (Pedersen y Gerdes, 1999). Esto resulta aún más sorprendente si se considera que los loci *hokA* y *hokC*, sin elementos IS, producen RNA's antisentido inestables así como RNA's mensajeros estables, productos del gen de la antitoxina y del de la toxina (respectivamente), los cuales son procesados en forma muy similar a los encontrados en el locus *parB* de R1 (Pedersen y Gerdes, 1999).

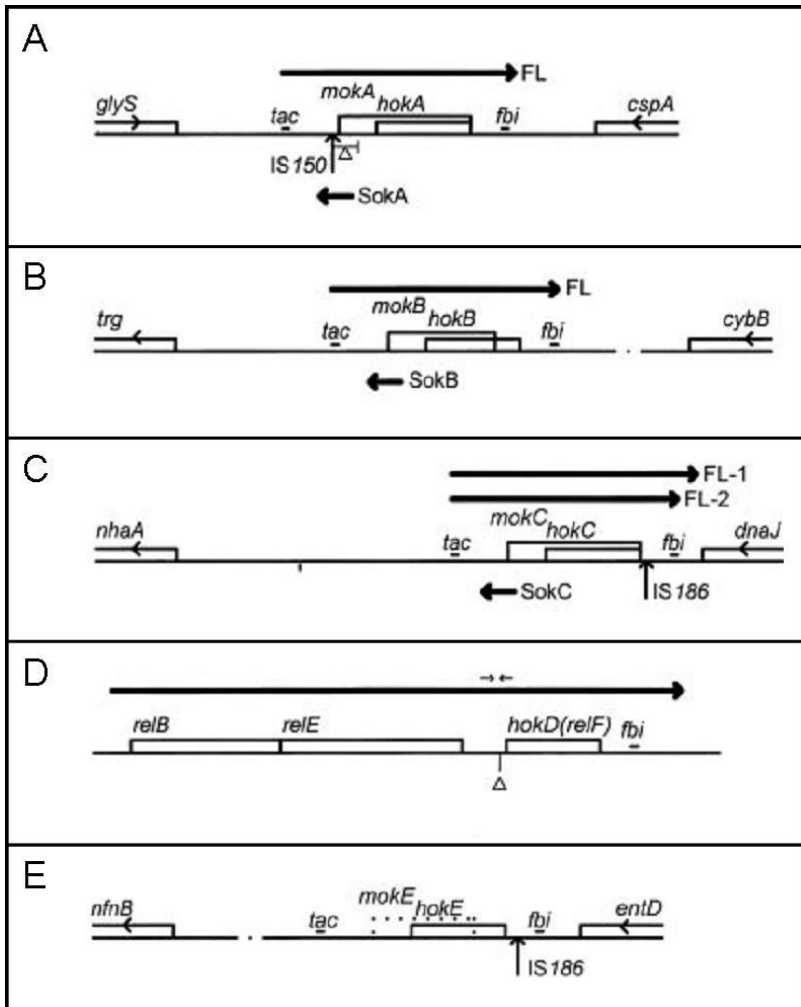


Figura 8. Estructura y organización de los cinco genes cromosomales *hok*. *fbi* (foldback inhibition element), *tac* (translational activation element), FL (full length) y TR (truncated). (Pedersen y Gerdes, 1999).

Posibles funciones de los sistemas TA cromosomales

Hasta la fecha no se ha encontrado una función fisiológica para los genes *hok* del cromosoma ni para la gran mayoría de los demás sistemas TA

cromosomales, sin embargo, las hipótesis que han surgido son muchas y muy variadas. Una hipótesis que fue aceptada ampliamente durante mucho tiempo, es que estos sistemas estaban involucrados en una respuesta general al estrés (Buts *et al.*, 2005). No obstante, recientemente se comparó el comportamiento de una cepa de *E. coli* MG1655 wt contra una cepa derivada, desprovista de cinco sistemas TA cromosomales distintos a los genes *hok* (*mazEF*, *relBE*, *yefM-yoeB*, *chpB* y *dinJ-yafQ*) en diferentes condiciones de estrés (estrés nutricional y calórico), sin encontrar diferencias en la viabilidad, incluso en condiciones en las cuales se había reportado que dichos genes eran ventajosos (Tsilibaris *et al.*, 2007). Ello ha motivado el surgimiento de algunas “funciones” hipotéticas (Magnusson, 2007), entre ellas: a) DNA basura adquirido mediante plásmidos y otras fuentes, b) alelos “egoístas” (un término recurrente en la literatura al respecto), c) reguladores genéticos, d) altruismo nutricional y e) exclusión frente a la infección por fagos. Cabe comentar que la hipótesis de DNA basura (o sin función) presenta evidencia contradictoria, pues mientras que la distribución de muchos de estos sistemas varía de un aislado a otro (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009), se han encontrado homólogos de *hok* en especies poco cercanas como *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Poulsen *et al.*, 1989) lo cual sugiere una función importante. Así mismo, la alineación de las secuencias de aminoácidos de los genes *hok* cromosomales y del plásmido R1 (figura 7), muestra la conservación de dos residuos de cisteína en las posiciones 15 y 30, sugiriendo fuertemente una importancia funcional. Estos dos residuos se cambiaron por serinas en la proteína Gef, observándose que sólo el de la posición 30 está involucrado en la formación de dímeros, sin embargo, ninguno de estos residuos se requiere para que la proteína mantenga sus propiedades tóxicas cuando se sobreexpresa (Poulsen *et al.*, 1991). Por otra parte, Saavedra, Mine y Van Melderen (2008), estudiando un sistema TA distinto, han demostrado que el gen cromosomal *ccd* de *Erwinia chrysanthemi* protege a *Escherichia coli* de la muerte postsegregacional mediada por su homólogo plasmídico *ccd_F*, cuando *E. coli* tiene integrado a *ccd* en su cromosoma. Este grupo de trabajo propone que la integración de los sistemas TA plasmídicos al cromosoma pudo

resultar ventajosa, dado que la antitoxina se podía ahora producir en forma independiente a la presencia del plásmido, evitando así la muerte postsegregacional.

El gen hokC o gef

En el presente trabajo se ha tomado al gen *hokC* como modelo representativo de los demás genes *hok* cromosomales. En el locus *hokC/sokC* (cuyos sinónimos son *gef* y *sof*, respectivamente) *gef* codifica para la proteína tóxica Gef de 50 aminoácidos, la cual, si se sobreexpresa, tiene el mismo efecto en la viabilidad y morfología que la proteína Hok del plásmido R1 (fenotipo *ghost cell*, disminución del consumo de oxígeno y disminución de la viabilidad) (Gerdes *et al.*, 1986a). Al igual de Hok de R1, Gef es una proteína integral de membrana cuya parte carboxilo terminal (segmento tóxico) se localiza en el periplasma (Poulsen *et al.*, 1991). En este caso, la traducción de Gef está acoplada a la traducción de un marco de lectura abierto (ORF69), el cual es homólogo al modulador de muerte (*mok*) del locus *parB* del plásmido R1. También, en forma análoga a lo que sucede en *parB* de R1, se sabe que el RNA antisentido de *sof* secuestra el sitio de unión ribosomal del ORF69, inhibiendo de este modo la traducción de *gef* (Poulsen *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha determinado que la expresión de *gef* es constitutiva (Poulsen *et al.*, 1989) y que está impulsada por un promotor muy débil respecto al promotor de *sof*, que es mucho más fuerte, aproximadamente 200 veces (Poulsen *et al.*, 1991). De hecho, en el trabajo de Poulsen *et al.*, (1991) no se detectó actividad de β -galactosidasa en una fusión transcripcional *gef-lacZ* en fase exponencial de crecimiento, sin embargo, se desconoce en qué condiciones pudiera incrementarse la expresión de *gef* y/o disminuir la expresión de *sof*. No obstante, se ha observado una ligera disminución de la expresión de *gef*, inducida por la acción de la feromona de señalización AI-2 (autoinducer 2) (DeLisa *et al.* 2001). Por otra parte, se sabe que una cepa de *E. coli* mutante en *gef* es viable y en fase exponencial se

comporta de igual forma que la cepa silvestre a diferentes pH y concentraciones de NaCl y glucosa (Poulsen *et al.*, 1989). Cabe comentar que una cepa doble mutante *hokC (gef)* y *hokD (relF)* tiene una cinética de sobrevivencia idéntica que una cepa wt en fase estacionaria prolongada (Poulsen *et al.*, 1991). Es así que aunque este gen no es esencial bajo estas condiciones, posiblemente sea importante (o incremente su expresión) en otras circunstancias aún no exploradas.

Resultados previos de este laboratorio acerca del monitoreo de la actividad transcripcional de *gef* y *sof* en diferentes etapas del crecimiento (con fusiones transcripcionales *lacZ* construidas por un método distinto al que se describirá posteriormente), mostraban una disminución de la expresión de *sof* poco después de la fase exponencial de crecimiento (figuras 9 y 10). Este resultado sugirió la posibilidad de que en algún momento de la fase estacionaria, la disminución de la expresión de *sof* permitiera la traducción de *gef* y la lisis de una parte de la población celular, logrando que otras células incorporen los restos celulares liberados en forma de nutrientes. No obstante, la actividad transcripcional de *gef* obtenida con estas fusiones no coincidió con la actividad reportada previamente para este gen (Poulsen *et al.*, 1991). Esto motivó la construcción de nuevas fusiones transcripcionales *gef-lacZ* y *sof-lacZ* y su monitoreo en una fase estacionaria prolongada, entre otros objetivos.

Finalmente, cabe destacar que la publicación de trabajos científicos respecto a la posible función de los genes *gef* y *sof* no presenta actualización alguna desde el trabajo de Poulsen *et al.*, (1992), en el cual (tratando de identificar al blanco específico sobre el cual actúa Gef) caracterizan a una cepa mutante resistente a su acción letal. No obstante, los genes *gef* y *sof* se mencionan en revisiones y otros trabajos que abordan a los sistemas TA en general (Gerdes y Wagner, 2007; Yarmolinsky, 1995, Holcik y Ier, 1997; Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009). También se han presentado algunas publicaciones en donde la proteína Gef se utiliza como terapia contra la proliferación de células cancerígenas humanas (en las cuales se observa una clara afectación a las mitocondrias)

(Prados *et al.*, 2008) y como agente en el tratamiento de infecciones bacterianas de mamíferos (Westwater *et al.*, 2003).

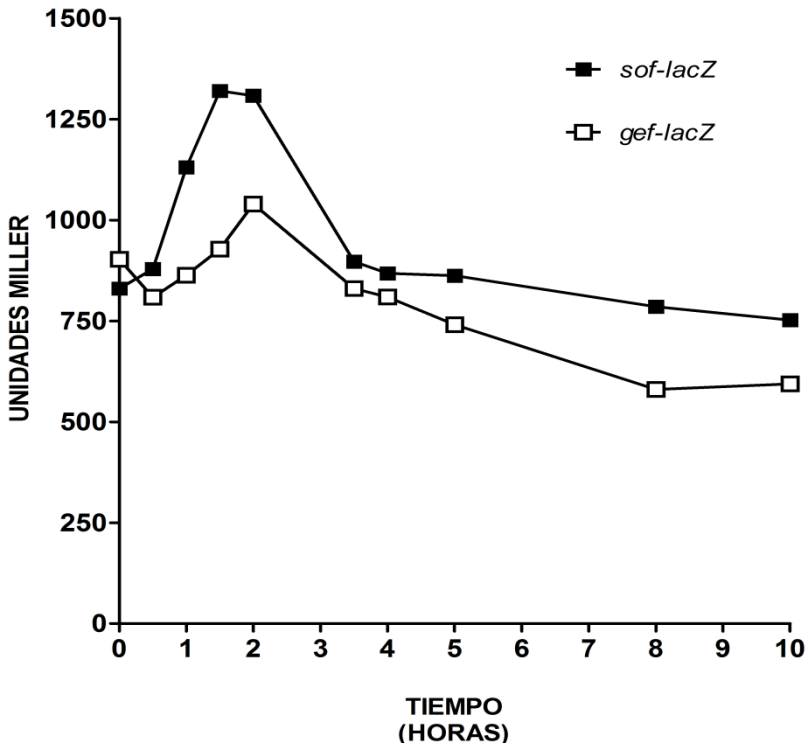


Figura 9. Actividad transcripcional de *gef* y *sof* durante diferentes etapas de crecimiento. ■ (*sof-lacZ*), □ (*gef-lacZ*). Comunicación personal con Aurora Labastida, ex estudiante de este laboratorio.

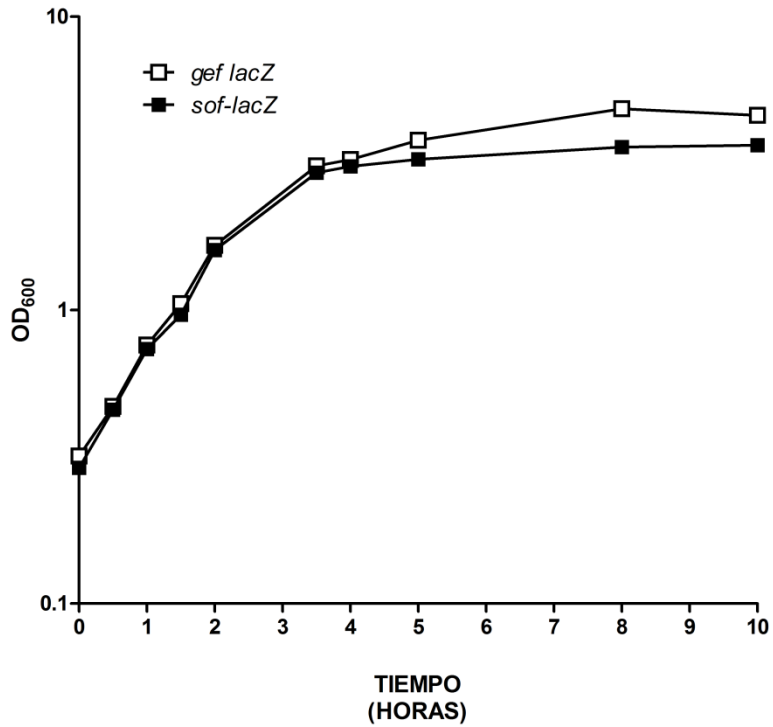


Figura 10. Crecimiento (OD_{600}) de las cepas reporteras de los genes *gef-lacZ* y *sof-lacZ* durante diferentes etapas de crecimiento. ■ (*sof-lacZ*), □ (*gef-lacZ*). Comunicación personal con Aurora Labastida, ex estudiante de este laboratorio.

OBJETIVOS

General

Identificar las condiciones (fisiológicas o de estrés) que incrementan la expresión del gen *gef* y/o reprimen la expresión del gen *sof*.

Particulares

- I. Determinar los niveles de expresión del gen *gef* y del gen *sof* en distintas condiciones de estrés (nutrimental, calórico y por infección con fago).
- II. Determinar la viabilidad de una cepa de *E. coli* que carece de todos los genes homólogos de *hok* (*hokA*, *hokB*, *hokC*, *hokD* y *hokE*). Si la función de estos genes es lograr la sobrevivencia a largo plazo de una parte de la población bacteriana, una cepa sin ninguno de estos homólogos cromosomales caería súbitamente frente al estrés nutrimental.

HIPÓTESIS

Existen condiciones de crecimiento (fisiológicas o de estrés) para la bacteria *Escherichia coli*, que incrementan la débil expresión del gen *gef*, o bien, inhiben la expresión del gen *sof* (RNA antisentido) produciendo el suicidio celular.

Por otra parte, es posible que la activación de estos genes se de en algunas condiciones de estrés permitiendo la sobrevivencia a largo plazo de una parte de la población bacteriana, que utiliza los nutrientes liberados por la lisis de algunas células. De este modo, la viabilidad de una cepa, sin ninguno de estos homólogos cromosomales, caería súbitamente al no contar con nutrientes. Es decir, que la posible función de los genes *hok* cromosomales es el control poblacional frente al estrés.

JUSTIFICACIÓN

La función estabilizadora del loci *hok/sok* del plásmido R1 fue establecida poco después de su descubrimiento (Gerdes, Rasmussen y Molin, 1986), sin embargo, la función de los homólogos cromosomales de este gen, cuyo descubrimiento se remonta al trabajo de Gerdes *et al.* (1986) aún no se ha establecido. Se sabe que estos genes cromosomales son letales para la célula cuando se sobreexpresan, como sucede con su homólogo de plásmido, no obstante, aún falta realizar estudios sin recurrir a la sobreexpresión de estos genes y/o caracterizar el comportamiento de una cepa que carezca de todos los genes cromosomales homólogos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de fusiones *gef-lacZ* y *sof-lacZ* para el monitoreo de la actividad transcripcional

Los Plásmidos CRIM

La construcción de estas fusiones se llevó cabo de acuerdo al protocolo descrito por Zhou *et al.*, (2003) empleando los plásmidos CRIM (Conditional-Replication, Integration and Modular), los cuales cuentan con la ventaja de integrar al cromosoma fusiones transcripcionales *lacZ* en una sola copia, pudiéndose distinguir fácilmente de integraciones múltiples debido a los distintos tamaños de los fragmentos de PCR generados en cada caso (Haldimann y Wanner, 2001) (tabla 1 y figura 11). Estos plásmidos son integrados al cromosoma bacteriano en un sitio de inserción (*attB*) mediante la acción de una integrasa termoactivable de fago (Int), codificada en un plásmido *helper Int* independiente (figura 11). El plásmido CRIM que porta la fusión transcripcional es replicable en mediano (15 por célula) o en alto número de copias (250 por célula), en una cepa *pir*⁺ o *pir*⁻¹¹⁶, respectivamente (Haldimann y Wanner, 2001). Existen diferentes plásmidos CRIM, cada uno con distintos sitios *attP* y *attB* (para los fagos λ , HK022, Φ 80, P21 y P22) y distintos genes de resistencia a antibióticos, en conjunto con una región múltiple de clonación río arriba del gen reportero *lacZ*, que permite el monitoreo de los genes clonados (figura 12).

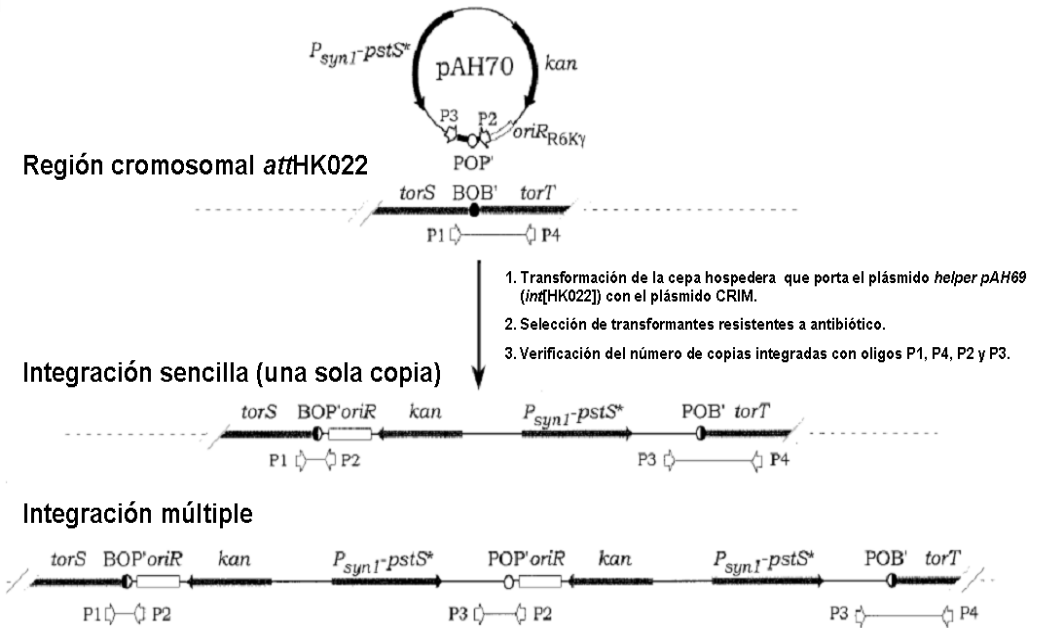


Figura 11. Ejemplo del proceso de integración de un plásmido CRIM (pAH70) con sitios de unión a fago *attHK022*. *POB'* y *BOP'* son sitios de recombinación sitio-específica para fago. *P1*, *P2*, *P3* y *P4* son los sitios de unión de los oligonucleótidos usados en las pruebas de PCR (Tomado y modificado de Haldiman y Wanner, 2001).

Construcción de los plásmidos de integración pMX901 (pAH125+gef-lacZ) y pMX902 (pAH125+sof-lacZ)

Los plásmidos de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) y pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) se construyeron tomando como base al plásmido CRIM pAH125 (figura 12). Para la construcción del plásmido pMX901 se amplificó mediante PCR una región de 562 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *gef*, con DNA cromosomal de una cepa MC4100 wt como templado, empleando los primers Gef Fw (5'cccgaattcTGGCTAGCGATCCTTGC 3') y Gef Rv (3'CGAGGCCTCCTATatgcgatccggg 5') (figuras 13 y 14). Este fragmento, de 820 pares de bases (figura 19), se clonó en el plásmido pGEM[®]-T Easy de PROMEGA, generando pGEM-T Easy-*gef* (figura 14). La orientación del fragmento clonado respecto al gen *lacZ* se verificó mediante dobles digestiones

HincII/BamHI y *PvuII/BamHI* (figura 20). Por otra parte, el plásmido CRIM pAH125 fue digerido con la enzima *PstI*, tratado posteriormente con el fragmento “klenow” de la DNA Polimerasa I y finalmente digerido con la endonucleasa *BamHI*. El fragmento del promotor de *gef* y el plásmido pAH125, así tratados, se ligaron con la ligasa del fago T4 (figura 14).

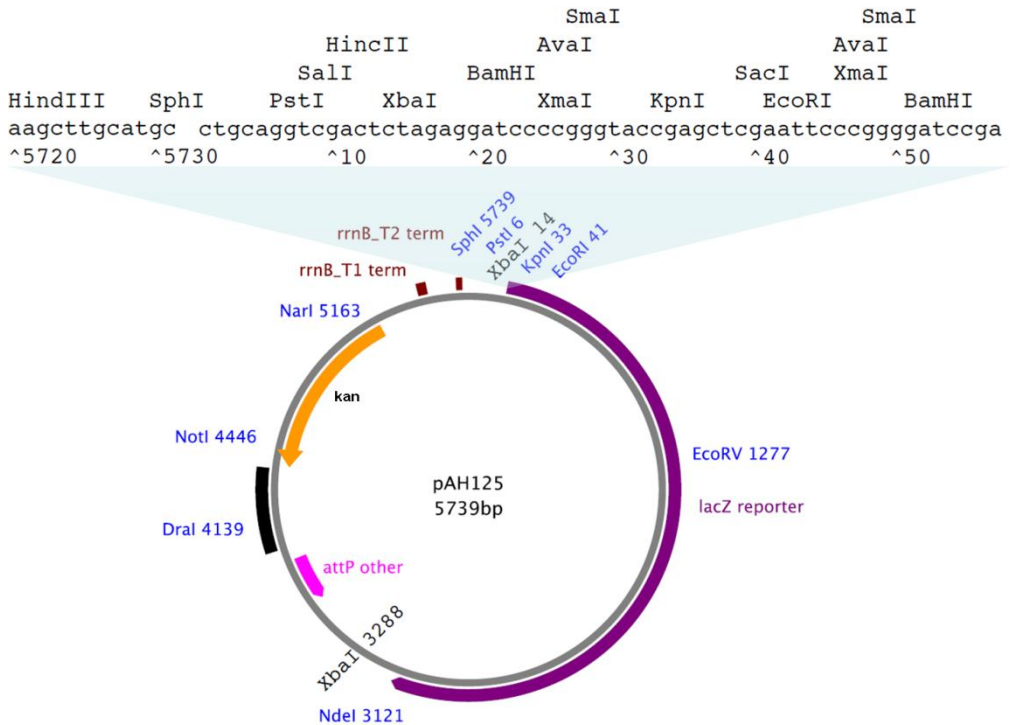


Figura 12. Plásmido CRIM pAH125 utilizado en la construcción de las fusiones *gef-lacZ* y *sof-lacZ* de este trabajo (Haldimann y Wanner, 2001).

gatagagtaatgccggcacaatcatcccaccaatagcggcgataactggaatgcccgcctggcgtaagcTGGCTAGC
 Gef Fw cccgaattc →
 GATCCTTGCATCAGTTCACGTTTAACTTCCAGACCGACTAACAGGAAAAATACCGCCATCAGCGCGTCATTATATCCA
 TAACAGCATGTTTTTGTGATTTTCGAGTGAACCAACCCGGAGCTGAACCGGCTCTCCAGAAAGTCGTGATACCATC
 CACTGGTTGCGCCGCTGTTGGCCATAATCATCGCCAGGATAGCGGCAATGATAAGAATAATGCCTCCCAGGCATCA
 CTGCTAAAGAATCGATGCAGATGTTTCACTTTTTATTCTCTTTCAGGTGAATAGATCGTTTTTACTATTTTACCCC
 GCACGAATCATCGTTAAAATCAGATTATAGTGTAGGAATAATTCGTTTTTTACGAGCTATTGAAGAATTTGCGCCAT
 CAGCGGTGAGATGCGTTTTTTCAGCGCTGTAAGCGCTCACGAGTGACCCTAAGCCTAGATAATCATAGCTTAAGGTGA
 GGATTCTCTGAGGGATTAATTAGGAAAAGTAATAATTAATTTGTTGTGTCAGTCGGCGATGCTTGTTAGGCCAATATTTT
 AAAAATAATCCAGCTTGTGTCGAATAATTGCGATGAAGAGATAAATTAAGTTAAATAATTAATCATTAAAAAATT
 -10
 ACGCCACAAAAATGCGAGGCGTCTTCAGGATTAGAATCGATAAAACAAAATGGGTTAAAGAGAGCGATATAATAGCG
 GCGGGTGCTTGAGGCTGTCTGTCTCAGGCATTAGCTGAACGGCAGATAGAGAAAAGCCCGAGTGATATTTTACCAT
 CAACC CGAGGCCTCCTAT *mok* *sof* *Gef*
 atgctgaacacatgtagagtgctcttactgaccgtaaggtaaggdagaagagcaat
 RBS I ← atg *atg* *cgga* *tcc* *ggg* Gef Rv RBS II
 gaagcagcataaggcgatgatgtgctgcctgatcgtcatctgtatcaccgcccgtagtggcggcgctggtaacgagaa
 aagacctctgtgaggttcacatccgaactggccagacggagggtgctgttttcacggcttacgaatccgagtaagag
 caacggcggggagtgatcccataagcgctaacttaagggttgaaccatctgaagaatgcgacgcctcggtgccctcgt
 taagacgatgcctcgcgttcttcaattgcgttttgtaggctgtcagggatactgtcccacgaatggccacctgtaag
 ctccagatgaccatTTTTgttattctcacaacgagtttagttcttcttttcggatccggcacttctgggggggaaat
 ccagcgatggctattatgtcgtcaattaaaaatgcccgcgagtagattagcaaatccacgcttctcgcgagttcagg
 ttctttgacgcaaaagcatccaggtgcagcaactttgagccgcttaaagccagttcaatttgccatcgcagac
 ggtaacaatcagccacttgctcgtcgaatattcatcttccggtaaatgatgtagcaatagcacatggcccgtcgt
 tcacgctttccgcctgaactactcgtccttttcgacgattctcgcgtgagcagtcgggttttactgattaatgcttt
 ttccgggaggaagtatacggcaatgagacgtgcgggaaagggagctccggcttttttataactgaattgcctatca
 ttacagtggtttcaccgttcttaccgcaatccagcccgcgagaaaaccatcatgtcaaagcgcattctctcgcag
 ttaaccagcgcaatcctcgcagtgaaacccggacgatataatcagcttctccaaaagcaagtgagcggatacatcgg

Figura 13. Ubicación de las regiones de apareamiento de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la región promotora de *gef*. Gef Fw (secuencia completa): cccgaattcTGGCTAGCGATCCTTGC. Gef Rv (secuencia completa mostrando las “colitas” en minúsculas): CGAGGCCTCCTATatg *cgga* *tcc* *ggg*. Sitios *Eco*RI: *cttaag*. Sitios *Bam*HI: *ggatcc*.

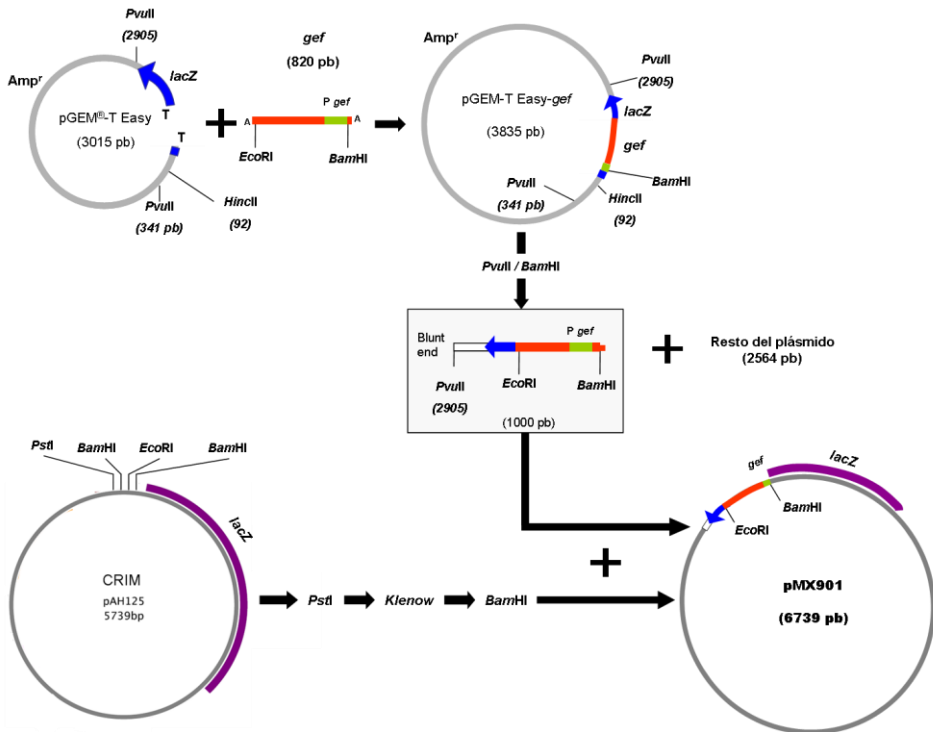


Figura 14. Estrategia de clonación de la región promotora de *gef* para la construcción del plásmido de integración pMX901 (CRIM pAH125+*gef-lacZ*).

Para la construcción del plásmido de integración pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) se amplificó mediante PCR una región de 921 pares de bases, la cual consiste en 900 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *sof* y 21 pares de bases río abajo del mismo sitio, con DNA cromosomal de una cepa MC4100 wt, empleando los oligonucleótidos *Sof Fw* (5' GCGCATTCTTCTGCAGgaattcggg 3') y *Sof Rv* (3' gaaccgggCGAGGCCTCCTATATGC 5') (figura 15). Este fragmento, de 921 pares de bases (figura 19), así como el plásmido pAH125, fueron digeridos con las enzimas *PstI* y *SmaI*. Posteriormente se ligaron ambas partes, plásmido y fragmento ya tratados, con la enzima ligasa del fago T4 (figura 16).

gatagagtaatgccggcacaatcatcccaccaatagcggcgataactggaatgccgcctggcgtaagctggctagc
gatccttgcatcagttcacgtttaacttcagaccgactaacaggaaaaataccgccatcagcgcgtcatttatcca
taacagcatgtttttgttgatttcgagtgaaaccaaccggagctgaaccggcgtctccagaaagtcgtgataccatc
cactggttgcgccgtgttgccataatcatcgccaggatagcggcaatgataagaataatgcctcccaggcatca
ctgctaaagaatcgatgcagatgtttcactttttatttctctttcaggtgaatagatcgttttactattttacc
gcacgaatcatcgttaaaatcagattatagtgtaggaataatcgttttttacgagctattgaagaatttgcgccat
cagcggtgagatgcgtttttgacggctgtaagcgcctcacgagtgaccctaagcctagataatcatagcttaagg
ggattcctgagggattaattagggaaaagtaataaatttggttgctcagtcggcgatgcttggtaggccaatattc
aaaaataatccagcttgcgtcaataatggcgatgaagagataaattaaagttaaataatcattaaaaaatt
acgccacaaaaatgcgaggcgtcttcaggattagaatcgataaaaacaaaatgggttaaagagagcgtataatagc
gcgggtgcttgaggctgtctgtctcaggcattagctgaacggcagatagagaaaagccccgagtgatattttaccat
caaccCGAGGCCTCCTATATGCTGAACACATGTAGAGTGCCCTTACTGACCCGTAAGGTCAAAGGAGAAGAGAGCAAT Sof Rv → gaacc
ccggg RBS I sof ← -10 -35 RBS II Gef
GAAGCAGCATAAGCGATGATTGTCGCCCTGATCGTCATCTGTATCACCGCCGTAGTGGCGGCGCTGGTAACGAGAA
AAGACCTCTGTGAGGTTACACATCCGAAC TGCCAGACGGAGGTTGCTGTTTTTACGGCTTACGAATCCGAGTAAGAG
CAACGGCGGGGAGTGATCCCATAAGCGCTAACTTAAGGTTGAACCATCTGAAGAATGCGACGCCTCGGTGCCTCGT
TAAGACGATGCCTCGGTTCTTCAATTGCGTTTTGTAGGCTGTCAGGGATACTGTCCCACGAATGGCCACCTGTAAG
CTCCAGATGACCATTTTTGTTATTCTCCACAACGAGTTAGTTCTTCTTTTCGGATCCGGCACTTCTGGGGGGAAAT
CCAGCGATGGCTATTATGTCGTC AATTA AAAATGCGCGAGTAGATTAGCAAATATCCACGCTTTCGCGAGTTCAGG
TTCCTTTGCACGCAAAGCATCCAGGTGCAGCAAAC TTTGAGCCGCTTAAAAGCCAGTTC AATTTGCCATCGCAGAC
GGTAACAATCAGCCACTTGCTCTGCTGAATATTCATCTCCGGTAATGATGTTAGCAATAGCACATGGCCCGCTGCT
TCCAGCGTTTTCCGCTGAACTACTCGTCTTTTTCGACGATTCTCGCTGAGCAGTCGGGTTTTACTGATTAATGCTTT
TTCGGGAGGAAGTGATACGGCAATGAGACGTGCCGAAAGGGAGCTCCGCTTTTTTATTACCTGAATTGCCTATCA
TTACAGTGGTTTTACCGTCTTACC GCAATCCAGCCGCGCAGAAAACCCATCATGTCAAAGCGCATTCTGCGAG
ttaaccagcgaatcctcgccagtgaaaccggacgatataatcagcttctccaaaagcaagtgagcggatacattcg
gaattccgg ← Sof Fw

Figura 15. Ubicación de las regiones de apareamiento de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de la región promotora de *sof*. Sof Fw (secuencia completa): GCGCATTCTTCTGCAGgaattccggg. Sof Rw (secuencia completa mostrando las “colitas” en minúsculas): gaaccgggCGAGGCCTCCTATATGC. Sitios *Pst*I: CTGCAG, Sitios *Sma*I: cccggg.

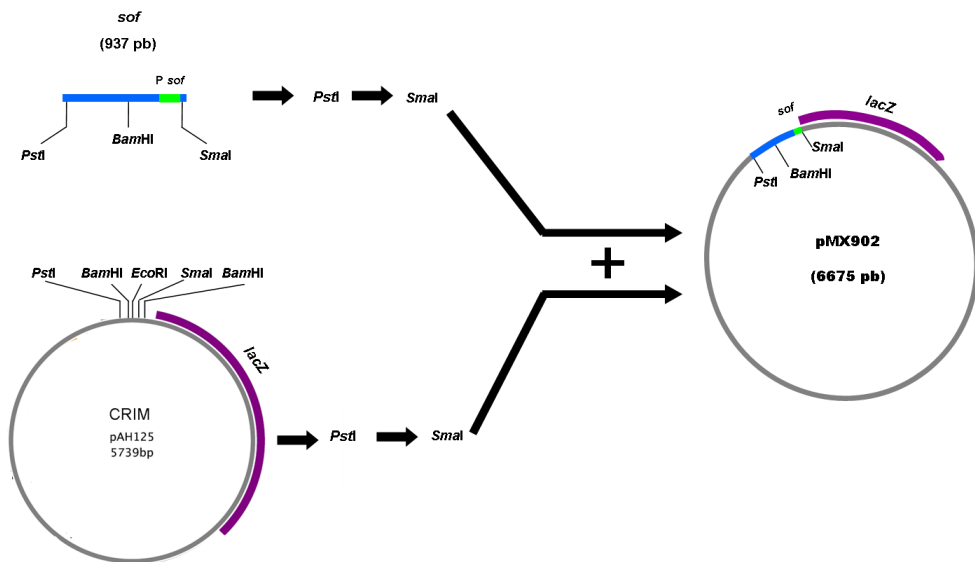


Figura 16. Estrategia de clonación de la región promotora de *sof* para la construcción del plásmido de integración pMX902 (CRIM pAH125+*sof-lacZ*).

Construcción de la cepa receptora MC4100/pINT-ts

La cepa hospedera, en cuyo cromosoma se integraron los plásmidos pMX901 (*gef-lacZ*) o pMX902 (*sof-lacZ*) fue la MC4100. Esta cepa se transformó mediante electroporación con el plásmido *helper* pINT-ts (Amp^r) el cual permite la inserción de los plásmidos CRIM en el sitio *attB* para el fago λ (Haldimann y Wanner, 2001). Las células electrocompetentes empleadas en la electroporación se hicieron a partir de 500 μ l de un cultivo fresco en fase exponencial, con tres lavados consecutivos con agua destilada, estéril y fría. A estas células se añadió el plásmido *helper* pINT-ts y se incubaron en hielo por media hora. Posteriormente se electroporaron en un electroporador *Bio-rad Micropulser*. La recuperación de estas células ya transformadas se hizo a 30° C en medio Luria-Bertani Broth (LB) + ampicilina (100 μ g/ml).

Para incrementar la probabilidad de éxito de integración se hizo, en paralelo a la construcción anterior, la construcción de otra cepa hospedera para la integración de dichos plásmidos, aunque con un plásmido helper distinto al pINT-ts. En este caso el plásmido helper alternativo fue el HK022, el cual se escogió por brindar una gran diferencia en los tamaños de fragmentos de PCR (535 pb de diferencia entre fragmentos en la integración sencilla), de acuerdo al evento de integración que haya ocurrido (Tabla 1).

Integración de los plásmidos de fusión al cromosoma de la cepa hospedera MC4100

Para la integración de los plásmidos de fusión pMX901 o pMX902, se creció un cultivo *overnight* de la cepa receptora MC4100/pINT-ts en medio SOB (por litro: 20 g de triptona, 5 g de levadura y 0.5 g de NaCl) con ampicilina (100 µg/ml) a 30° C y en agitación constante. A partir de este cultivo se inocularon 5 ml de medio SOB fresco para obtener una DO de ~0.01. Este nuevo cultivo se creció a la misma temperatura, agitación y concentración de antibiótico que en el caso anterior, hasta una DO ~ 0.5-0.6. Posteriormente se cambió el cultivo a 42° C durante 20 minutos y luego se puso en hielo durante 5 minutos. A continuación estas células se hicieron electrocompetentes tomando alícuotas de 1 ml en tubos *Eppendorf* estériles y lavándolas 3 veces con agua destilada y fría. A estas células, libres de sales, se añadió alguno de los dos plásmidos de integración (pMX901 o pMX902) y después de media hora en hielo se electroporaron con un electroporador *Bio-rad Micropulser*. Las células se recuperaron en 1 ml de medio SOC (SOB + glucosa 20 mM) a 42° C durante 30 minutos y después a 37° C durante 1 hora. Después de la recuperación, las células se sembraron en medio TYE sólido (por litro: 0.2 g CaCl₂, 10 g de triptona, 1 g de extracto de levadura, 8 g de NaCl, 1 g de glucosa y 15 g de agar) con kanamicina (10 µg/ml) y X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (40 µg/ml). De las colonias obtenidas, se aislaron las colonias azules (figura 17) y se verificó que no

crecieran en medio LB + ampicilina (100 µg/ml). A partir de las colonias que cumplieron con estos dos criterios se extrajo DNA cromosomal para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diferenciar las colonias sin integración, con integración sencilla o con integración múltiple de alguno de los plásmidos de integración, de acuerdo a los tamaños esperados en cada caso (tabla 1). Este procedimiento también se llevó a cabo (en paralelo) con la otra cepa hospedera, portadora del plásmido helper alternativo pAH69.



Figura 17. Imágenes de algunas colonias obtenidas de los procesos de integración de los plásmidos pMX901 (izquierda) y pMX902 (derecha).

Pruebas de PCR para identificar a las colonias con integración sencilla al cromosoma de los plásmidos pMX901 o pMX902

La extracción de DNA de las colonias aisladas (candidatas de haber integrado los plásmidos pMX901 o pMX902) se hizo tomando estas colonias con un palillo, suspendiéndolas en 50 µl de agua destilada estéril, incubándolas 10 minutos a 95° C y centrifugando un minuto a 14,000 RPM. El sobrenadante se usó como fuente de DNA templado. La DNA polimerasa empleada en las reacciones de PCR fue la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. La mezcla de

reacción y las características del ciclo se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Para 20 µl de reacción: 4 µl HF buffer 5X, 0.4 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido [oligos 1 a 4 para el caso de las pruebas para las colonias conseguidas con el plásmido *helper* pINT-ts (*attB* λ) (tabla 1)], 1 µl del DNA templado, 0.2 µl de Phusion® DNA Polymerase y 10.4 µl de agua). El ciclo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 98° C por 30 segundos y 30 ciclos que consistieron en 98° C por 10 segundos de desnaturalización, 63° C de alineamiento por 30 segundos y 72° C por 15 segundos de extensión.

Tabla 1. Pruebas de PCR para la integración de los plásmidos CRIM (Modificada de Haldimann y Wanner, 2001).

				*Tamaño esperado de los fragmentos de PCR para <i>attB</i> con:		
				SIN INTEGRACIÓN	INTEGRACIÓN SENCILLA	INTEGRACIÓN MÚLTIPLE
<i>attP</i> (Plásmido <i>helper</i>)	Secuencia del oligo P1	Secuencia del oligo P4	Temp. (°C)	Fragmento esperado entre P1 y P4	Fragmentos esperados entre P1 y P2, P3 y P4	Fragmentos esperados entre P1 y P2, P3 y P2, y P3 y P4
λ pINT-ts	GGCATCACGGCAATATAC	TCIGGICTGGTAGCAATG	63	741	577, 666	577, 502 y 666
HK022 pAH69	GGAAATCAATGCCITGAGTIG	GGCATCAACAGCACATTC	59	740	289, 824	289, 373, 824

Los oligonucleótidos P2 (ACTTAACGGCTGACATGG) y P3 (ACGAGTATCGAGATGGCA) son los mismos para todos los sitios *attP*. Temp. es la temperatura de alineamiento.

Aquí sólo se muestran dos de los siete distintos plásmidos *helper* que existen, cada uno con distintos sitios *attP*.

* Pares de bases.

Ensayos de β -galactosidasa

La cuantificación de la actividad enzimática de los genes reporteros utilizados en este trabajo se llevó a cabo mediante el ensayo de actividad de β -galactosidasa (Miller, 1972). Para ello se tomó 1ml del medio de cultivo inoculado para determinar el crecimiento (DO_{600}). Una vez tomada esta lectura, se tomaron 100 μ l de esta misma muestra, los cuales se añadieron a tubos de ensayo con 900 μ l de solución de reacción (por litro: 985 ml de buffer Z [por litro: 42.3 ml de NaH_2PO_4 1 M, 57.7 ml de Na_2HPO_4 1M, 0.75g de KCl, 0.25g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$], 11.05 ml de SDS 0.1 % y 2.7 ml de β -Mercaptoetanol). A esta mezcla se añadió 17 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente para conseguir la lisis celular. La reacción enzimática se inició con 200 μ l de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, 4 mg/ml) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Al término de este tiempo la reacción se detuvo mediante la adición de 500 μ l de $NaCO_3$ 1M. Después de 5 minutos de reposo, las muestras se leyeron en un espectrofotómetro *Spectronic Genesis 5* a 420 y 550 nm. La determinación de la actividad de la β -galactosidasa se realizó de acuerdo a la fórmula descrita por Miller (1972):

$$\frac{\text{Abs 420 nm} - (1.75 * \text{Abs 550 nm})}{(T) (V) (DO_{600} \text{ nm})}$$

Donde la absorbancia a **420 nm** es la medición del producto de la actividad β -galactosidasa. El producto **1.75*Abs 550 nm** es un factor de corrección para la absorbancia de detritus celular a esta densidad óptica. **T**, se refiere al tiempo de reacción (20 minutos); **V** al volumen en ml del cultivo de bacterias adicionado para cada reacción y **DO₆₀₀ nm** es la medición de la densidad óptica del cultivo, en el momento de la toma de la muestra.

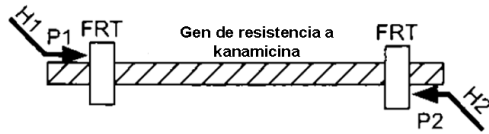
Transducción con el fago P1

Lisado: el cultivo de la cepa donadora se creció al menos 12 horas (*overnight*) a 37° C en medio LB con agitación constante. A partir de este cultivo se subcultivaron 50 µl en 5 ml de medio LB fresco adicionado con 50 µl de glucosa al 20% y 25 µl de CaCl₂ 1 M. Este cultivo se incubó por 30 minutos a 37° C y al término de este tiempo se añadió 1 µl del fago P1. Se esperó el tiempo necesario para que el cultivo se hubiera aclarado (lisado) completamente por el fago (generalmente 2 ½ a 3 horas), contrastando en todo momento con un cultivo sin el fago (a manera de control negativo). En este momento el cultivo se puso en hielo y se añadió 100 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 10 segundos y se precipitó a 14,000 RPM por 10 minutos en frío. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf® estéril y se almacenó a 4° C.

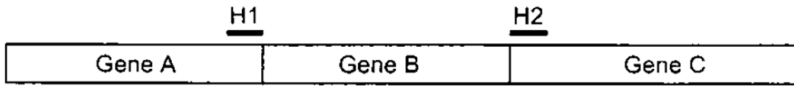
Transducción: se adicionaron 300 µl de un cultivo *overnight* en tubos Eppendorf estériles. Se centrifugó la muestra a 12,000 RPM por 1 minuto. La pastilla resultante de células se resuspendió en 300 µl de Solución de Transducción (10 mM de MgSO₄ y 5 mM de CaCl₂). Se adicionaron diferentes cantidades del fago P1 (1, 10, 50 y 100 µl) y se incubó sin agitación a 37° C por 30 minutos. Al término de este tiempo se añadió 100 de citrato de sodio 1 M, se reposó 5 minutos y se centrifugó a 12,000 RPM por 1 minuto. Después de descartar el sobrenadante se resuspendió la pastilla en 1 ml de Solución de Recuperación (por litro: 900 ml de medio LB y 100 ml de citrato de sodio 1 M). Se incubó por una hora a 37° C sin agitación. Se centrifugó a 12,000 RPM durante 1 minuto. Finalmente se descartó el sobrenadante (~850 µl), se resuspendió cuidadosamente y se plaqueó en medio LB sólido adicionado con el antibiótico de selección.

Construcción de la cepa MC4100 carente de los genes hok cromosomales (Δ5)

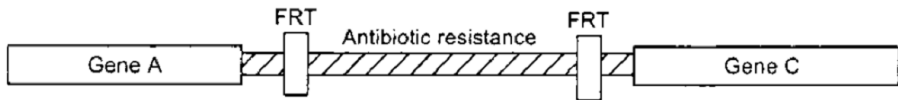
La cepa MC4100 wt fue transducida con el fago P1 teniendo como cepa donadora a la cepa BW25113 *hokA::Km^r* perteneciente a la colección de mutantes “*knockout*” *Keio* (Baba *et al.*, 2006). El fenotipo de resistencia a kanamicina de las colonias seleccionadas fue eliminado mediante su transformación con el plásmido pCP20, el cual es un plásmido Amp^r y Cm^r, que tiene una replicación sensible a temperatura y una inducción térmica de la síntesis de FLP, capaz de llevar a cabo el proceso de remoción de marcadores de resistencia flanqueados por sitios FRT (Datsenko y Wanner, 2000) (Figura 18). Las colonias obtenidas (resistentes a ampicilina) se crecieron *overnight* a 42° C en medio LB sólido sin antibiótico. Posteriormente, las colonias seleccionadas se crecieron en LB sólido en tres condiciones distintas: sin antibiótico, con Amp (100 µg/ml) y con Km (50 µg/ml). Las colonias que crecieron en alguno de los antibióticos se descartaron. Esta estrategia de introducción de un gen de resistencia a kanamicina para eliminar un gen *hok* homólogo y de eliminación del fenotipo resistente a antibióticos fue repetida consecutivamente con los demás genes *hok* homólogos de la colección *Keio* (*hokB::Km^r*, *hokC::Km^r*, *hokD::Km^r* y *hokE::Km^r*) (Baba *et al.*, 2006), hasta obtener una cepa sin los cinco genes homólogos *hok*.



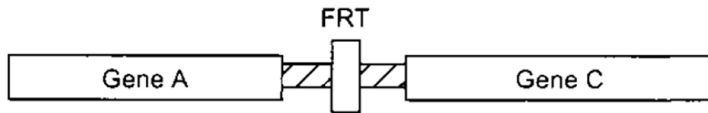
1. Amplificación por PCR del gen de resistencia, flanqueado por FRT.



2. Transformación de la cepa que expresa la recombinasa Red λ .



3. Selección de transformantes resistentes a kanamicina.



4. Eliminación del cassette de resistencia usando un plásmido de expresión de FLP.

Figura 18. Ejemplo de la estrategia para la eliminación de los genes *hok* empleando los genes interrumpidos por un cassette de resistencia a kanamicina de la colección *Keio*. H1 y H2 se refieren a las regiones de homología. P1 y P2 a las regiones que delimitan el cassette de resistencia (Modificado de Datsenko y Wanner, 2000).

Observación de las células bacterianas al microscopio óptico

A partir de los cultivos bacterianos de las cepas MC4100 con los genes reporteros *gef-lacZ* o *sof-lacZ* creciendo en medio LB, se tomaron muestras de ~5 μ l. Para observar las células se utilizó un microscopio óptico *Leica DMLS* a 100 X de aumento, utilizando la técnica de iluminación de Contraste de Fases. Para capturar las imágenes se utilizó una cámara digital *Canon Power Shot*

S515. Las imágenes capturadas se procesaron con el programa computacional GIMP (ver 2.6.6) de GNU®.

RESULTADOS

Construcción de los plásmidos de integración pMX901 (pAH125+gef-lacZ) y pMX902 (pAH125+sof-lacZ)

Se llevó a cabo la construcción de dos plásmidos de integración, los cuales, son indispensables para poder integrar al cromosoma de *E. coli* MC4100 las fusiones *gef-lacZ* y *sof-lacZ*, según el método de los plásmidos CRIM anteriormente descrito. Originalmente se contempló la idea de construir estos plásmidos modificando el plásmido CRIM pAH125 (figura 12) con alguna de las dos estrategias siguientes:

- 1. pAH125 → doble digestión *KpnI* y *PstI* → modificación con el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I → digestión con *BamHI***
- 2. pAH125 → digestión con *PstI* → modificación con el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I → digestión con *BamHI***

La finalidad de ambas estrategias fue modificar el plásmido pAH125 de forma que quedara linearizado con un extremo romo y otro cohesivo *BamHI*, y en esa orientación poder clonar los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a las regiones promotoras de los genes *gef* y *sof*. Sin embargo, después de múltiples intentos sin éxito, estas estrategias se descartaron y se buscaron alternativas. Para el caso de *gef* se sacó provecho de que dicho fragmento se había clonado previamente en el plásmido pGEM®-T Easy de Promega, dando origen al plásmido pGEM-T Easy-*gef*. A partir de este plásmido se pudo extraer un fragmento que incluía al fragmento de *gef*, mediante una doble digestión *PvuII* y *BamHI*, confirmándose la orientación del mismo respecto a su sitio futuro

de clonación (plásmido CRIM pAH125) mediante otra doble digestión *Hin*clI y *Bam*HI (figuras 14 y 20). Este fragmento de *gef*, con un extremo romo y otro cohesivo *Bam*HI, se clonó en el plásmido pAH125 previamente modificado con las enzimas *Pst*I, Klenow y *Bam*HI, dando origen al plásmido pMX901 (figura 14). Esta construcción se verificó mediante restricciones *Eco*RI/*Bam*HI y sólo *Eco*RI (Figura 21).

Para el caso de *sof*, un problema que imposibilitó el uso del plásmido pAH125 ya modificado con un extremo romo y otro *Bam*HI fue que este fragmento (correspondiente al promotor de *sof*) tiene un sitio de restricción *Bam*HI aproximadamente a la mitad de su secuencia. En este caso, la estrategia alternativa fue digerir ambas partes (fragmento y plásmido) con las enzimas de restricción *Pst*I y *Sma*I. Esta construcción (pMX902) se confirmó mediante restricciones *Eco*RV/*Pst*I y sólo *Pst*I, que permiten ver el plásmido en dos fragmentos o en su forma linearizada (respectivamente), todo con tamaños que corresponden a lo esperado (figura 20).

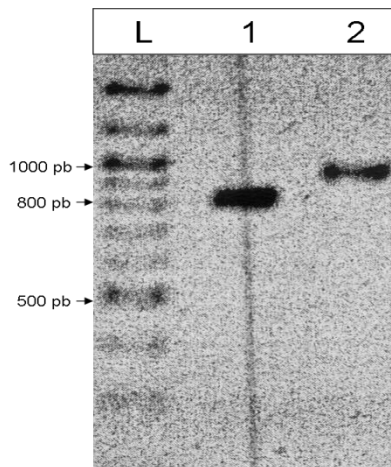


Figura 19. Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los genes: 1) *gef* y 2) *sof*, con los oligonucleótidos *Gef Fw/Gef Rv* y *Sof Fw/Sof Rv* (respectivamente). L: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Gel de agarosa al 1 %.

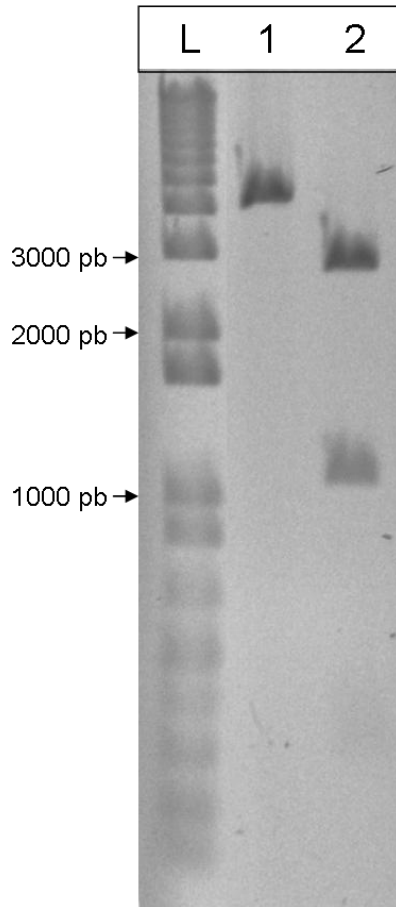


Figura 20. Digestión del plásmido pGEM-T Easy *gef*. L: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). 1: pGEM-T Easy *gef* + *HincII*+*BamHI*. 2: pGEM-T Easy *gef* + *PvuII* + *BamHI*. Gel de agarosa al 1 %.

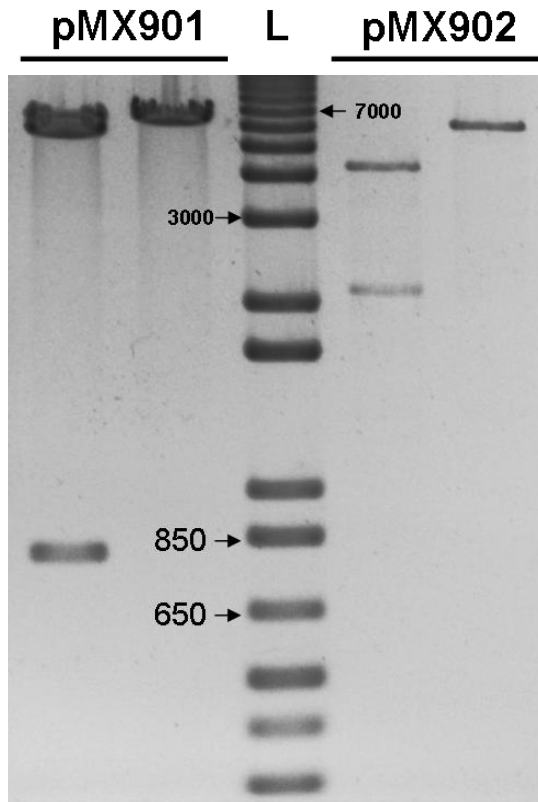


Figura 21. Verificación de la correcta construcción de los plásmidos pMX901 y pMX902. L: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). 1: pMX901 (cepa de alto número de copias) + *EcoRI* + *BamHI*. 2: pMX901 + *EcoRI*. 3: pMX902 (cepa de bajo número de copias) + *EcoRV* + *PstI*. 4: pMX902 + *PstI*. Gel de agarosa al 1%.

***Integración de las fusiones gef-lacZ y sof-lacZ
al cromosoma de la cepa MC4100***

Una vez concluida la construcción de los dos plásmidos de integración pMX901 y pMX902, se continuó con el proceso de integración de estos plásmidos al cromosoma de la cepa receptora MC4100/pINT-ts. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Haldimann y Wanner (2001), en el cual la integración se lleva a cabo creciendo a la cepa hospedera en 5 ml de medio

SOB con ampicilina (100 µg/ml) a 30° C hasta una DO_{600} de ~0.6, momento en el cual las células se hacen electrocompetentes; **posteriormente a la electroporación, las células se recuperan a 37° C por una hora y luego a 42° C por media hora**. Después de múltiples intentos siguiendo este protocolo, obteniendo 3 a 4 colonias candidatas totales (en el mejor de los casos), de las cuales todas contaban con integración múltiple o no habían integrado el plásmido (figuras 22 y 23). Posteriormente se usó un protocolo alternativo para la integración al cromosoma de los plásmidos CRIM, descrito, entre otros autores, por Zhou, Datsenko y Wanner (2003), el cual difiere sustancialmente del protocolo anterior. En este caso hay un paso de **heat shock a 42° C en forma previa a la electroporación** (posiblemente para activar la Integrasa de fago, la cual es termoactivable), y la recuperación de las células (después de electroporadas) **se hace a 42° C media hora y luego a 37° C una hora**. La diferencia entre ambos protocolos resultó muy evidente, tras observar que con el primer intento de integración siguiendo este segundo protocolo, el número de colonias candidatas obtenidas pasó de unas cuantas a cientos por caja de Petri (figura 17).

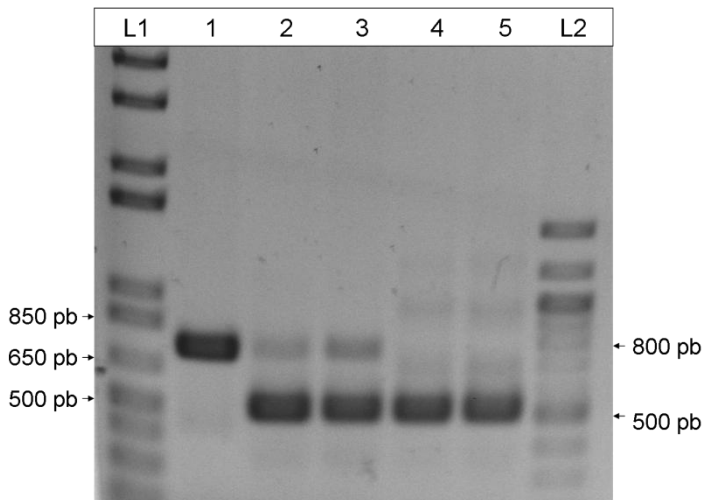


Figura 22. PCR de cuatro colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) utilizando el protocolo de Haldimann y Wanner (2001), con el plásmido helper pINT-ts con sitios *attB* para λ . Los tamaños esperados para la integración sencilla son 577 y 666 pb, para la integración múltiple 502, 577 y 666 y en el caso de que no exista integración 741 pb. L: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). L2: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). 1: control negativo (DNA de la cepa MC4100). 2-4: colonias candidatas de integración sencilla. Gel de agarosa al 1 %.

Con algunas de las colonias candidatas de integración, obtenidas con el segundo protocolo, se llevaron a cabo las pruebas de PCR para determinar cuáles de ellas habían integrado en el cromosoma una sola copia de alguno de los plásmidos de integración (pMX901 o pMX902). En este caso, la integración sencilla y no la múltiple fue el evento que predominó (figuras 24 y 25). En la figura 24, correspondiente a las colonias candidatas de integración del plásmido pMX901, se observa que las colonias 3-5, 7, 9 y 11 amplificaron dos productos que corresponden con los tamaños esperados del evento de integración sencilla (577 y 666 pb), mientras que la colonia 6 presenta los tres productos correspondientes a la integración múltiple.

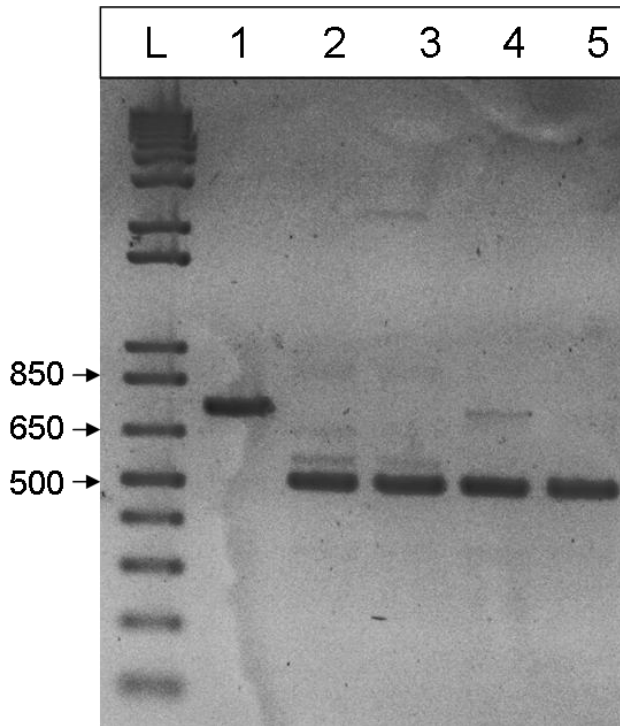


Figura 23. PCR de cuatro colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) utilizando el protocolo de Haldimann y Wanner (2001), con el plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ . Los tamaños esperados para la integración sencilla son 577 y 666 pb, para la integración múltiple 502, 577 y 666 y en el caso de que no exista integración 741 pares de bases. 1: control negativo (DNA de la cepa MC4100). 2-4: colonias candidatas de integración sencilla. Gel de agarosa al 1.5 %.

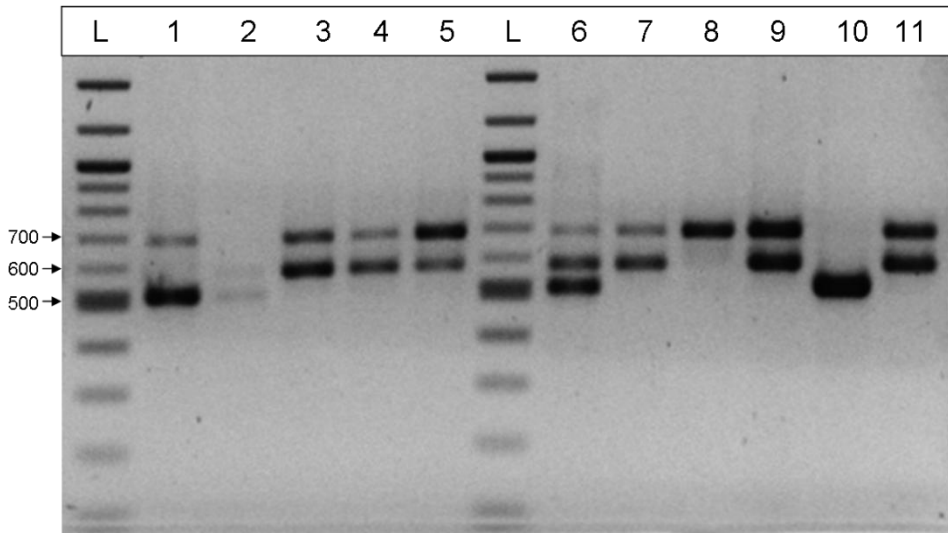


Figura 24. PCR de 11 colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) empleando al plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ . Los tamaños esperados para la integración sencilla son 577 y 666 pb, para la integración múltiple 502, 577 y 666 y en el caso de que no exista integración 741 pb. L: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Gel de agarosa al 1.5 %.

Para el caso del otro plásmido (pMX902) se presentó una situación similar, ya que de las cinco colonias escogidas, todas ellas tuvieron la integración sencilla (Figura 24).

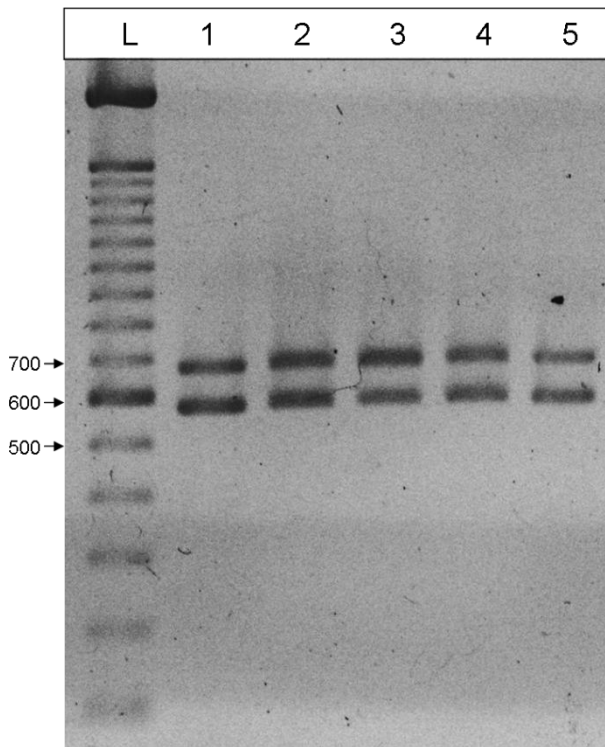


Figura 25. PCR de 5 colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX902 (pAH125+*sof-lacZ*) empleando al plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attB* para λ . Los tamaños esperados para la integración sencilla son 577 y 666 pb, para la integración múltiple 502, 577 y 666 y en el caso de que no exista integración 741 pares de bases. L: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Gel de agarosa al 1.5 %.

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de integración también se llevó a cabo en la cepa hospedera MC4100 portadora del plásmido *helper* alternativo pAH69, no obstante, las pruebas de PCR con el DNA extraído de estas colonias produjo un patrón de bandas inesperado (figura 26), motivo por el cual se descartaron estas colonias.

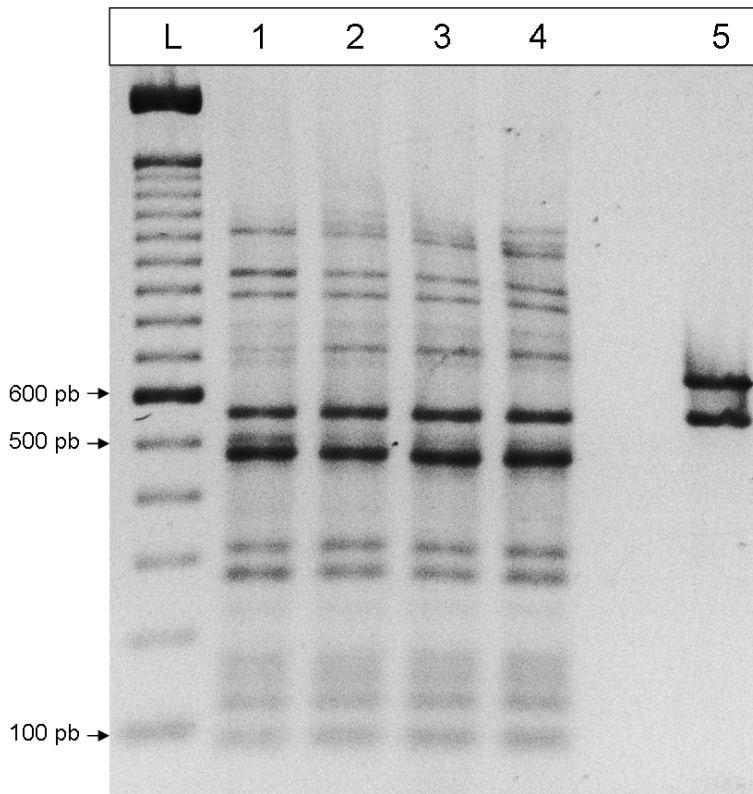


Figura 26. PCR de algunas colonias candidatas de integración del plásmido pMX901. 1-4: PCR de las colonias candidatas de integración sencilla del plásmido de integración pMX901 (pAH125+*gef-lacZ*) empleando al plásmido *helper* pAH69 con sitios *attP* para HK022. Los tamaños esperados para la integración sencilla son 289 y 824 pb, para la integración múltiple 289, 373 y 824 pb, y en el caso de que no exista integración 740 pb. 5: PCR de una colonia candidata de integración sencilla del plásmido pMX901 empleando el plásmido *helper* pINT-ts con sitios *attP* para λ . L: Marcador de peso molecular 100 pb.

Determinación de la actividad transcripcional de los genes *gef* y *sof* durante 3 distintas condiciones de estrés

Estrés nutrimental

Durante mucho tiempo, la presencia de los sistemas TA en el cromosoma bacteriano se atribuyó a que dichos sistemas genéticos desempeñaban alguna función durante algún tipo específico de estrés o como parte de una respuesta general al estrés, aunque esa función era desconocida. Una posibilidad al respecto es que estos sistemas permitan una conducta “altruista” frente al estrés nutricional, esto es, que durante la fase estacionaria el incremento en la expresión de *gef* o la disminución de la expresión de *sof* lleven a la lisis de una parte de la población celular, y que los nutrientes liberados por estas células permitan que otros individuos de la población alarguen su vida, como lo sugerían los resultados preliminares de nuestro grupo, ya comentados. Para determinar si esta hipótesis era válida, por lo menos para el gen cromosomal *hokC* (*gef*) y su correspondiente antitoxina (*sof*), se llevó a cabo el monitoreo de la actividad transcripcional de ambos genes, desde la fase exponencial de crecimiento (DIL 1) hasta la fase estacionaria avanzada (72 horas), así como en cultivos nuevos iniciados en paralelo, con inóculos provenientes de los primeros cultivos, justo a las 24 horas de crecimiento (DIL 2) (figuras 27 y 28).

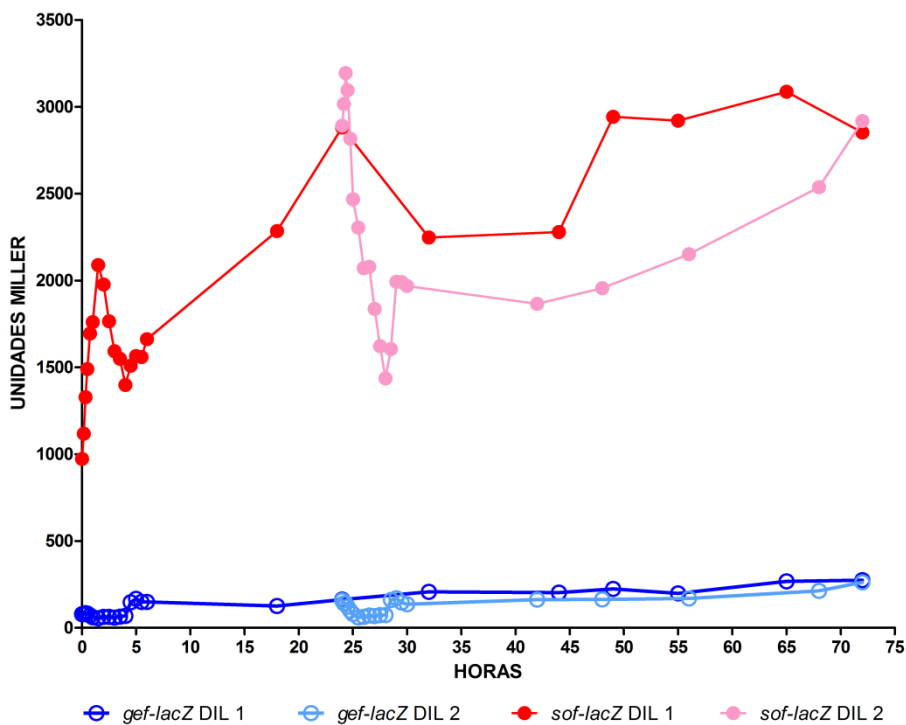


Figura 27. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* durante las primeras 72 horas de crecimiento. El cultivo se llevó a cabo en medio LB con kanamicina (10 µg/ml) comenzando a una DO_{600} de ~ 0.1 a partir de un cultivo *overnight* de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* (dilución 1). A las 24 horas de iniciados estos cultivos se tomaron muestras de cada uno para comenzar nuevos cultivos a una DO_{600} de ~ 0.1 (dilución 2). Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

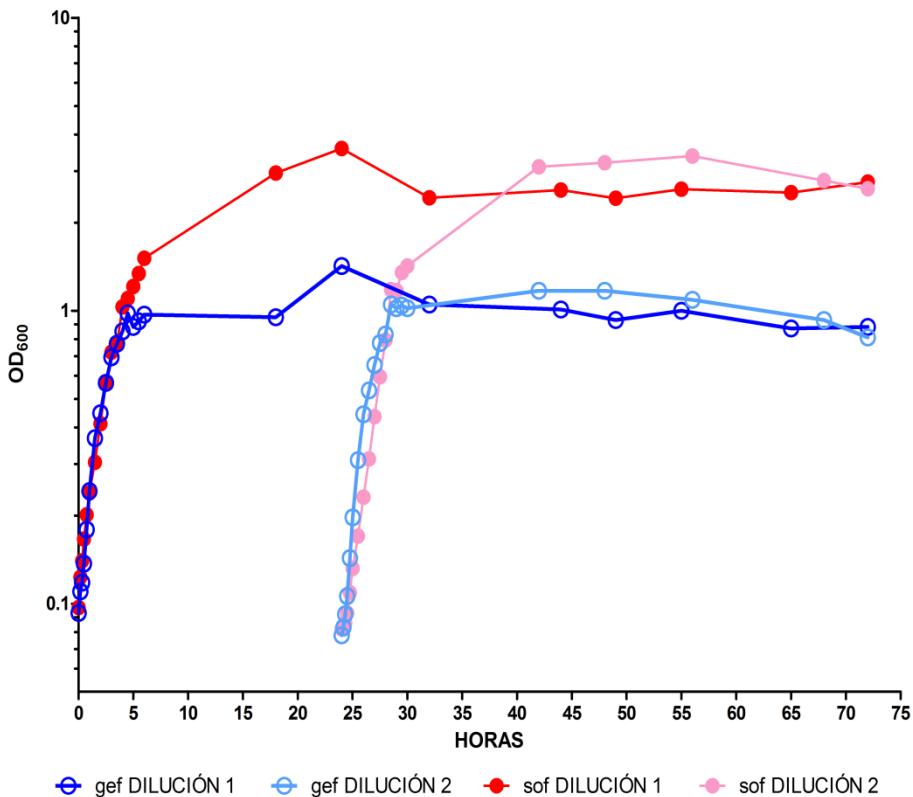


Figura 28. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante las primeras 72 horas de crecimiento. El cultivo se llevó a cabo en medio LB con kanamicina (10 $\mu\text{g/ml}$) comenzando a una DO_{600} de ~ 0.1 a partir de un cultivo *overnight* (dilución 1). A las 24 horas de iniciados estos cultivos se tomaron muestras de cada uno para comenzar nuevos cultivos a una DO_{600} de ~ 0.1 (dilución 2). Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 27, los niveles de expresión de *sof* son muy altos con respecto a los de *gef*, lo cual, en general, corresponde con los reportes anteriores para la fuerza de los promotores de ambos genes (Poulsen *et al.*, 1991). Sin embargo, resulta evidente que el perfil de expresión obtenido difiere de los resultados previamente obtenidos por la ex estudiante de este laboratorio Aurora Labastida (Figuras 9 y 10). También es evidente que los resultados de la expresión de *sof* y *gef* en la fase estacionaria prolongada (72 horas) no

coinciden con lo esperado, es decir, el incremento en la expresión de *gef* y/o la disminución en la expresión de *sof*, de acuerdo a la hipótesis planteada. Cabe aclarar que si bien en la figura 27 el último punto mostrado de la expresión de *sof* parece ser el comienzo de una tendencia decreciente, este resultado no fue reproducible en los otros dos experimentos llevados a cabo, pudiéndose deber entonces a un “error de pipeteo”. Por otra parte, en la figura 28 se muestran las cinéticas de crecimiento (DO_{600}) obtenidas para el mismo experimento de expresión de β -galactosidasa de la figura 27, la cual permite identificar la cantidad de expresión de la enzima a lo largo de la curva de crecimiento.

Estrés calórico

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de los sistemas TA en los cromosomas bacterianos se ha adjudicado (entre otras tantas hipótesis) a que desempeñan una función importante durante un tipo específico de estrés. A este respecto cabe comentar que el sistema TA cromosomal *mazEF* de *Escherichia coli*, uno de los mejor caracterizados hasta el momento, “parece” estar involucrado en la muerte celular en respuesta a altas temperaturas (50° C), (Hazan, Sat y Engelberg-Kulka *et al.*, 2004; Tsilibaris *et al.*, 2007). En este sistema TA, el gen *mazF* codifica para la toxina MazF (la cual es muy estable), mientras que *mazE* codifica para la antitoxina MazE (la cual es muy inestable). En este caso se ha reportado que la transcripción de *mazE* se detiene a altas temperaturas, dejando a la célula víctima del efecto de la toxina (Hazan, Sat y Engelberg-Kulka *et al.*, 2004).

Para determinar si el incremento de temperatura (de 37 a 42°C) incrementa la expresión de *gef* o disminuye la expresión de *sof*, se llevó a cabo la determinación de la expresión de β -galactosidasa en las cepas con los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ*. La determinación de esta actividad se llevó a cabo en ambas cepas durante su crecimiento en medio LB a la temperatura fisiológica de 37° C, y durante su cambio de temperatura a 42° C (figura 29).

Como puede observarse en esta figura, las dos cepas reporteras muestran una actividad de β -galactosidasa muy similar para ambos genes antes del incremento de temperatura, no obstante, después del cambio de temperatura, la expresión de *sof* presentó una disminución en los primeros 30-45 minutos para luego estabilizarse durante el resto del tiempo monitoreado (2 horas y media), cambio que fue reproducible en las distintas réplicas del experimento. Aunque no se muestran los resultados en esta figura, también se llevó a cabo la determinación de la actividad de β -galactosidasa para las cuatro cepas, a 30° C, obteniendo un comportamiento similar al observado a 37° C. En cuanto a la expresión de *gef*, no se observaron diferencias en la expresión de β -galactosidasa entre el crecimiento a 37 y 42° C.

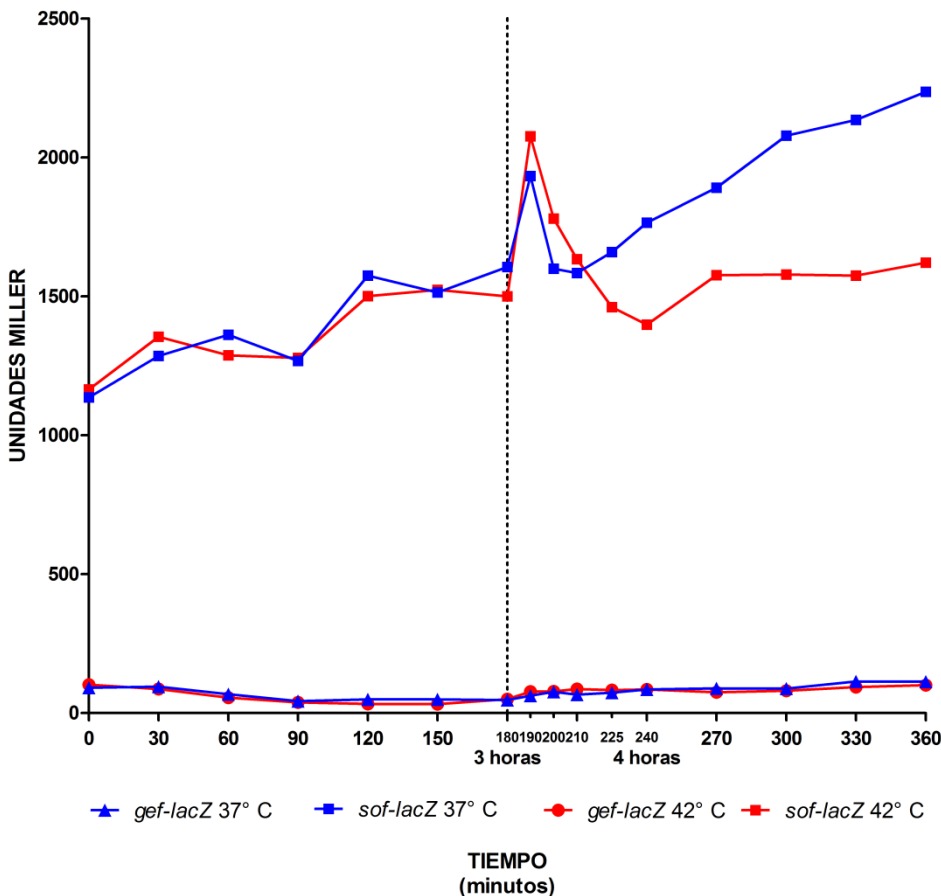


Figura 29. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés calórico a 42° C. El cultivo se llevó a cabo en medio LB con kanamicina (10 µg/ml) comenzando a una DO₆₀₀ de ~ 0.1 a partir de un cultivo *overnight* de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ*. A las 3 horas de crecimiento los cultivos se cambiaron de 37 a 42° C, y a partir de este momento se tomaron muestras cada 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos (3 horas) para determinar la actividad de β-galactosidasa. Gráfica representativa de, al menos, tres experimentos independientes. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se dio el cambio de temperatura.

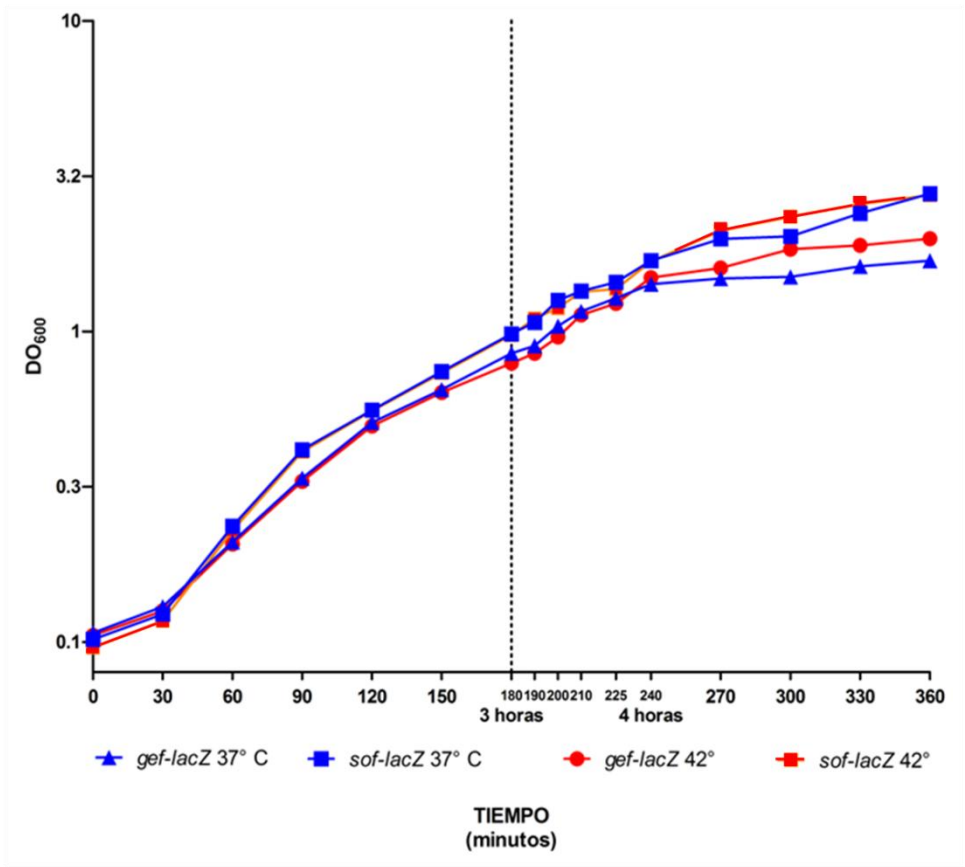


Figura 30. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante tres horas de crecimiento a 37° C y tres horas a 42° C. El cultivo se llevó a cabo en medio LB con kanamicina (10 μ g/ml) comenzando a una DO_{600} de ~ 0.1 a partir de un cultivo *overnight*. A las 3 horas de crecimiento los cultivos se cambiaron de 37 a 42° C, y a partir de este momento se tomaron muestras cada 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos (3 horas) para determinar la actividad de β -galactosidasa. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se dio el cambio de temperatura.

Dado que las condiciones anteriores de estrés sólo modificaron ligeramente la expresión del gen reportero *sof-lacZ*, sin alterar la expresión de *gef-lacZ*, se decidió incrementar la intensidad del estímulo calórico estresante. Para este caso, el cambio de temperatura no fue de 37 a 42°C, sino de 37 a 52°C; además, en este caso, el cambio entre una temperatura y otra se hizo

cambiando el matraz con el cultivo bacteriano de una fase aérea (ambiente) a una fase acuosa ajustada previamente a la temperatura estresante de 52°C, esto con la finalidad de que la tasa de cambio entre ambas temperaturas fuera mucho más rápida en el medio de cultivo (logrando así una condición de estrés mucho más severa). Cabe aclarar que en aquellos experimentos con 42°C como temperatura estresante, si bien el cambio fue de una fase aérea a otra del mismo tipo, el cambio también se hizo a un ambiente previamente ajustado a dicha temperatura.

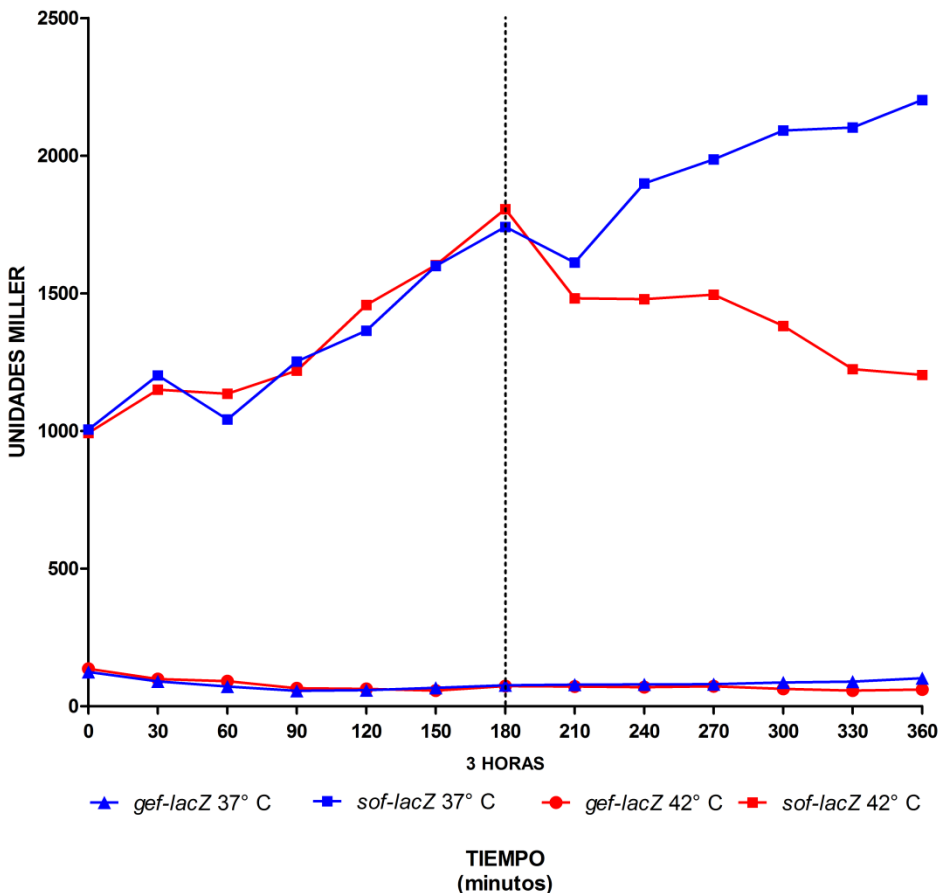


Figura 31. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés calórico a 52° C. El cultivo se llevó a cabo en medio LB con kanamicina (10 µg/ml) comenzando a una DO₆₀₀ de ~ 0.1 a partir de un cultivo overnight de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ*. A las 3 horas de

crecimiento los cultivos se cambiaron de 37 a 52° C, y a partir de este momento se tomaron muestras cada 30 minutos por un espacio total de 3 horas para determinar la actividad de β -galactosidasa. Gráfica representativa de, al menos, tres experimentos independientes. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se dio el cambio de temperatura.

En la figura 31 se observa el perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* de las cepas MC4100, durante su crecimiento a 37° C y durante las 3 horas posteriores al cambio del cultivo a la condición estresante de 52° C. En esta figura se observa, como en la figura 29 correspondiente al estrés a 42° C, una considerable disminución de la actividad de β -galactosidasa del gen reportero *sof-lacZ* cuando el crecimiento se da en estrés, con respecto a la misma cepa creciendo a 37° C. De hecho, esta disminución es ligeramente mayor que aquella observada a 42° C (figura 29). A diferencia del crecimiento a 42°C, durante el crecimiento a 52° C también se observa una ligera, aunque reproducible, disminución de la actividad β -galactosidasa del gen reportero *gef-lacZ*. Por otra parte, la temperatura de 52° C tuvo un efecto adverso en la viabilidad así como en densidad óptica del cultivo (figura 32), lo cual sugirió la posibilidad de que en él estuvieran apareciendo células con el fenotipo *ghost cell* producto de la acción letal de Gef, debido a la disminución de la expresión de *sof*. Por este motivo se intentó buscar dicho fenotipo en el cultivo en estrés, empleando la microscopia de contraste de fases con el mayor aumento (1000X), el cual permite observar dicho fenotipo sin la necesidad de recurrir a la microscopia electrónica (Gerdes, Rasmusen y Molin, 1986a; Gerdes *et al.* 1986b). La búsqueda del fenotipo *ghost cell*, sin embargo, resultó negativa en todos los casos (figura 33).

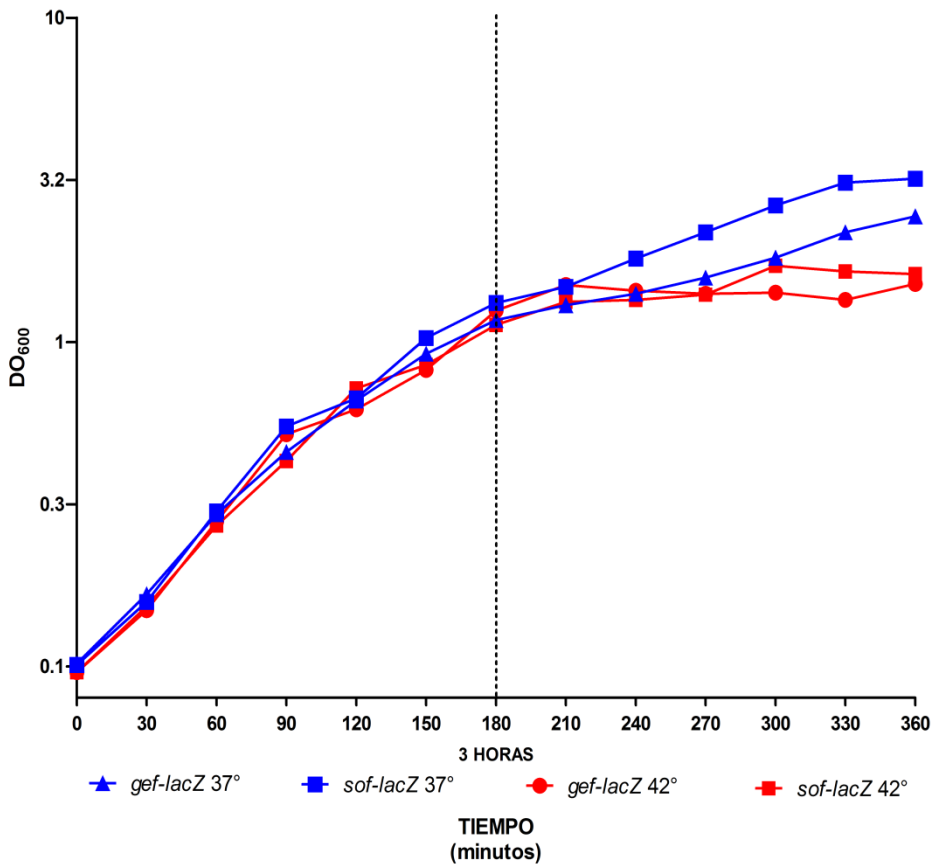


Figura 32. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* durante tres horas de crecimiento a 37°C y tres horas a 52°C . Los cultivos se llevaron a cabo en medio LB con kanamicina ($10\ \mu\text{g/ml}$) comenzando a una DO_{600} de ~ 0.1 a partir de un cultivo *overnight*. A las 3 horas de crecimiento los cultivos se cambiaron de 37 a 52°C , y a partir de este momento se tomaron muestras cada 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos (3 horas) para determinar la actividad de β -galactosidasa. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se dio el cambio de temperatura.

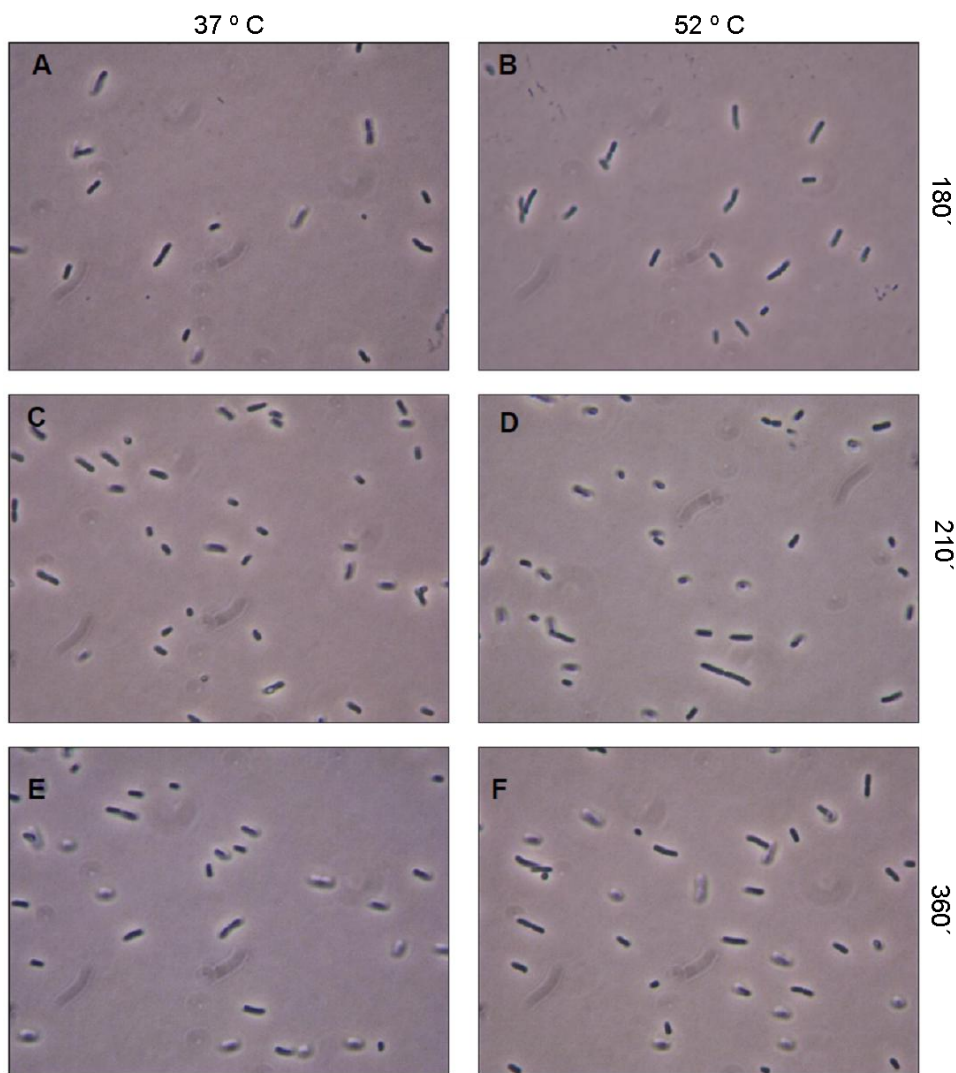


Figura 33. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases de los cultivos de la cepa MC4100, portadora del gen reportero *gef-lacZ* o *sof-lacZ*, durante su crecimiento en medio LB a 37 y/o a 52 °C. Las imágenes A, C y E corresponden al mismo cultivo (control) creciendo siempre a 37° C. Imágenes A, C y E tomadas a los 180, 210 y 360 minutos de iniciado el cultivo, respectivamente. Las imágenes B, D y F corresponden al mismo cultivo después de 180 minutos de crecimiento a 37°C (B) y luego a 52°C (D y F). Imágenes D y F tomadas a los 210 y 360 minutos de iniciado el cultivo, respectivamente.

Estrés por fago

La gran cantidad y diversidad de sistemas TA en el cromosoma de muchos procariontes (Pandey y Gerdes, 2005) ha sugerido que la muerte celular puede ser benéfica en su fisiología y evolución poblacional. De este modo, aunque el suicidio celular es contraproducente para una bacteria individual, pudiera ser que la muerte de algunos individuos beneficie al resto de la población. Esta conducta de tipo “altruista” ha sido observada para el proceso de muerte celular mediado por el sistema TA *mazEF* (ya mencionado) el cual actúa como un mecanismo de defensa contra la infección por fagos tales como P1 (Hazan y Engelberg-Kulka, 2004). Este sistema de defensa resulta evidente al observar que el número de lisógenos lisados por la inducción térmica del fago P1, entre una cepa wt y una cepa $\Delta mazEF$, es menor en la primera (Hazan y Engelberg-Kulka, 2004). Por otra parte, el sistema *hok/sok* del plásmido R1 también protege contra la infección por el fago T4, si es que este sistema genético se halla en un plásmido de alto número de copias (Pecota y Wood, 1996).

Para determinar si la expresión de los genes *gef* o *sof* cambia con la presencia de un fago, se buscó monitorear la actividad de estos genes en presencia del fago P1. Para ello se llevó a cabo un protocolo idéntico al empleado en la propagación de este fago (como se describe en la sección de Materiales y Métodos), aunque tomando muestras para determinación de actividad de β -galactosidasa a distintos tiempos. La finalidad de usar este protocolo en estos ensayos fue que el “aclaramiento” del cultivo, debido a la lisis bacteriana, permitió tener la certeza de que en dicho cultivo, tanto los virus como las células, estaban interactuando no sólo físicamente sino también a nivel genético.

En esta serie de experimentos, teniendo como condición estresante la presencia del fago P1, tampoco fue posible observar cambios en la expresión de estos dos genes reporteros (*gef-lacZ* y *sof-lacZ*) (figura 34) con respecto al cultivo control, no obstante que la lisis completa del cultivo se lograba (en

promedio) a las 3 horas, indicio de que el fago estaba en buenas condiciones para llevar a cabo el proceso de lisis celular.

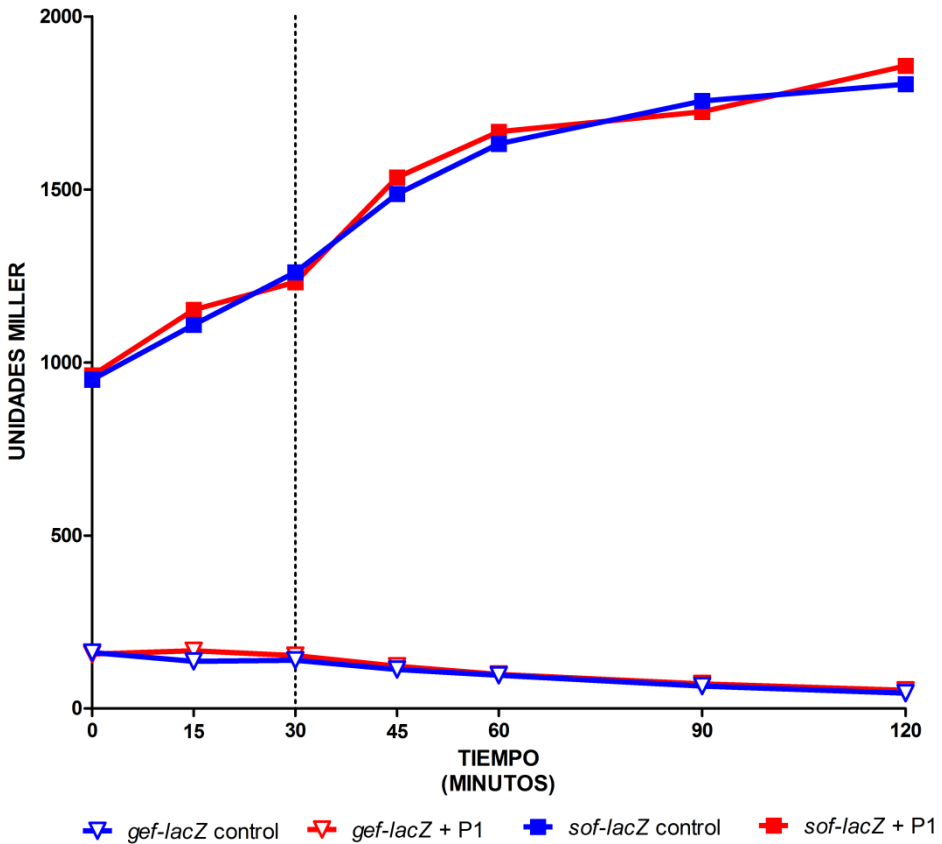


Figura 34. Perfil de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* en respuesta al estrés frente al fago P1. El cultivo se llevó a cabo en medio LB (modificado de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos) con kanamicina (10 µg/ml) a partir de un cultivo *overnight* de las mismas cepas. A la media hora de crecimiento se añadió el fago P1. En los intervalos señalados se tomaron alícuotas para determinar la actividad de β-galactosidasa. Gráfica representativa de, al menos, tres experimentos independientes. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se añadió el virus.

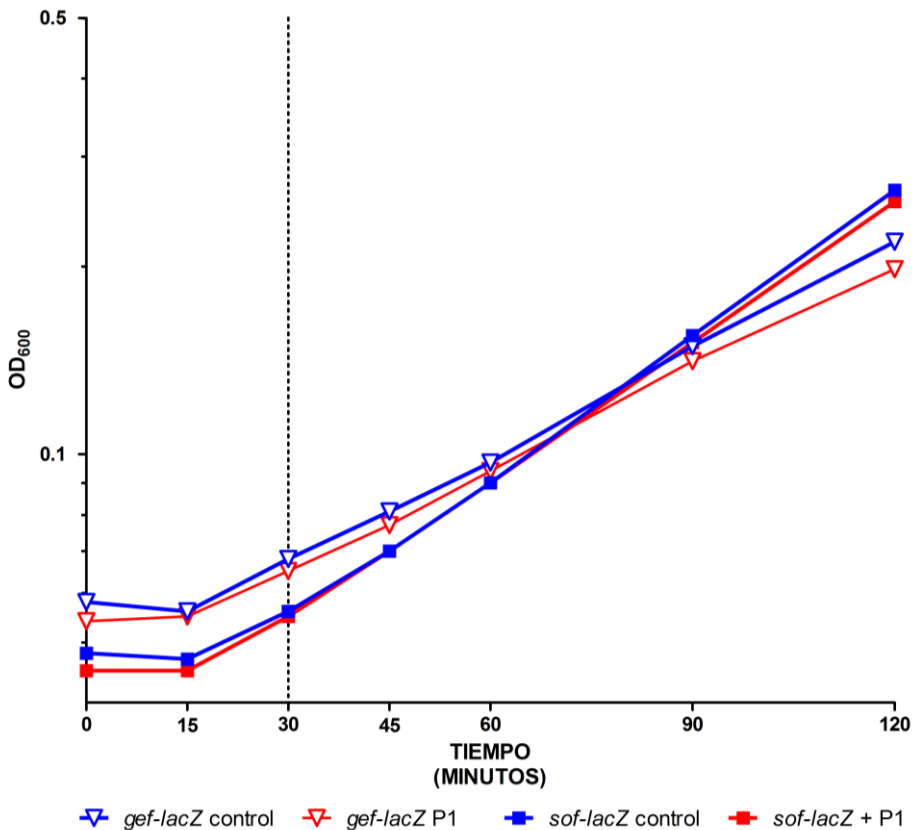


Figura 35. Densidad óptica (DO_{600}) de las cepas MC4100 *gef-lacZ* y MC4100 *sof-lacZ* en respuesta al estrés frente al fago P1. El cultivo se llevó a cabo en medio LB (modificado de acuerdo a como se describe en Materiales y Métodos) con kanamicina ($10 \mu\text{g/ml}$) a partir de un cultivo *overnight* de las mismas cepas. A la media hora de crecimiento se añadió el fago P1. En los intervalos señalados se tomaron alícuotas para determinar la actividad de β -galactosidasa. Gráfica representativa de, al menos, tres experimentos independientes. La línea vertical punteada indica el momento a partir del cual se dio el virus.

Comparación de la sobrevivencia en fase estacionaria entre una cepa wt y una cepa sin los genes hok cromosomales

En contraste a la función de los sistemas TA de plásmido, la función de los sistemas TA de cromosoma es aún un área de debate, mismo que se

incrementó después de que Tsilibaris *et al.* (2007) no encontrara diferencias en la viabilidad entre una cepa MG1655 wt y una cepa derivada, en la cual se delataron 5 (de al menos 13) sistemas TA distintos con que cuenta esta bacteria (Pandey y Gerdes, 2005; Hayes, 2003), dejando intactos todos los genes *hok*. Por otra parte, Poulsen *et al.* (1991) tampoco encontró diferencias en viabilidad frente al ayuno en glucosa, entre una cepa wt y otra derivada a la cual se le habían deletado los genes *gef* y *relF* (*hokC* y *hokD* respectivamente). Si bien en este último trabajo se deletaron algunos de los genes *hok* del cromosoma, sólo fueron dos de los cinco genes homólogos conocidos. Es por ello que uno de los objetivos de este trabajo fue construir una cepa sin los cinco genes *hok* cromosomales homólogos ($\Delta 5$) y comparar su viabilidad con respecto a una cepa wt (parental de ésta) durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria temprana. En este experimento se esperaba observar un evento súbito y masivo de muerte celular en la cepa que carece de los genes *hok* cromosomales, justo a la entrada de la fase estacionaria, que es cuando los nutrientes propios del cultivo se han agotado.

En la figura 36 se observa la comparación en términos de viabilidad (UFC) y crecimiento (DO_{600}) entre las cepas MC4100 wt y su derivada $\Delta 5$, a la cual se le deletaron los cinco genes *hok* cromosomales. Como puede observarse, no existieron diferencias entre ambas cepas en términos de UFC u OD_{600} , ni en la fase exponencial de crecimiento ni a la entrada de la fase estacionaria, lo cual permite descartar nuestra hipótesis al respecto, la cual suponía que la función de estos genes era prolongar la vida de una parte de la población bacteriana mediante la lisis de los individuos de otra parte de esa misma población.

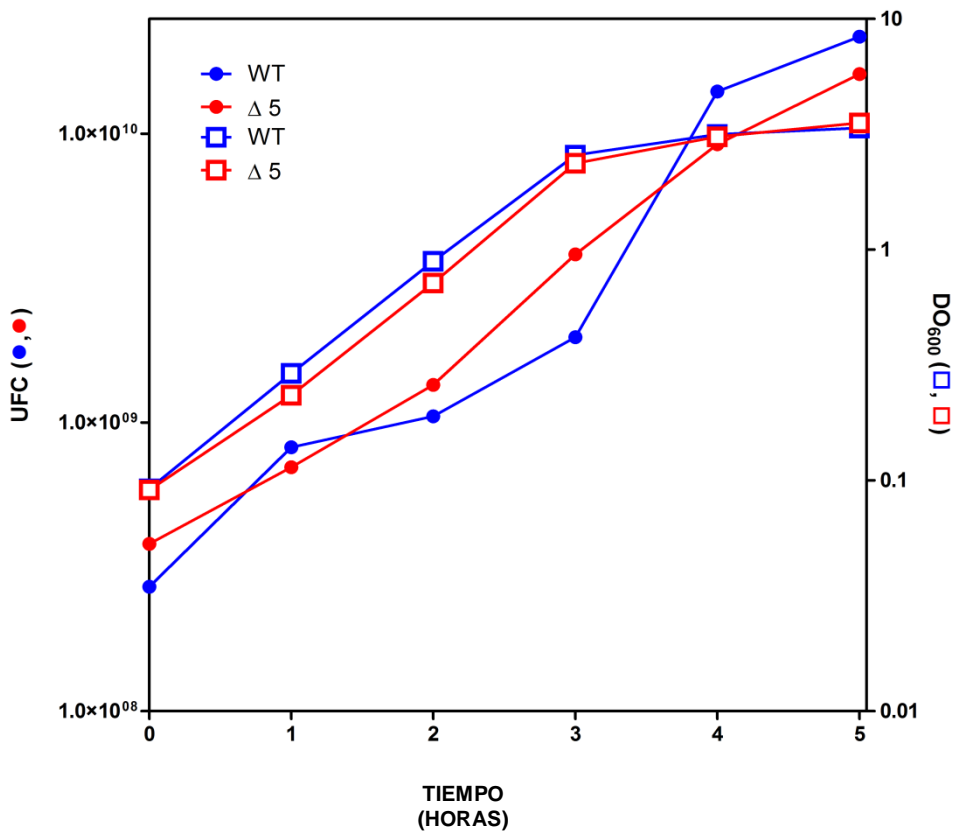


Figura 36. Crecimiento (DO_{600}) y viabilidad (UFC's) de la cepa MC4100 wt y su derivada ($\Delta 5$) que carece de todos los genes *hok* cromosomales, durante cinco horas de crecimiento en medio LB, sin y con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. Resultados de un experimento, representativo de tres réplicas independientes.

Discusión

Las bacterias han desarrollado mecanismos para enfrentarse a las distintas condiciones estresantes que su ambiente natural ofrece (estrés ácido, estrés calórico, daño al DNA, etc.). Algunos de estos mecanismos consisten en la inducción genética de proteínas específicas que eliminan el factor estresante o que son capaces de reparar el daño celular ocasionado (Li *et al.*, 2010). Por otra

parte, existen mecanismos antiestrés inducibles frente a distintos tipos de estrés, también presentes en las bacterias. Ejemplo de estos últimos es el regulón σ^S de *Escherichia coli*, cuyos genes que controla brindan protección frente a una gama amplia de agentes nocivos (Hengge, 2009).

En muchos de los ambientes naturales donde se encuentran las bacterias, la limitación de los nutrientes pareciera ser la condición prevaleciente (Morita, 1988). Esto hace de los sistemas TA buenos candidatos como reguladores de la tasa de crecimiento poblacional, dado que, en algunos de ellos, la expresión de sus componentes tóxicos puede afectar la síntesis de macromoléculas (Gerdes, 2000; Christensen *et al.*, 2001). Este supuesto está apoyado por el hecho de existir un número considerablemente mayor de sistemas TA en bacterias de vida libre, en comparación de aquellas que han establecido alguna asociación con un hospedero (Pandey y Gerdes, 2005). No obstante, recientemente Tsilibaris *et al.* (2007) compararon el comportamiento (viabilidad) entre una cepa silvestre y una derivada de ésta, desprovista de 5 sistemas TA cromosomales (*mazEF*, *relBE*, *yefM-yoeB*, *chpB* y *dinJ-yafQ*) sin encontrar diferencias. Por otra parte, en el caso de los genes de la familia *hok*, se ha logrado establecer claramente una función estabilizadora de plásmidos para los genes codificados en elementos genéticos extracromosomales de este tipo, particularmente *hok* y *sok* (Gerdes *et al.* 1986a). No obstante, aún cuando existen grandes coincidencias estructurales y fenotípicas de estos genes con sus homólogos cromosomales, estos últimos no llevan a cabo la estabilización de plásmidos, aún cuando las proteínas a las que dan origen son altamente tóxicas para la célula (Pedersen y Gerdes, 1999). De igual forma, no obstante que existe la posibilidad de que los genes *hok* cromosomales sean DNA “basura” adquirida por “accidente”, la alta redundancia de éstos en el cromosoma bacteriano (5 homólogos en *E. coli* MG1655 K-12 y 13 homólogos en *E. coli* O157 (Kang, Musa y Zhu, 2008)) sugiere fuertemente un papel fisiológico de gran relevancia, aunque desconocido hasta el momento.

En este trabajo se ha evaluado, por una parte, si existe un incremento en la expresión genética de los genes cromosomales *hokC* (*gef*) y *sokC* (*sof*) durante la presencia de distintas condiciones de estrés, empleando para ello fusiones transcripcionales *gef-lacZ* y *sof-lacZ*, las cuales miden la actividad de la enzima β -galactosidasa (Miller, 1972). Por otra parte, también se ha evaluado y comparado el comportamiento (viabilidad como UFCs) de una cepa silvestre de *E. coli* y de una cepa derivada de ésta a la cual se le han eliminado los cinco genes cromosomales *hok*. Cabe mencionar que ambos métodos ofrecen la ventaja de ser sencillos y confiables, si bien es cierto que no son tan precisos.

Los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales *gef-lacZ* y *sof-lacZ* mostraron, en general, una actividad muy alta para el gen reportero *sof-lacZ* con respecto a la actividad del gen reportero *gef-lacZ* (la cual apenas es detectable). Este resultado, a grandes rasgos, coincide con los valores **puntuales** de actividad transcripcional previamente reportados para ambos genes, también con fusiones transcripcionales *lacZ* (Poulsen *et al.*, 1991). Es así que la actividad transcripcional detectada con estos genes reporteros mostró que la actividad del gen *sof* es creciente, aunque con algunas fluctuaciones, principalmente en la fase exponencial de crecimiento. Esta tendencia se observa más claramente durante el monitoreo del estrés nutricional hasta las 72 horas. Respecto a la actividad del gen *gef*, no fue posible apreciar cambios de relevancia sobre la línea basal de actividad. Es así que el gen cromosomal *gef* (y posiblemente todos sus homólogos cromosomales) puede descartarse de la lista de los posibles genes responsables de formar un programa genético encaminado a servir como “control poblacional”, al menos en las condiciones probadas de cultivo. En apoyo a esta hipótesis, destaca nuestro resultado obtenido con la comparación de viabilidad entre la cepa silvestre de *E. coli* y su derivada desprovista de todos los genes *hok* cromosomales o $\Delta 5$. Cabe destacar que las determinaciones de viabilidad de este último experimento se hicieron únicamente para un periodo corto de 5 horas a partir de un cultivo *overnight*, esto es, hasta que la curva de crecimiento del cultivo alcanzara la fase estacionaria. Pese a este corto tiempo

de monitoreo, se ha considerado informativo este resultado dado que de existir alguna utilidad de los genes *hok* cromosomales, esta se hubiera puesto de manifiesto, particularmente, a la salida de la fase estacionaria del cultivo overnight, en forma de una disminución considerable del número de UFCs, con respecto a la cepa silvestre. Es decir, que si nuestra hipótesis inicial de que los genes *hok* cromosomales actúan como genes de suicidio celular a diferentes escalas temporales (prolongando la vida del cultivo) fuera cierta, esperaríamos un número considerablemente inferior de colonias en la cepa $\Delta 5$, dado que al no contar con nutrientes habría una muerte súbita y masiva en el cultivo. De este modo aún es inexplicable el mecanismo (estocástico o programado genéticamente) mediante el cual bacterias que no esporulan, como *E. coli*, mantiene cuentas viables después de varios años de cultivo sin la adición de nutrientes nuevos (Finkel, 2006). Posiblemente se obtendría el resultado esperado para este último experimento en una cepa en la cual se hubieran deletado los cinco genes *hok* y los cinco sistemas TA de la cepa empleada en el trabajo de Tsilibaris *et al.*, 2007. Por otra parte, si bien nuestro monitoreo de actividad de β -galactosidasa de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* se hizo hasta una fase estacionaria avanzada (72 horas), cabe preguntarse si en la fase estacionaria muy prolongada (1 año de cultivo al menos), momento en el cual se sabe que existe un balance dinámico entre la tasa de muerte y “nacimiento” de nuevas células (Finkel, 2006) se tienen perfiles de expresión distintos o similares a los observados por nosotros.

Dado que no fue posible observar cambios en la expresión de nuestros genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* con el estrés nutricional impuesto, decidimos probar con el estrés calórico, el cual ha sido relacionado con la muerte inducida por la acción del sistema TA cromosomal *mazEF* (Hazan, Bat y Engelberg-Kulka, 2004). En este caso se probó el estrés calórico a dos distintas temperaturas (42 y 52° C), sin encontrar el posible incremento en la activación del gen *gef*, aunque si una disminución de la expresión del gen *sof*. Este decremento fue mayor cuando los cultivos fueron sometidos a un estrés calórico severo de 52° C, no

obstante, este decremento en la expresión de la antitoxina no se reflejó ni en la viabilidad ni en la generación de células *ghost*, según se observó al microscopio óptico, aún cuando estas observaciones se hicieron a distintos tiempos después de la aplicación del estrés.

Dado que ni el estrés nutrimental ni el calórico produjeron el incremento en la transcripción del gen codificante de la toxina, se decidió probar con otro tipo de estrés. En este caso se recurrió a la infección por el fago P1 como condición estresante, con el supuesto de que la posible infección por este fago podía desencadenar una respuesta de tipo “altruista”, como la observada con el fago P1 y el sistema TA *mazEF* (Hazan y Engelberg-Kulka, 2004), no obstante, los perfiles de expresión de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* no mostraron cambios entre los cultivos sujetos a infección con fago y aquellos cultivos control, descartando también este tipo de estrés como la señal que permite el incremento de la expresión del gen *gef*.

Estos resultados, aunque negativos en todos los casos, no descartan completamente la posibilidad de que la inducción del gen *gef* se presente en condiciones estresantes aún por descubrir, como un mecanismo de protección hacia la población, con el inminente sacrificio de algunos de sus individuos. Para corroborar esta hipótesis sería de utilidad continuar el estudio de ambos genes (*gef* y *sof*) empleando un espectro más variado de agentes estresantes y de sus respectivas intensidades.

Conclusiones

- ✓ No existe una respuesta en la expresión genética de los genes cromosomales *gef* y *sof*, derivada de la exposición a tres distintas condiciones estresantes: calor (52° C), estrés nutrimental (72 horas) ni durante la infección con el fago P1.
- ✓ Nuestra hipótesis de que los genes *hok* cromosomales actúan como un programa genético de control poblacional, sin los cuales cae súbitamente la viabilidad en un cultivo que ha agotado sus nutrientes, es errónea.
- ✓ Nuestros experimentos no permitieron establecer cuál es la función de los genes *hok* cromosomales.

Perspectivas

- ✓ Evaluar la actividad transcripcional de los genes reporteros *gef-lacZ* y *sof-lacZ* durante otros tipos de estrés, incluyendo el estrés ácido, por fagos distintos al P1 (T4), osmótico, etc.

- ✓ Evaluar la vida media de los mensajeros de ARN durante las condiciones de estrés anteriormente mencionadas.

- ✓ Evaluar la actividad transcripcional de estos genes reporteros en una fase estacionaria muy prolongada, posiblemente después de algunos meses de cultivo.

REFERENCIAS

1. Ameisen, J. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 9:367–393.
2. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, M., Yuri, T., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. Tomita, M., Wanner, B., y Mori, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in frame-single knockout mutants: the Keio Collection. *Mol. Syst. Biol.* 1:1–11.
3. Blattner, F. Plunkett III, R., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J., Rode, C., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N., Kirkpatrick, H., Goeden, M., Rose, D., Mau, B. y Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1462.
4. Buts, L., Lah, J., Dao-Thi, M. Wyns L. y R. Loris. 2005. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem. Sci.* 30: 672–679.
5. Christensen, S., Mikelsen, M., Pedersen, K. y Gerdes, K. 2001. RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:14328-14333.
6. Datsenko, K. y Wanner, B. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12: 6640-66445.
7. DeLisa, M., Wu, C., Wang, L., Valdes, J. y Bentley, W. 2001. DNA Microarrays-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 5239-5247.
8. Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, Hazan, R. 2006. Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behaviour in Bacteria. *PLoS Genetics.* 2: 1518-1526.
9. Finkel, S. 2006. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature.* 4: 113-120.
10. Franch, T., Gulyaev, P. y Gerdes, K. 1997. Programmed cell death by *hok/sok* of plasmid R1: processing at the *hok* mRNA 3' end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding. *J. Mol. Biol.* 273: 38-51.
11. Gertz, S., Engelmann, S. Schmid, R. Ohlsen, K. Hacker, J. y Hecker, M. 1999. Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genet.* 261: 558–566.

12. Gerdes, K. 2000. Toxin-Antitoxin Modules May regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J. Bacteriol.* 182:5 61-572.
13. Gerdes, K. y Wagner, E. 2007. RNA antitoxins. *Current Opinion in Microbiology.* 10:117-124.
14. Gerdes, K., Thiested, T. y Martinussen, J. 1990b. Mechanism of post-segregational killing by the *hok/sok* system of plasmid R1: *sok* antisense regulates formation of a *hok* mRNA species correlated with the killing of plasmid free cells. *Mol. Microbiol.* 4: 1807-1818.
15. Gerdes, K. Nielsen, A. Thorsted, P. y Wagner, E. 1992. Mechanism of killer gene activation. ANtisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable *hok*, *srnB* and *pndA* effector messenger RNAs. *J Mol. Biol.* 226: 637-649.
16. Gotfredsen, M, y Gerdes, K. 1998. The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol.* 29:1065-1076.
17. Haldiman, A. y Wanner, B. 2001. Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria. *J Bacteriol.* 183: 6384–6393.
18. Hayes, F. 2003. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science* 301, 1496-1499.
19. Hazan, R. y Engelberg-Kulka, H. 2004. *Escherichia coli mazEF* mediated cell death as a defense mechanism that prevents spreading of phage P1. *Mol Gen Genomics.* 272: 227–234.
20. Hazan, R., Sat, B. y Engelberg-Kulka, H. 2004. *Escherichia coli mazEF*-Mediated Cell Death Is Triggered by Various stressful conditions. *J Bacteriol.* 186: 3663–3669.
21. Hengge, R. 2009. Proteolysis of σ S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 160: 667-76.
22. Hiraga, S. 1992. Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 283-306.
23. Holcik, M. y Iyer, V. 1997. Conditionally lethal genes associated with bacterial populations. *Microbiology.* 143: 3403-3416.
24. Kang, X., Musa, H. y Zhu, G. 2008. Research Advances on the *hok/sok* gene System. *Int. Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences.* 4: 98-105.

25. Li, B., Smith, P., Horvath D., Romesberg, F. y Justice, S. 2010. SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes Infect.* 12: 662-668.
26. Loh, S., Cram, D. y Skurray, R. 1988. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a third function (Flm) involved in F-plasmid maintenance. *Gene.* 66: 259-268.
27. Miller, J. 1972. Experiments in molecular genetics. CSHL Press. Cold Spring Harbor. NY. 352-355.
28. Mittenhuber, G. 1999. Occurrence of *mazEF*-like antitoxin/toxin systems in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:295-302.
29. Morita, R. 1988. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation in nature. 34: 436-441.
30. Nagel, J., Gultayev, A., Gerdes, K. y Pleij, C. 1999. Metastable structures and refolding kinetics in *hok* mRNA of plasmid R1. *RNA.* 5:1408-1419.
31. Pandey, P. y Gerdes, K. 2005. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 33: 966-976.
32. Pecota, D. y Wood, T. 1996. Exclusion of T4 Phage by the *hok/sok* Killer Locus from Plasmid R1. *J Bacteriol.* 178: 2044-2050.
33. Pedersen, K., Christensen K. y Gerdes, K. 2002. Rapid induction and reversal of bacteriostatic conditions by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol. Microbiol.* 45:501-510.
34. Pedersen K. y Gerdes, K. 1999. Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 32: 1090-1102.
35. Poulsen, K., Larsen, N., Molin, S. y Andersson, P. 1989. A family of genes encoding a cell-killing function maybe conserved in all Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 3:1463-1472.
36. Poulsen, K., Refn, A. Molin S. y Andersson, P. 1991. Topographic analysis of the toxic Gef protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 5: 1827-1637.
37. Poulsen, K., Larsen, N., Molin, S. y Andersson, P. 1992. Analysis of an *Escherichia coli* mutant strain resistant to the cell-killing function encoded by the *gef* gene family. *Mol. Microbiol.* 6: 895-905.
38. Prados, J. Melguizo, C., Rama, A., Ortiz, R., Boulaiz, H., Rodríguez, F., Caba, O. Rodríguez, J., Ramos, J. y Aranega, A. 2008. Combined therapy using suicide *gef* gen and paclitaxel enhances growth inhibition of multicellular tumor spheroids of A-549 human lung cancer cells. *Int. Journal of Oncology.* 33: 121-127.

39. Ronchel, M., Molina, L., Witte, A., Lutbiz, W., Sören, M., Ramos, J. y Ramos, C. 1998. Characterization of Cell Lysis in *Pseudomonas putida* Induced upon Expression of Heterologous Killing genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4904-4911.
40. Saavedra de Bast, M., Natacha, M. y Van Melderen, L. 2008. Chromosomal Toxin-Antitoxin Systems May Act as Antiaddiction Modules. *J Bacteriol*. 190:4603-4609.
41. Sambrook, J. y D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Appendix 3. Media. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
42. Thiested, T., Nielsen, A. y Gerdes, K. 1994a. Mechanism of postsegregational killing: translation of *hok*, *srnB* and *pnd* mRNAs of plasmid R1, F and R483 is activated by 3' end processing. *EMBO J*. 13: 1960-1968.
43. Thiested, T., Sorensen, N. y Gerdes, K. 1995. Mechanism of postsegregational killing: secondary structure analysis of the entire *hok* mRNA from plasmid R1 suggest a fold-back structure that prevents translation and antisense binding. *J Mol Biol*. 247: 859-873.
44. Tsilibaris V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N. y Van Melderen L. 2007. What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J of Bacteriology*. 189: 6101-6108.
45. Unoson, C. y Wagner, G. 2008. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 70: 258–270.
46. Van Melderen, L. y Saavedra de Bast, M. 2009. Bacterial Toxin-Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genetics*. 5: 1-6. e 1000437.
47. Westwater, C., Kasman, L., Schofield, D. Werner, P., Dolan, J., Schmidt, M. y Norris, J. 2003. Use of Genetically Engineered Phage to Deliver Antimicrobial Agents to Bacteria: an Alternative Therapy for Treatment of Bacterial Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 1301-1307.
48. Wu, L. y Errington, J. 2004. Coordination of the cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*. 117: 915-925.
49. Yarmolinsky, M. 1995. Programmed Cell Death in Bacterial Populations. *Science*. 267: 836-837.
50. Zhou, L., Kim, S., Avramova, L., Datsenko, K. y Wanner, L. Use of Conditional-replication, Integration, and Modular CRIM Plasmids to Make Single-copy *lacZ* Fusions. Capítulo 7. En: Blot, M. (editor). *Prokaryotic Genomics*. Birkhäuser. 2003. Pags: 65-89.