



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN DE LA TOPOLOGÍA DEL DNA
Y DE LA TOPOISOMERASA II O GIRASA EN
CONDICIONES DE ESTRÉS NUTRIMENTAL
DE CARBONO Y FOSFATO EN LA
BACTERIA *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

Alejandra Gutiérrez Estrada

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Mi principal y profundo agradecimiento a la Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann por haberme asesorado pacientemente, por sus críticas, por su ejemplo, por su generoso conocimiento pero sobretodo por haberme enseñado algo aún más valioso, el constante asombro y la humildad para seguir aprendiendo. Maestri, mi encuentro con usted vale más que un potosí.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por su crítica, su ayuda profesional, sus consejos, todas sus correcciones sin las cuales esta tesis hubiese tardado más, su sinceridad, sus pláticas, su sentido del humor y sobre todo por su valiosa compañía estos años. Muchísimas gracias Jesús.

A la Dra. María Imelda López Villaseñor y el Dr. Jorge Vázquez Ramos por su atención en todos los tutorales y sus críticas que sirvieron para enriquecer este trabajo.

Por la revisión de esta tesis así como sus comentarios agradezco a los miembros del Jurado de examen:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. José Edgardo Escamilla Marván y al Dr. Jorge Vázquez Ramos.

A la Lic. Lucía Brito Ocampo quien me facilitó lo necesario para el acceso a las fuentes de información que requerí durante la elaboración de este trabajo.

A Leticia García Gutiérrez por su cálido trato así como su excelente trabajo, el cual me permitió resolver oportunamente los trámites administrativos relacionados con el posgrado.

A la señora Socorro Salazar Salazar por su inquebrantable sentido de la responsabilidad.

A CONACyT por la beca que gocé durante mis estudios de maestría (2009-1/2010-2) para la realización de la presente tesis.

A mi madre por su ejemplo de lucha y coraje para salir adelante. Por entender mis ausencias y aguantar mis malos momentos, por sus “apapachos” y su inmenso amor. Eres admirable mamá.

A mi padre por su apoyo, su interés, su curiosidad, su fortaleza, su temple, su acercamiento y su amor. Papá tu labor es digna de ser reconocida, gracias por enseñarme a aguantar las caídas y no llorar.

Especialmente a mi hermana Silvia de quien quiero seguir aprendiendo hasta el último momento y quien me ha enseñado a reinventar lo que es la voluntad. Soy muy afortunada por tenerte a mi lado, te quiero muchísimo.

A mi querida “pareja” Janet García Pillado por sus críticas, por los buenos momentos, por su ayuda, por su amistad, por su apoyo, por sus consejos, por su complicidad, por sus risas, por permitirme conocerla.

A mi amiga Liz por su irreverencia y todas sus ocurrencias, por llenar de alegría los momentos de trabajo, por sus recomendaciones y sus enseñanzas.

A mis amigos del instituto: Iván, Omar, Aydé, Mariana, Sittlali, Laura, Clelia, Víctor, Fernando, Salvador por hacer mis días agradables y divertidos.

A Joel por su indudable ayuda, sus sugerencias, por los momentos buenos y los malos. Por facilitarme tantas cosas entre ellas, la computadora con la cual realicé este trabajo. Por ser la noche que pinta mis cometas, el loco que por corazón lleva un mar de espuma y alma de arena.

A mi eterna compañera de noches y ángel de mis mañanas, Kamila.

ÍNDICE

RESUMEN	1
---------	---

INTRODUCCIÓN

1. El superenrollamiento de DNA en <i>Escherichia coli</i>	3
1.1 Parámetros topológicos de la molécula de DNA	3
1.2 El cromosoma bacteriano	5
1.3 Enzimas DNA topoisomerasas	8
• Generalidades de Girasa y su ciclo de reacción	
• Homeostásis del superenrollamiento.	
2. La fase estacionaria en <i>Escherichia coli</i>	11
2.1 La fase estacionaria en medio rico LB	12
2.2 Regulación genética en fase estacionaria	14
• Reemplazo del factor σ^{70} por σ^S en fase estacionaria.	
• Regulación de σ^S	
3. La fase estacionaria en medio mínimo	16
3.1 Ayuno de carbono o fosfato	16
3.2 Regulación genética previa al ayuno de fosfato	17
3.3 Regulación de <i>rpoS</i> (σ^S) en el ayuno de fosfato o de carbono	18
4. El regulón <i>rpoH</i> (σ^{32}) y su relación con la fase estacionaria	22
ANTECEDENTES	25
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	32
RESULTADOS	
1. Superenrollamiento del DNA en células silvestres (<i>wt</i>) y mutantes <i>rpoS::kan</i> en Fase exponencial (FX) , Fase estacionaria (FS) en ayuno de Carbono (C) o Fosfato (P), y en la recuperación del crecimiento	42

2. Recuperación del superenrollamiento del DNA en células silvestres y mutantes <i>relA1 rpoS::Tn10</i> y <i>relA⁺ rpoS::kan</i> en ayuno en medio rico (LB) al añadirse medio fresco al cultivo_____	47
3. Papel de las chaperonas citoplasmáticas en la recuperación del superenrollamiento del DNA en células en ayuno en medio rico (LB) al añadirse medio fresco al cultivo _____	49
4. Recuperación del superenrollamiento del DNA en células silvestres y mutantes <i>ppk::kan</i> y <i>ppx::kan</i> en ayuno en medio rico (LB) posterior a la adición de medio fresco al cultivo_____	51
DISCUSIÓN_____	54
CONCLUSIONES_____	61
PERSPECTIVAS_____	62
BIBLIOGRAFÍA_____	63

RESUMEN

El superenrollamiento (SE) del DNA de *E. coli* y en general de todo organismo, es esencial para el metabolismo del DNA. El SE en *E. coli* depende principalmente de la DNA topoisomerasa I (Top I) y de la topoisomerasa II o Girasa. Top I corta una hebra y relaja al DNA. Girasa corta dos hebras y superenrolla al DNA para lo cual, requiere ATP. Este nivel se modifica en respuesta a cambios ambientales, tales como cambios en la concentración de nutrientes. En medio rico (LB), las células en fase estacionaria (FS) disminuyen el nivel de SE y éste se recupera rápidamente al añadir nutrientes. La recuperación no requiere transcripción o traducción *de novo*, depende de Girasa y del factor transcripcional RpoS (σ^S). El modelo de regulación propuesto es que se requiere de un mecanismo de protección dependiente de RpoS para Girasa durante el ayuno. Este mecanismo permite la rápida recuperación del nivel de SE, que es esencial para reiniciar el crecimiento, al añadirse nutrientes al medio (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

En este trabajo se estudió si células en FS en ayuno de carbono (C) o de fosfato (P) regulaban el SE de manera semejante a lo descrito para las células en LB. El metabolismo, la fisiología y el patrón de expresión genética de las células en ayuno de C o de P, son diferentes. Por ejemplo, tanto la oxidación de proteínas como la expresión de los genes de estrés oxidativo es particular en cada caso (Ballesteros *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2001).

Los resultados muestran que, en células en ayuno de C o de P, la recuperación del SE posterior a la adición de nutrientes depende de Girasa y no requiere transcripción ni traducción *de novo*. Sin embargo, a diferencia de las células en ayuno en LB, la ausencia de RpoS no es importante para esta recuperación.

En la regulación de RpoS interviene ppGpp que es una molécula sintetizada por la enzima RelA. Para comparar el papel del regulador RpoS y de la enzima RelA en las células en ayuno, se determinó la recuperación del SE en LB en la cepa *relA*⁺

rpoS::kan. Los resultados muestran que la recuperación es independiente del gen *relA* y confirma que en células en LB, RpoS es importante para la recuperación del SE.

Para evaluar si DnaK-ClpB protege a Girasa durante FS de manera semejante a como lo hace durante el estrés calórico, se utilizó una mutante $\Delta rpoH$ crecida en LB. La recuperación del SE fue igual en la cepa $\Delta rpoH$ y en la cepa *wt* lo cual sugiere que no se requiere a esta chaperona para proteger a Girasa.

Se evaluó también el posible papel del polifosfato (poli-P) como fuente energética de rápida disponibilidad durante la recuperación del SE para la reactivación de Girasa. poli-P es un compuesto de reserva durante FS y se ha reportado que podría servir como una fuente alternativa de energía. En los resultados se observa que la ausencia de poli-P no modifica la rápida recuperación del SE por Girasa.

INTRODUCCIÓN

1. El superenrollamiento del DNA en *Escherichia coli*

El cromosoma de *Escherichia coli* es una molécula circular, cerrada, de aproximadamente 4.7 millones de pares de bases y una longitud de 1.5 mm. Esta molécula, que es muy larga en comparación con el volumen celular ($1 \mu\text{m}^3$), se encuentra bajo tensión helicoidal o superenrollamiento, lo que contribuye a su compactación. Es decir, la molécula de DNA se enrolla en el espacio para formar hélices de orden mayor o superhélices. El DNA en esta conformación se conoce como DNA superenrollado (SE).

1. 1 Parámetros topológicos de la molécula de DNA

El SE del DNA se clasifica en: toroidal y plectonómico. El SE toroidal se forma cuando la molécula de DNA se enrolla alrededor de proteínas; si en cambio, el DNA se enrolla sobre sí mismo, se denomina SE plectonómico (Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Bowater, 2005). Aproximadamente un 50% del total de supervueltas en el cromosoma de *E. coli* son de tipo toroidal; sin embargo, éstos son arreglos temporales. El 50% restante son supervueltas de tipo plectonómico.

El SE plectonómico se representa mediante la fórmula:

$$Wr = Lk - Tw$$

Estas variables representan las propiedades topológicas del DNA que son: Wr (writhe number), Tw (twist number) y Lk (linking number) (Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Bowater, 2005).

Wr representa el número de veces que la molécula de DNA cruza su propio eje en el espacio o, número de supervueltas. El valor de Wr para una molécula relajada, es decir sin supervueltas, es de 0. Tw representa el número de veces que se

cruzan las hebras en la molécula vista en un solo plano. T_w es igual al número de pares de bases por vuelta de la hélice. T_w , en las moléculas de DNA-B, es aproximadamente 10. W_r es un parámetro que puede calcularse experimentalmente y T_w puede deducirse si se conoce el número de pares de bases de la molécula de DNA.

L_k es un parámetro topológico que se puede calcular una vez conocidos W_r y T_w . L_k se refiere al número hipotético de veces que, en una molécula superenrollada una hebra de DNA atraviesa en un plano con otra. Este número puede ser igual, mayor o menor que T_w . L_k tiene un valor igual al de T_w en una molécula relajada donde W_r es igual a 0. En general, el DNA en las células tiene un superenrollamiento negativo, en el cual L_k es un número menor al de T_w . El superenrollamiento de las moléculas de DNA induce una tensión topológica en las dos hebras del DNA que facilita la separación de éstas durante el metabolismo del DNA como la replicación, reparación, transcripción o recombinación (Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Willnbrock and Ussery, 2004; Bowater, 2005; Dorman, 2006; Nöllmann *et al.*, 2007; Khodursky, 2007).

En condiciones ideales, es decir, condiciones que favorecen la conformación DNA-B, el L_k se modifica únicamente por la introducción de cortes en una o las dos hebras del DNA, cambios en la topología de las hebras del DNA en la región del corte y su posterior religado (Figura 1). Las enzimas que cambian el nivel de superenrollamiento del DNA en las células se llaman DNA topoisomerasas, las cuales se describen más adelante.

El L_k también puede cambiar sin la introducción de cortes por ejemplo cuando la temperatura o la concentración de sales no son las óptimas o cuando se unen ciertas proteínas al DNA. El nivel de superenrollamiento de una molécula y por tanto el valor de L_k , varía en respuesta a los cambios ambientales tales como cambios en la cantidad de nutrientes, pH, temperatura, osmolaridad o

disponibilidad de oxígeno (Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Bowater, 2005; Nöllmann *et al.*, 2007; Khodursky, 2007).

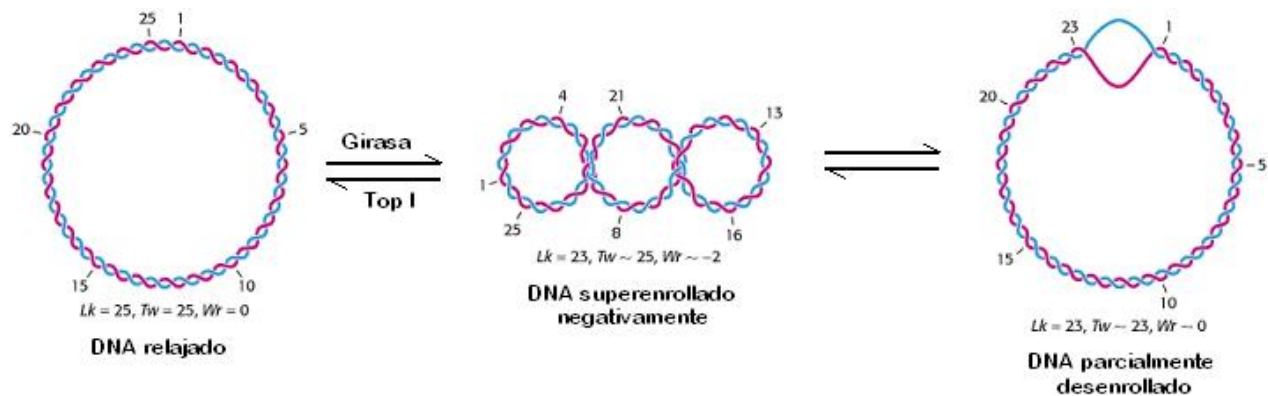


Figura 1. Estados topológicos de una molécula de DNA covalentemente cerrada. El cambio de la molécula relajada hacia un estado de superenrollamiento, lo cataliza Girasa. Modificado de Molecular Biology of the Cell, 6^a ed., 2008.

1.2 El cromosoma bacteriano

El DNA del cromosoma está organizado en asas SE independientes cuyo número depende de las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, en medio rico, las células en fase exponencial (FX) tienen alrededor de 400 asas mientras que, en fase estacionaria (FS), presentan un número menor dado que la actividad transcripcional es menor. Esto indica que la estructura del cromosoma bacteriano es muy dinámica (Dorman, 2006; Dillon and Dorman, 2010).

En las asas, el DNA se organiza en dominios independientes; es decir, los cambios de SE en un dominio no se propagan a dominios vecinos. Se sugiere que el tamaño promedio de los dominios es de 10 kb (Hanni and Ussery, 2004; Dorman, 2006; Dillon and Dorman, 2010). Es difícil establecer los límites entre los dominios; hasta ahora, no se ha identificado un factor en *cis* o en *trans* que definitivamente constituya un límite (Dorman, 2006). Una característica que sí ha podido establecerse, es que los dominios son transitorios (Dorman, 2006; Dillon and Dorman, 2010).

El DNA del cromosoma se localiza en el citoplasma en un complejo denominado nucleoide que incluye a las DNA y RNA polimerasas, así como moléculas de RNA y proteínas. Las principales proteínas asociadas al nucleoide (NAPs) son Fis, HU, HN-S y Dps (Bowater, 2005; Dillon and Dorman, 2010). Las NAPs se unen al DNA de dos maneras: dependiente o independientemente de secuencias específicas. Para el primer caso tenemos por ejemplo a IHF (*Integration Host Factor*) que remodela localmente al DNA a través de la introducción de vueltas tipo U y además está involucrada en la recombinación sitio específica; HN-S (*Histone-like Nucleoid Structuring protein*) que forma puentes DNA-proteína-DNA y limita las supervueltas en el DNA y Fis (*Factor for Inversion Stimulation*) que influye en la actividad transcripcional dependiendo de la etapa de crecimiento. Mientras que, para el segundo caso, tenemos a HU que interactúa con la DNA topoisomerasa I, lo cual facilita cambios en el SE, y a Dps, la cual forma una estructura cuasi-cristalina que protege al DNA de los radicales libres durante FS (Bowater, 2005; Dillon and Dorman, 2010). Algunas NAPs como H-NS, HU, Fis y Dps posiblemente participan en la estructuración del SE en el DNA (Hsu *et al.*, 2006).

El nivel global de SE (supranivel de organización) se modifica durante el crecimiento celular y en respuesta a diferentes condiciones de estrés ambiental. Por ejemplo, el DNA del cromosoma está SE durante la FX y en la FS se pierden supervueltas; es decir, el DNA se relaja (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). El estrés de calor induce una relajación transitoria del SE, mientras que el estrés osmótico induce un aumento transitorio del SE (Camacho-Carranza, 1995; Rui and Tse-Dinh, 2003). Estos cambios están modulados por la actividad de las DNA topoisomerasas (ver más adelante) y por la concentración relativa de las NAPs (Figura 2). Entre las NAPs, Fis es una de las que influye de manera importante en la topología del cromosoma durante el crecimiento bacteriano (Blot *et al.*, 2006).

Fis es importante en los procesos de recombinación, estimula la transcripción de los operones de rRNAs y tRNA e interviene en el inicio de la replicación. Fis es sensible a los cambios en el SE y debido a esto, posee un mecanismo de

retroalimentación que modula la cantidad de proteína acorde a la fase de crecimiento (Ball *et al.*,1992; Dorman, 1996; Dorman, 2006). Se ha reportado que al inicio de la FX la transcripción de *fis* es muy activa llegando a producir hasta 60,000 moléculas por célula. Esto se relaciona con la demanda metabólica celular ya que Fis induce la transcripción de los promotores ribosomales, de tRNAs y de algunos factores de elongación. En la FS las cantidades de Fis disminuyen; por ejemplo, en FS de 10 horas las células contienen aproximadamente 100 moléculas. Estas fluctuaciones durante la transición de las fases de crecimiento podrían sugerir que Fis funciona como un sensor del metabolismo influyendo además en el SE (Ball *et al.*,1992; Keane and Dorman, 2003; Dillon and Dorman, 2010).

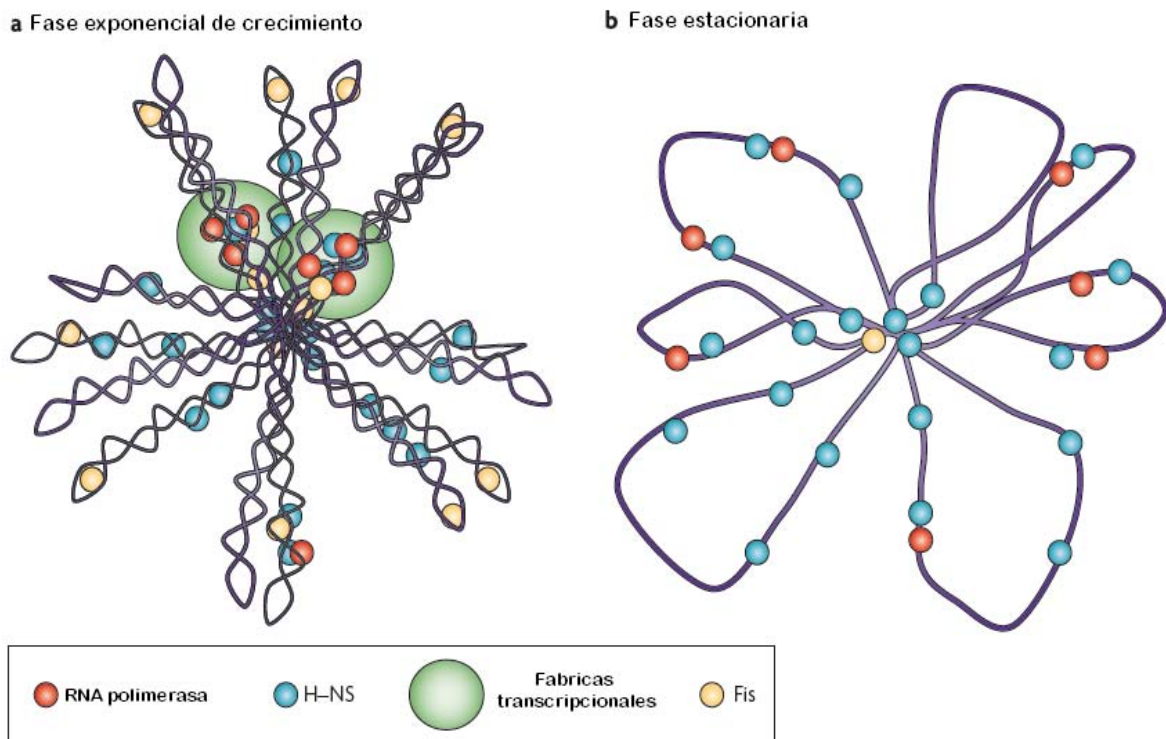


Figura 2. Proteínas asociadas al nucleóide (NAPs). El cromosoma bacteriano se encuentra organizado en varios dominios que se encuentran superenrollados durante fase exponencial. Durante la fase estacionaria disminuyen los dominios así como la tensión helicoidal en ellos, es decir, hay una relajación del cromosoma. Las NAPs varían en función de la etapa de crecimiento (Modificado de Dillon and Dorman, 2010).

1.3 Enzimas DNA topoisomerasas

Las DNA topoisomerasas se clasifican en dos grupos: las que no requieren ATP y cortan una hebra y las que requieren ATP y cortan las dos hebras. En *E. coli*, el nivel de SE del DNA depende principalmente de la DNA topoisomerasa I (TopI) que corta una hebra y relaja al DNA y de la topoisomerasa II o Girasa que corta dos hebras y superenrolla al DNA. El SE también depende, aunque en menor grado, de la DNA topoisomerasa IV, una enzima que requiere ATP y corta las dos hebras. Sin embargo, su función es más aparente cuando la Top I está ausente (Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Schoeffler and Berger, 2005; Drolet, 2006).

Estas enzimas, cortan de manera temporal al DNA, ya que posteriormente vuelven a unir el corte hecho en la molécula. En este proceso se forma un complejo intermediario compuesto de la enzima unida covalentemente al DNA (Enzima-DNA), para lo cual interviene el grupo fosforilo del DNA y un residuo de tirosina de la enzima. Este complejo transitorio sirve para conservar la energía que se libera del enlace fosfodiéster, la cual se utiliza para unir nuevamente el corte (Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995).

Top I es una enzima monomérica de 102 kDa que interacciona preferentemente con DNA SE negativamente y está codificada por el gen *topA*. TopI tiene actividad de endonucleasa y no requiere de ATP, pues la reacción se lleva a cabo con la energía de la ruptura del enlace fosfodiéster. Esta enzima aumenta el *Lk* en una unidad por cada reacción. Las mutaciones en el gen *topA* no son letales, pero afectan de manera importante el crecimiento celular. Estudios genéticos muestran que las mutaciones en el gene *topA* pueden ser compensadas con una segunda mutación que disminuya la actividad de Girasa o que amplifique el número de copias de los genes *parC* y *parE*, que codifican para la topoisomerasa IV (Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Rui and Tse-Dinh, 2003; Dorman, 2006).

Girasa fue descubierta en 1976 por el grupo de Howard Nash y se describió como “una enzima capaz de catalizar una reacción que incrementa la densidad de superenrollamiento negativo y que por lo tanto, almacena la energía proveniente de la deformación mecánica en el DNA” (Gellert *et al.* 1976).

Girasa es una enzima heterotetramérica formada de dos subunidades GyrA (97 kDa) y dos GyrB (90 kDa) las cuales son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Las mutaciones “knockout” en estos genes son letales indicando que es una enzima esencial para la célula (Dorman, 2006). La subunidad GyrA es la encargada de unirse al DNA e introducir el corte de las dos hebras del DNA y posteriormente ligarlo. El extremo amino de esta subunidad tiene el residuo de tirosina con el cual se une covalente y transitoriamente al DNA. El dominio carboxilo de GyrA es el responsable de controlar la transformación topológica del DNA. Experimentalmente se ha visto que si este dominio se trunca, la habilidad para superenrollar al DNA se pierde. GyrB posee actividad de ATPasa la cual es potencializada en presencia de GyrA. Girasa disminuye el *Lk* en la molécula de DNA en dos unidades por ciclo de reacción. Girasa es la única enzima que introduce supervueltas negativas (Figura 3B) las cuales contrarrestan el superenrollamiento positivo que se genera por la separación de las hebras del DNA en procesos como la replicación, la transcripción, etc (Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Schoeffler and Berger, 2005; Dorman, 2006; Nölmann *et al.*, 2007).

En cada ciclo de reacción se hidrolizan dos moléculas de ATP (Figura 3A). Se sugiere que la unión del ATP induce el cambio conformacional que permite el cruce de la cadena de DNA a través del corte transitorio. La hidrólisis del ATP libera a la enzima para un ciclo de reacción posterior (Peebles *et al.*, 1978; Fisher *et al.*, 1992; Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Nölmann *et al.*, 2007). El consumo de ATP en la reacción es fisiológicamente relevante, ya que la actividad de la enzima depende del estado metabólico de la célula (Dorman, 2006). En las células en FS disminuye la poza de ATP, por lo que la enzima no

puede llevar a cabo su ciclo de reacción y el DNA se relaja (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

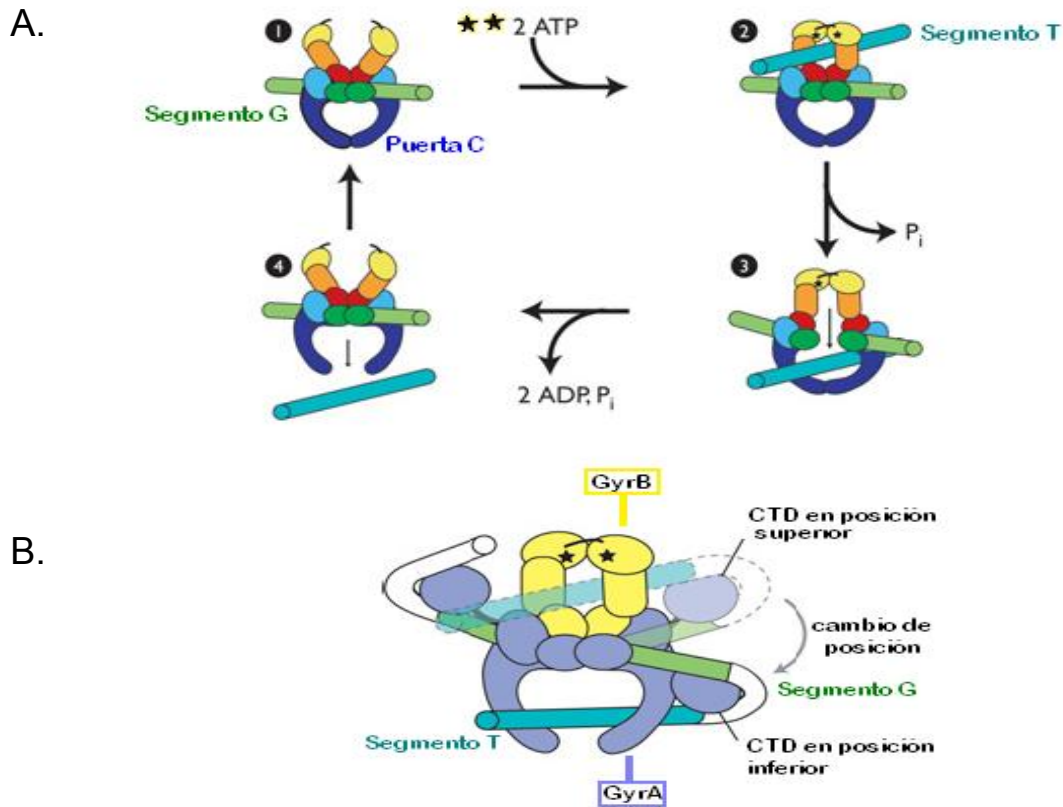


Figura 3. Mecanismo catalítico y estructura cuaternaria de Girasa. (A) Modelo propuesto para la introducción de supervueltas. El segmento G (verde) se corta y a través de este corte, el segmento T (azul) se trasloca. El segmento G se vuelve a unir y entonces el segmento T se libera. (B) Mecanismo de introducción de supervueltas. El movimiento del dominio CTD (morado) induce la traslocación del segmento T (Modificado de Schoeffler and Berger, 2005).

El nivel de SE, a su vez, modula la expresión de los genes *topA*, *gyrA* y *gyrB*. La relajación del DNA estimula la transcripción de los genes *gyr*, mientras que, si el SE aumenta, se induce la transcripción de *topA* (Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995; Rui and Tse-Dinh, 2003; Peter *et al.*, 2004). Este mecanismo homeostático mantiene el grado de SE del DNA dentro de un estrecho intervalo, el cual mantiene en un estado óptimo el metabolismo de esta molécula. La expresión de los genes *gyr* también se ve afectada por proteínas como Fis, la cual actúa como un represor transcripcional de los genes *gyrA* y *gyrB*. Fis también

activa o reprime la expresión de *topA*, lo cual le confiere un papel importante en la modulación de la actividad de las dos principales enzimas encargadas de la topología del DNA (Blot *et al.*, 2006; Dorman, 2006; Dillon and Dorman, 2010).

Además de *gyrA*, *gyrB* y *topA*, se han descrito alrededor de 306 genes sensibles al SE, de los cuales, 106 aumentan su expresión durante la relajación del cromosoma, mientras que 200 la disminuyen. Por ejemplo, durante la salida de FS posterior a la adición de medio fresco, la tensión helicoidal del cromosoma se recupera, esto induce la activación del promotor *fis* que responde de manera positiva al aumento en el SE, lo que incrementa los niveles de la proteína Fis. Este comportamiento es inverso cuando las células reanudan la entrada a FS. Durante esta etapa, los niveles de FIS disminuyen en una unidad de logaritmo con respecto a la FX. Así, este gen se regula de manera positiva con un aumento en la tensión helicoidal del cromosoma (Peter *et al.*, 2004; Ramírez-Santos *et al.*, 2005).

El nivel de SE se modifica en respuesta a cambios ambientales en temperatura, salinidad, tensión de oxígeno y concentración de nutrientes, entre otros. Los cambios en SE, como se mencionó, modifican la expresión de un número importante de genes, lo que contribuye a facilitar la adaptación de las células a las variaciones ambientales (Dorman, 1996; Travers *et al.*, 2001, Rui and Tse-Dinh, 2003; Peter *et al.*, 2004).

En este trabajo se estudiaron los cambios en el SE en células en FS (ayuno nutricional) en medios mínimos definidos, así como su recuperación al añadir nuevamente nutrientes. Por ello, a continuación se presentan las principales características celulares en esta fase.

2. La fase estacionaria en *Escherichia coli*

De manera natural, los recursos en el medio ambiente que sustentan el crecimiento de los microorganismos, tienden a agotarse. Antes de que esto suceda, los microorganismos crecen de manera constante; esta etapa en el

crecimiento se conoce como fase exponencial (FX). Posteriormente, los sustratos comienzan a agotarse y esto induce la entrada a la FS en donde la tasa metabólica celular disminuye sin llegar a ser nula y se establece un metabolismo basal que permite a la célula mantenerse hasta que de nuevo haya nutrientes disponibles para reiniciar el crecimiento (Siegele and Kolter, 1992). Las células permanecen en un estado no replicativo lo cual se debe a que la generación de células hijas requiere de dNTPs (desoxinucleósidos 5,-trifosfato) en altas cantidades y bajo condiciones de ayuno, éstos no pueden sintetizarse pues dependen de la disponibilidad de nutrientes (Nyström, 2002; Wang and Levin, 2009; Llorens *et al.*, 2010). Además, las células presentan cambios morfológicos y fisiológicos que les permiten adaptarse durante esta etapa (Ramírez-Santos *et al.*, 2005).

2.1 La fase estacionaria posterior al crecimiento en medio rico (LB)

En células crecidas en medio rico, se ha visto que los cambios son: disminución en el volumen celular como consecuencia de la asincronía en la tasa de síntesis de DNA, RNA y proteínas, adquisición de una forma esférica relacionada con la digestión de membranas y del citoplasma. El nucleóide se condensa lo que requiere de la proteína Dps, la cual forma un complejo estable llamado “biocristal”. Dps es una ferritina bacteriana que actúa como un quelante de hierro, evitando así que los radicales libres dañen al DNA. Metabólicamente hay una disminución de la actividad respiratoria lo que disminuye la generación de radicales libres endógenos. En la pared celular, el peptidoglicano aumenta su grosor. En la membrana interna disminuyen los ácidos grasos mono-insaturados, aumentan los derivados ciclopropílicos y hay también una disminución en los niveles de fosfatidilglicerol y fosfatidilserina. Como consecuencia de estos cambios, la membrana reduce su fluidez y su permeabilidad. La tasa de reemplazo de proteínas aumenta aproximadamente 5 veces. Los ribosomas entran en un estado de hibernación (dimerización) propiciando en parte, la disminución en la síntesis de proteínas (Siegele and Kolter, 1992; Nyström, 2002; Ramírez-Santos *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2010).

En el periplasma se acumulan compuestos de reserva como trehalosa el cual es un oligosacárido derivado de membrana que funciona como osmoprotector y polifosfato (poli-P) que es un polímero lineal de residuos de fosfato unidos mediante enlaces fosfo-anhidro de alta energía como en el ATP. Este posee varias funciones biológicas, es un quelante de iones Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} , un reservorio de fosfato, un amortiguador alcalino y una posible fuente energética. El poli-P regula también varios de los ajustes metabólicos necesarios durante el crecimiento, así como a RpoS (del cual, se hablará más adelante) durante condiciones de estrés. En *E. coli* las principales enzimas involucradas en el metabolismo del poli-P son PPK y PPX; los genes de estas enzimas forman un operón. La polifosfato cinasa (PPK) posee varias funciones, sintetiza de manera reversible (favoreciendo la síntesis) poli-P a partir del fosfato terminal del ATP, convierte ADP en ATP reversiblemente y transforma el GDP en GTP. En *E. coli* es la única enzima encargada de la síntesis de este polímero. PPX1 y GPPA (PPX2) poseen actividad como exopolifosfatasas, que son enzimas hidrolíticas que liberan P_i a partir de poli-P. PPX2 tiene un papel importante durante la respuesta estricta (ver más adelante) inducida durante el ayuno (Kornberg *et al.*, 1999; Brown and Kornberg, 2004; Rao *et al.*, 2009). Los valores normales en *E. coli* de poli-P en FX incrementan aproximadamente 100 veces en la entrada de FS. Esto sucede debido a que la expresión de *ppk* aumenta durante la entrada a FS mientras que la expresión de *ppx* está en valores mínimos. Este comportamiento cambia cuando las células salen de FS; en este momento, se favorece la expresión de *ppx* y así, se restauran los valores basales de poli-P en células en FX (Kornberg *et al.*, 1999).

La entrada a FS involucra muchos cambios necesarios para reprogramar el metabolismo y hacerlo más eficiente. Para esto, los microorganismos poseen sistemas transductores de señales constituidos por proteínas sensoras que captan el estímulo y lo transducen hacia las proteínas efectoras, lo que permite una respuesta rápida en las células. Así, en la célula se estructuran redes regulatorias

que se encargan de las respuestas de adecuamiento bajo diferentes condiciones (Gilles, 2006).

2.2 Regulación genética en la fase estacionaria.

La entrada a FS es un proceso en donde están involucrados varios reguladores transcripcionales. El patrón en la expresión genética cambia, lo cual se logra mediante el reemplazo de la subunidad σ en la RNA polimerasa, lo que confiere selectividad hacia distintas regiones promotoras. La subunidad σ^{70} codificada por el gen *rpoD* es el factor transcripcional principal durante FX. Los factores alternativos como σ^S (RpoS), σ^{32} (RpoH), σ^{54} (RpoN), etc., compiten con σ^{70} por el sitio activo de la RNA polimerasa. σ^S (σ^{38} o RpoS) es el principal regulador de la respuesta a estrés durante FS.

σ^S se considera un regulador global de la respuesta a estrés o regulador maestro de la respuesta a estrés, ya que interviene en la respuesta hacia el aumento de las condiciones osmóticas, oxidativas, de pH y de temperatura (Henge-Aronis, 2002).

Evolutivamente σ^S está muy relacionado con σ^{70} , por lo que ambos reconocen promotores con secuencias parecidas. La secuencia consenso para σ^{70} en la región -10 es TATAAT y en -35 TTGACA, mientras que σ^S en la región -10 es CTATA(A/C)T y en -35 TTGACA. Esta similitud de las regiones promotoras propicia que *in vitro*, σ^{70} transcriba algunos genes dependientes de σ^S y viceversa (Tanaka *et al.*, 1993; Lacour and Landini, 2004). Sin embargo, la selección *in vivo* de la región promotora entre ambos factores debe estar controlada más allá de solo la secuencia. Un factor importante en esta selección es el grado de SE; por ejemplo, en FS disminuye la síntesis de ATP (debido a la escasez de nutrientes) y Girasa es incapaz de introducir SE, por lo que el DNA se relaja. El reconocimiento de los promotores dependientes de σ^S es más eficiente en DNA relajado sugiriendo que la relajación del DNA que ocurre en FS tiene un papel importante en la transcripción de los genes dependientes de σ^S (Peter *et al.*, 2004). La célula percibe la disponibilidad de nutrientes a través de ppGpp (tetrafosfato

de guanosina); es decir, durante el crecimiento celular, si no son suficientes los nutrimentos, aminoácidos (a.a), carbono, fosfato, ácidos grasos, hierro, etc., se induce la “respuesta estricta” la cual inhibe la síntesis de ribosomas (Magnusson *et al.*, 2005; Wu and Xie, 2009). Esta respuesta se lleva a cabo a través de la alarmona ppGpp. Durante el ayuno de a.a cuando un tRNA vacío entra al sitio A del ribosoma, se activa la producción de ppGpp vía la enzima ppGpp sintasa I (RelA) la cual es codificada por *relA*. Otros tipos de estrés, aparte del ayuno de a.a., inducen también la síntesis de este nucleótido vía ppGpp sintasa II (SpoT) que está codificada por *spoT*. La vía de señalización exacta para la producción de ppGpp dependiente de SpoT no es bien conocida; sin embargo, parece ser que la producción de ppGpp dependiente de SpoT es la respuesta primaria en el caso de los estreses producidos por limitación de ácidos grasos, carbono, fosfato y hierro (Magnusson *et al.*, 2005; Wu and Xie, 2009).

ppGpp altera la competitividad de los diferentes factores σ de acuerdo a los requerimientos celulares durante un estrés fisiológico (Jishage *et al.*, 2002). El rol de σ^S en *E. coli* es complementario al de ppGpp y, sus concentraciones responden a las condiciones de estrés. Dado que la expresión de los genes dependientes de σ^S es a su vez dependiente de la expresión de ppGpp, éste funciona como un regulador importante, un efector positivo de *rpoS* (Nyström T. 2004, Spira *et al.*, 2008).

Aproximadamente la expresión de 140 genes está regulada por σ^S (Llorens *et al.*, 2010; Jozefczuk *et al.*, 2010). Entre los genes regulados por σ^S están algunos que se relacionan con la topología del DNA como *topA* y *dps* (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Una variedad de determinantes regulatorios en *cis* y *trans* están involucrados en la regulación de σ^S durante el estrés; por ejemplo, cAMP-CRP, GlcIIA, BarA, acetato, poli-P, homoserina lactona, ppGpp, la tasa NADH/NAD, DnaK, DksA, Hfq, HU, StpA, LeuO y varios sRNAs (Fredriksson *et al.*, 2007).

Lo aquí descrito corresponde al estudio de células de FS en medio rico Luria-Bertani (LB); sin embargo, en estudios de los últimos 10 años se ha visto que las características celulares, metabólicas y genéticas son distintas si por ejemplo, la entrada a FS es por el agotamiento de sustratos específicos como el carbono (C) o el fosfato (P). Por lo tanto, la expresión de *rpoS* (transcripción, traducción, estabilidad y actividad protéica) estará en función del nutrimento que induzca el ayuno y, como consecuencia, la suspensión del crecimiento (Lacour and Landini, 2004; Bougdour *et al.*, 2006; Fredriksson *et al.*, 2007; Bougdour *et al.*, 2008).

3. La fase estacionaria posterior al crecimiento en medio mínimo

3.1 Ayuno de carbono o fosfato

Las células que entran a FS por ayuno de carbono (C) o de fosfato (P) muestran diferencias importantes en su actividad metabólica y niveles de oxidación. Por ejemplo, las células que entran en FS por ayuno de C poseen los niveles de oxidación más altos y las tasas metabólicas más bajas. Si la fuente de C preferencial (glucosa) se agota en el medio, cesa el crecimiento celular y justo en ese momento las proteínas sufren daño oxidativo, una fracción del cual es irreversible (carbonilación). Esta oxidación tiene una relación inversa con la tasa respiratoria, la cual disminuye drásticamente durante FS. En el caso del ayuno por C, hay un periodo posterior al agotamiento de la glucosa en donde la célula metaboliza acetato, el cual es un producto secundario del metabolismo. Durante este periodo, el metabolismo es bajo y la oxidación de las proteínas disminuye manteniéndose así hasta que los acetatos se agotan. Posteriormente, los niveles de oxidación vuelven a incrementarse manteniéndose así aproximadamente 14 horas. En contraste con lo descrito anteriormente, las células en ayuno de fosfato mantienen un metabolismo muy activo incluso en una FS prolongada (30 hrs.), la tasa respiratoria se mantiene en niveles altos, lo cual resulta contrastante con los bajos niveles oxidativos; es decir, la formación de grupos carbonilo en las proteínas es un evento poco frecuente. Los niveles oxidativos se mantienen casi

invariables durante las 35 horas en las cuales se monitoreo el cultivo (Ballesteros *et al.*, 2001). En otro estudio, se reporta que durante la entrada a FS en células crecidas en ayuno de P y C, la inducción de las defensas antioxidantes es distinta. Por ejemplo, durante el ayuno de C el principal daño oxidativo parece ser a nivel de proteínas, la incidencia de oxidaciones irreversibles es frecuente; la defensa oxidativa es regulada principalmente por el regulón *oxyR*. Se vió también que en este ayuno, hay una correlación estrecha entre la integridad de *rpoS* y la de *oxyR*, es decir, la inactivación de ambos conduce a un fallo en la respuesta antioxidativa disminuyendo drásticamente la viabilidad celular durante el ayuno de C. En células en ayuno de P se vió que los lípidos de membrana son los más sensibles al daño oxidativo generado por los peróxidos que se producen durante el ayuno de fosfato. Se probaron varias cepas mutantes para dilucidar el gen responsable de la respuesta antioxidativa durante este ayuno; se vió que, la doble mutante *ahpC katG* moría tan pronto era sometida al ayuno indicando entonces, que estos eran los principales genes de defensa antioxidante. A diferencia del ayuno de C, se vió que la supresión de *rpoS* y *oxyR* no mostraba efecto alguno sobre la viabilidad celular (Moreau *et al.*, 2001).

Estos estudios comparativos muestran las diferencias metabólicas en ambos casos, y dejan en claro que los programas genéticos durante cada tipo de ayuno son distintos y particulares. A continuación se detallará la regulación genética en cada caso.

3.2 Regulación genética previa al ayuno de fosfato

La fuente preferencial de fósforo en *E. coli* es el fosfato inorgánico (Pi). Para importar el Pi hacia el citoplasma, se usan sistemas transportadores como PitA y PitB que son dos transportadores de baja afinidad y Pst que es un transportador de alta afinidad. El transportador Pst es un complejo compuesto de una proteína periplásmica de unión a Pi llamada PstS, las proteínas integrales de membrana interna PstA y PstC y la proteína de unión a ATP llamada PstB. El sistema transportador Pst se encuentra asociado al sensor cinasa PhoR. Este sensor a su

vez, es parte del sistema regulatorio de dos componentes PhoR/PhoB, este último actúa como un activador transcripcional que regula la expresión de los genes relacionados con las concentraciones de fosfato (Natividad and Silhavy, 2003; Baek *et al.*, 2007).

Se desconoce con exactitud como PhoR percibe el transporte de Pi a través del sistema Pst. Cuando Pst transporta fácilmente el Pi al interior celular, PhoR actúa como fosfatasa sobre PhoB y lo desfosforila, de esta manera es incapaz de activar la transcripción del regulón Pho. Si las fuentes de Pi disponibles disminuyen, PhoR funciona como cinasa y fosforila a PhoB. Esta señal hace a la proteína transcripcionalmente activa para regular a Pho. Este grupo de genes está involucrado en el metabolismo de fuentes de fósforo diferentes al Pi. El sistema PhoR/PhoB es responsable de la respuesta general de estrés que permite adaptarse paulatinamente al ayuno; sin embargo, la inducción de Pho no es suficiente para asegurar la sobrevivencia celular por lo cual la célula entra en FS (Natividad and Silhavy, 2003; Baek *et al.*, 2007).

3.3 Regulación de *rpoS* (σ^S) en el ayuno de fosfato o de carbono.

Durante la FX la región 5' no traducida del mRNA de *rpoS* forma una estructura tipo horquilla que oculta el sitio de unión a ribosoma. De esta manera se previene el inicio de la traducción. Se ha demostrado que existen dos sRNAs (*small RNAs*) regulatorios, DsrA y RprA que regulan la traducción de este mensajero. Estos sRNAs se aparean con el extremo 5'UTR del mRNA lo cual propicia que el sitio de unión a ribosoma quede expuesto para que el mensajero pueda ser traducido. Se ha sugerido que, en respuesta a la limitación de fosfato otro sRNA interviene. Este se relaciona con el procesamiento del mRNA del operón *pstSCAB*. Este operón tiene un promotor único localizado río arriba de *pstS*, el mRNA se procesa entre los genes *pstA* y *pstB*. El sRNA resultante muestra complementariedad en su extremo 3' con la región líder 5' no traducida del mRNA *rpoS*. La interacción de estos dos RNAs promueve que la región 5' del mRNA *rpoS* se despliegue y exponga entonces el sitio de entrada de los ribosomas el cual durante FX se

encuentra parcialmente bloqueado. Esto conlleva entonces a un incremento en la traducción del mRNA y por tanto, un aumento en la cantidad de σ^S . Para la interacción sRNA-mRNA *rpoS* se requiere de la chaperona Hfq que promueve esta interacción (Schurdell *et al.*, 2007).

En el caso de ayuno de P se ha demostrado que, la estabilidad (vida media) de la proteína σ^S depende de la proteína IraP (Figura 4). El gen que codifica para esta proteína se localiza río arriba de *phoA* y *psiF*, los cuales se inducen en el ayuno de P (Bougdoor A. 2006). IraP se une a RssB (SprE) y bloquea su actividad inhibiendo así la degradación de σ^S por la proteasa ClpXP. RssB se une estequiométricamente 1:1 con σ^S y potencializa el reconocimiento de σ^S por la proteasa ClpP. σ^S por sí solo no es un buen sustrato para ClpXP. Después de la degradación RssB es reciclada (Pruneanu and Henge-Aronnis, 2002; Peterson *et al.*, 2005; Fredriksson *et al.*, 2007).

Se propone que IraP se une 1:1 con alta afinidad a RssB por lo cual, cantidades pequeñas de IraP serían suficientes para inactivar a RssB. Los sitios por donde interactúa esta proteína con σ^S y con IraP son aún desconocidos (Bougdoor *et al.*, 2006).

El ayuno de fosfato se percibe de la siguiente manera: el mRNA *iraP* se acumula en células en ayuno, lo que depende de ppGpp. SpoT es esencial para la inducción de *iraP* en respuesta al ayuno. Específicamente, la actividad hidrolasa de SpoT estimula el aumento en los niveles celulares de ppGpp; sin embargo, se desconoce como SpoT percibe el ayuno (Bougdoor *et al.*, 2006).

La transcripción de IraP es independiente de PhoR/PhoB y dependiente de ppGpp. Este nucleótido es necesario para la correcta inducción de los genes del regulón Pho (*phoA* y *pstS*). De manera indirecta ppGpp estimula el aumento de σ^S (Bougdoor A. 2007).

En diferentes condiciones de estrés así como en la disminución de nutrientes, σ^S y ppGpp tienen papeles regulatorios. ppGpp actúa como un factor global de transcripción que comunica las señales necesarias para expresar los genes de respuesta a estrés.

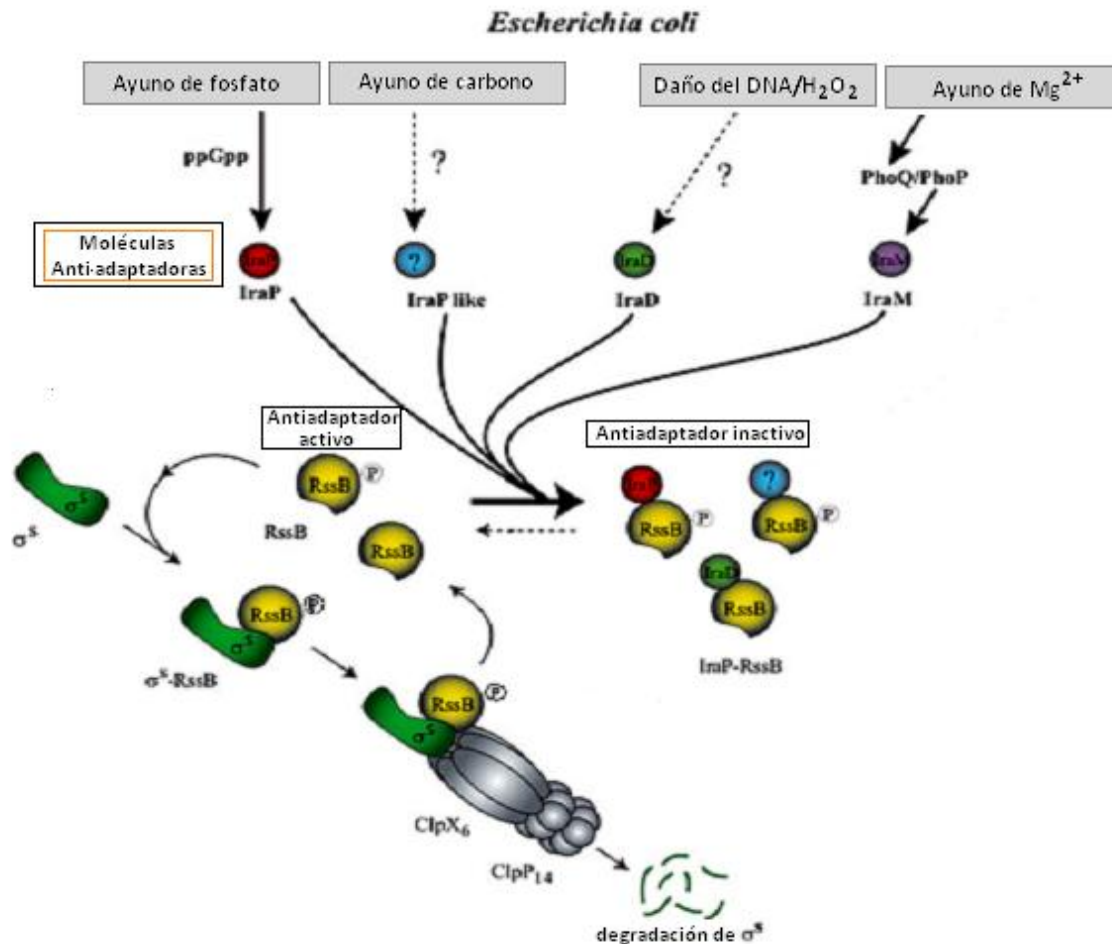


Figura 4. Modelo de regulación del recambio de σ^S a través de varias proteínas anti-adaptadoras. Durante FX RssB se une a σ^S facilitando su degradación vía ClpXP. Durante el ayuno de fosfato, IraP interactúa directamente con RssB bloqueando la degradación de σ^S , además se induce la acumulación de ppGpp el cual a su vez, activa la transcripción de *iraP*. Para el ayuno de carbono se propone la existencia de una molécula con un mecanismo de acción similar al de IraP (Modificado de Bougdour *et al.*, 2008).

En el ayuno de carbono se vio que principalmente, la estabilización de σ^S es a nivel de proteólisis. El tiempo de vida media de σ^S en FX es de ~1 minuto; al entrar en FS la proteína se estabiliza rápidamente. Durante la recuperación del crecimiento los niveles de σ^S disminuyen durante los primeros 3 minutos (Peterson

N.C.2004). Para la estabilización de σ^S intervienen la proteasa ClpXP y la proteína adaptadora RssB (Pruneanu and Henge-Aronnis,2002; Peterson *et al.*, 2005; Fredriksson *et al.*, 2007).

Se especulaba que la fosforilación de RssB era el factor importante en la estabilización de σ^S durante la entrada a FS por ayuno de C. Ya que RssB posee un residuo de ácido aspártico conservado en el extremo amino, se creía que éste era el sitio crucial en la transducción de señales, además era el único sitio de fosforilación. El modelo propuesto era que si los nutrimentos eran abundantes, RssB se fosforilaba pero si se desfosforilaba, entonces se transducían las señales de ayuno. No obstante, utilizando una mutante RssB en el sitio de fosforilación se vió que lo único que se modificaba eran los niveles basales de σ^S durante FX; sin embargo, en FS los niveles de σ^S seguían el patrón normal de acumulación. Por lo tanto, la estabilización de σ^S durante FS es independiente del estado de fosforilación de RssB (Peterson *et al.*, 2005).

Dentro de las alternativas que tratan de dilucidar el mecanismo de acumulación de σ^S durante FS se propone a RssB como el factor limitante en la reacción de proteólisis y a las proteínas aberrantes.

Considerando el primer caso, los niveles de RssB son bajos y las cantidades intracelulares de ClpXP son siempre constantes, por lo que el aumento de σ^S durante la entrada en FS induciría la titulación de RssB permitiendo entonces la respuesta general de estrés (Pruteanu and Henge-Aronnis, 2002). Durante FS disminuyen los procesos traduccionales, hay menos tRNAs cargados y muchos de los ribosomas se dimerizan. Además, disminuye la fidelidad traduccional, lo cual induce que la cantidad de proteínas aberrantes aumente (proteínas mal plegadas, truncas, etc).

Esta disminución en la fidelidad traduccional es el evento clave que conduce a la estabilización de σ^S . Se propone que la acumulación de proteínas aberrantes

titulan a la proteasa ClpXP, específicamente a ClpP. Aparentemente, las proteínas aberrantes son más efectivas para poder llevar a cabo la titulación de la proteasa. Se desconoce si hay proteínas aberrantes específicas que sirvan como sensores para secuestrar a la proteasa o si es una respuesta general e inespecífica dirigida por las proteínas aberrantes. El secuestro por titulación concuerda con que las cantidades de ClpXP son invariables en la célula por lo cual ClpP se convierte en un factor limitante. Posiblemente estas propuestas se complementen de modo secuencial, en donde la acumulación de σ^S se favorezca primero con la titulación de la proteasa ClpP seguido del secuestro de RssB (Fredriksson *et al.*, 2007). Para este ayuno, se propone también la existencia de una proteína anti-adaptadora “Ira like”, la cual intervendría en la degradación de σ^S secuestrando también a RssB para así evitar la degradación de σ^S mediada por ClpXP (Bougdour *et al.*, 2008).

4. El regulón *rpoH* (σ^{32}) y su relación con la fase estacionaria

La aparición de agregados proteicos, proteínas mal plegadas debido a errores traduccionales así como proteínas oxidadas, aumenta durante la FS. En esta etapa, la casi nula disponibilidad de nutrientes así como el estrés oxidativo generan proteínas aberrantes. Los microorganismos requieren de proteínas llamadas “chaperonas” que resguardan la integridad de su maquinaria proteica tanto para mantenerla funcional como para evitar errores en el plegamiento. Este conjunto de proteínas se encuentra bajo control del factor σ^{32} ; de igual manera éste regula la expresión de proteasas, las cuales son necesarias para disminuir el número de agregados proteicos así como para el reciclaje de proteínas. Es así como este sistema de chaperonas y proteasas funciona monitoreando y manteniendo el control de calidad en las proteínas. Las principales chaperonas celulares bajo el control de σ^{32} son: DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES, HtpG e IbpA-IbpB, mientras que las principales proteasas son: ClpX, ClpP, HslU, HslV, Lon y FtsH (Tomoyasu *et al.*, 2001)

Se sabe que la entrada a FS induce la expresión del regulón *rpoH*. En medio mínimo, la expresión de las chaperonas DnaK y ClpB dependen de RpoS (Dong and Schellhorn, 2009). El ayuno de carbono induce la expresión de 30 proteínas entre las cuales, 11 pertenecen a proteínas de estrés calórico reguladas por RpoH (σ^{32}) (Jenkins *et al.*, 1991). La inducción de estas proteínas podría estar vinculada a la producción de proteínas oxidadas debido a la disminución en la fidelidad traduccional. Esto pudo corroborarse utilizando una mutante sobreproductora de enzimas para defensa contra radicales libres. Se vió que la sobre-expresión de la super óxido dismutasa (SodA) disminuía la expresión del regulón *rpoH* durante la entrada a FS (Dukan and Nyström, 1998). Las proteínas aberrantes son un blanco de los radicales libres como el oxígeno y además, son una fuente endógena de estrés oxidativo, por lo cual se induce la expresión del regulón *rpoH*. Esto pudo comprobarse experimentalmente utilizando una cepa mutante que poseía una maquinaria traduccional modificada, es decir sus ribosomas tenían la particularidad de avanzar lentamente sobre el mRNA, lo que favorecía la disminución de errores traduccionales resultando en menos proteínas aberrantes que sirvieran como blanco oxidativo. Se ha visto que la inducción de este regulón no solo se relaciona con las proteínas mal plegadas, además deben de estar carboniladas, es decir, mostrar una marca de oxidación irreversible. Se desconoce el funcionamiento metabólico de este marcaje de proteínas (Ballesteros *et al.*, 2001; Díaz-Acosta and Membrillo-Hernández, 2006).

Se ha reportado que durante FS la chaperona DnaK sufre daños oxidativos que la desactivan y esto sirve como señal para incrementar la expresión del regulón *rpoH* (Fredriksson *et al.*, 2007). Se ha visto también que DnaK tiene un papel importante para la reactivación de algunas proteínas, por ejemplo, Girasa. Se reportó que posterior a un estrés calórico, la reactivación de Girasa depende del complejo de bichaperonas DnaK-ClpB (Lara-Ortíz *et al.*, 2011 manuscrito en preparación) . En otro estudio se encontró que, durante un estrés oxidativo, DnaK tiene un papel protector sobre varias proteínas, entre ellas AdhE (etanol oxidoreductasa) la cual

funciona durante aerobiosis evitando que esta proteína sufra daño oxidativo (Echave *et al.*, 2002).

Por lo tanto, al parecer, DnaK tiene un papel más importante que solo plegar correctamente a las proteínas y ensamblar o desensamblar complejos protéicos.

ANTECEDENTES

En un trabajo previo del laboratorio se estudiaron los cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA (SE) en células en estrés nutricional, así como en el periodo de recuperación del crecimiento al añadirse nuevamente nutrientes al medio. Las células se cultivaron en medio rico LB para estudiar la regulación del SE durante este estrés nutricional. Para ello se determinó el nivel de SE y la expresión de los genes *gyr* durante la fase exponencial de crecimiento (FX), en la fase estacionaria (FS) y en el periodo de recuperación. En este trabajo también se analizó el papel del regulador transcripcional *rpoS* (σ^S o σ^{28}) en el comportamiento de los cambios en el SE en esas condiciones (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Las cepas que se utilizaron en estos estudios fueron: MC4100 *relA1* y MC4100 *relA1 rpoS::Tn10*.

Para estudiar la actividad de Girasa se utilizó el plásmido reportero pMS01, teóricamente, la enzima tendría el mismo comportamiento con el plásmido que con el DNA cromosomal. Los resultados mostraron que el nivel de SE del plásmido reportero iba decreciendo conforme las células entraban en FS. Para evaluar como se recuperaba el SE, los cultivos se diluyeron en medio fresco y se observó que después de 1-3 minutos, los plásmidos presentaban un nivel de SE similar al observado en células en FX. Esta rápida recuperación del SE no fue impedida por la adición de inhibidores de la transcripción (rifampicina) o de la traducción (cloramfenicol). Sin embargo, esta recuperación sí se inhibió al utilizar un inhibidor de Girasa (novobiocina). Por lo tanto, estos resultados sugieren que Girasa recupera su actividad tan pronto como haya nutrientes disponibles (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). La transcripción de los genes *gyr* -como se esperaba- se incrementó al ingresar las células a la FS mientras que la cantidad de las proteínas GyrA y GyrB en células en FX o en FS fue similar. Los niveles transcripcionales de los genes *gyr* se estudiaron utilizando las fusiones cromosomales $\lambda\phi(\textit{gyrA-lacZ})$ y $\lambda\phi(\textit{gyrB-lacZ})$ y la cantidad de las proteínas GyrA y GyrB en FS y FX se cuantificó con experimentos tipo Western.

Los resultados mostraron que durante el periodo de recuperación, el nivel de la transcripción de los genes *gyr* se mantuvo bajo y su aumento sucedió hasta después de una hora. El retardo en el incremento transcripcional de los genes *gyr* durante la recuperación celular probablemente se debe al rápido incremento de la proteína Fis, la cual actúa como regulador negativo sobre la transcripción de los genes *gyr* (Travers *et al.*, 2001). Esta proteína regula positiva o negativamente un gran número de genes y se incrementa de manera rápida después de añadir medio fresco a un cultivo en FS. Fis disminuye cuando las células inician el crecimiento exponencial.

Con respecto a las células *rpoS*⁻, se vió que la capacidad para recuperar el SE después de la dilución del cultivo en FS, no es total bajo las mismas condiciones de estudio de la cepa silvestre. La cepa mutante mostró una distribución bimodal de los topoisómeros del plásmido a las 18 h de FS, lo que fue más evidente a las 72h. La recuperación del SE en la cepa silvestre fue total a los diez minutos mientras que en la mutante en ayuno de 18 h fue parcial aún después de 30 minutos. En ayuno de 72h no se vió recuperación del SE (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). De la misma manera, la viabilidad celular (UFC/ml) en las células *rpoS* en FS, disminuyó de 7.0×10^9 (inicio de la FS) a 1.0×10^9 (FS de 72 hrs.). Esto sugiere que posiblemente la distribución bimodal observada en las células en FS esté relacionada con la presencia en el cultivo de una fracción de células muertas (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Estos resultados muestran que las células en FS en medio rico disminuyen su nivel de SE y lo recuperan rápidamente al añadir medio nuevo. Esta recuperación no requiere de transcripción o traducción *de novo* lo que muestra que la Girasa presente en las células de FS es la responsable de recuperar el SE. Por otra parte, se observó que la transcripción de los genes *gyr* aumenta al llegar a FS y que la cantidad de Girasa en la FS es similar a las de la FX. En el periodo de recuperación, la transcripción de *gyr* se reinicia una hora después de añadir nutrimentos.

En resumen, el modelo de regulación del SE en medio rico propone la protección de Girasa durante FS y una rápida reactivación de ésta al añadir nutrientes. La topología del DNA durante la primera hora de recuperación se regula exclusivamente con la Girasa de FS. Es posible que algunos genes regulados por RpoS estén implicados en la protección de Girasa.

JUSTIFICACIÓN

La fase estacionaria de la cual se tienen más datos, es la de cultivos en medio rico (Ramírez *et al.*, 2003, Nyström, 2004, Llorens *et al.*, 2010). Sin embargo, en los últimos 10 años cada vez hay más estudios sobre esta fase en células cultivadas en medios mínimos con baja concentración de carbono, nitrógeno o fosfato. Estos estudios muestran que la fisiología de estas células es diferente y que aunque se incrementa la expresión de un conjunto común de genes, también se incrementa la expresión de genes específicos para cada ayuno. RpoS regula la expresión de varios de los genes importantes en estos ayunos (Ballesteros *et al.*, 2001, Mandel and Silhavy, 2005, Dong and Schellhorn, 2009).

HIPÓTESIS

Dado que Girasa es una enzima muy importante para que se lleven a cabo los procesos metabólicos del DNA como la replicación y la transcripción, se reactivará rápidamente en la salida de la fase estacionaria, independientemente del tipo de ayuno nutrimental previo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar si la regulación del SE del DNA y de Girasa en *Escherichia coli* silvestre y en una mutante *rpoS* en ayuno de carbono o de fosfato es similar a lo descrito para las células en medio rico.

Objetivos particulares

Analizar la distribución de los topoisómeros de un plásmido reportero (pMS01) en condiciones de estrés nutricional de carbono o de fosfato en fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y recuperación del crecimiento.

Estudiar si la recuperación del superenrollamiento en ayuno de carbono o de fosfato es mediada por la Girasa presente en las células de fase estacionaria, o si se requiere su síntesis *de novo*.

Analizar el nivel de superenrollamiento del DNA en una mutante *rpoS* en ayuno de carbono o de fosfato en fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y periodo de recuperación.

Determinar si la forma alélica de *rpoS* influye en la recuperación del superenrollamiento en medio rico.

Evaluar si en medio rico la síntesis del nucleótido ppGpp, dependiente de la enzima RelA, es importante para la recuperación del superenrollamiento .

Estudiar el posible rol protector de las chaperonas celulares sobre Girasa durante la fase estacionaria en células en medio rico.

Determinar si la rápida recuperación del superenrollamiento en medio rico depende del polifosfato, un compuesto de reserva que se acumula en células en fase estacionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de trabajo

Cepa	Genotipo	Fenotipo
MC4100	Δ (<i>argF-Lac</i>)295 <i>araD</i> 139 <i>rpsL</i> 150 <i>thiA</i> 1 <i>relA</i> 1 <i>flb</i> 5301 <i>deoC ptsF</i> 25 <i>rbsR</i>	Lac ⁻ , Ara ⁻ , Sm ^R , Thi
LG4101	MC4100 pero <i>relA</i> ⁺ <i>fuc</i> 3072::Tn10	MC4100 pero RelA ⁺ Tc ^R
11387 (JW5437-1)	Δ <i>rpoS</i> 766::Kan	Lac ⁻ , Kn ^R .
AG01	LG4101 pero <i>rpoS</i> 766::kan	RelA ⁺ , Kn ^R .
BB7222	MC4100 pero <i>araD</i> ⁺	MC4100 pero AraD ⁺
BB7224	BB7222 Δ <i>rpo H</i>	BB7222 ts
BW25113	<i>rrbB</i> 3 Δ <i>lacZ</i> 4784 <i>hsdR</i> 514 Δ (<i>ara</i> BAD)567 Δ (<i>rha</i> BAD)568 <i>rph</i> 1	Lac ⁻ , Ara ⁻
AG02	BW25113 pero Δ <i>p</i> pk	PPK ⁻ , Kn ^R .
AG03	BW25113 pero Δ <i>p</i> px	PPX ⁻ , Kn ^R .

*ts = Temperatura sensible

Todos los experimentos se realizaron a 37°C, tomando siempre inóculos a partir de cepas conservadas a -70°C en glicerol al 20%.

Medios de cultivo y soluciones

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave de 20-30 min a 110° C y 115 libras de presión.

- Medio Luria-Bertani

Extracto de levadura (Difco)	5 g/L
Triptona (Difco)	10 g/L
NaCl (Baker)	10 g/L
Timina	20 µg/ml
Aforar a 1 litro	

Para el medio sólido, agregar 2% de Bacto agar (Difco).

- Base de sales para el medio mínimo M9 (10X) .

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Aforar a 100 mililitros.	

- Base de sales para el medio mínimo M9 (10X) para el ayuno de fosfato.

Na ₂ HPO ₄	11.78 mg
KH ₂ PO ₄	4.89 mg
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Aforar a 100 mililitros.	

- Medio mínimo M9

Base de sales M9 (10X)	10 ml
MgSO ₄	100 µl
Tiamina al 1%	10 µl
CaCl ₂ 1M	10 µl
Aforar a 100 mililitros	

Para el medio mínimo con carbono normal (0.4% glucosa) así como fosfato normal (KH₂PO₄ 22.04 mM y Na₂HPO₄ 42.26 mM) y bajo fosfato (KH₂PO₄ 36 µM y Na₂HPO₄ 83 µM), se adicionan 2 ml de glucosa al 20% y se afora a 100 ml.

Para el medio mínimo de ayuno de carbono (0.05% glucosa), se adicionan 250 µl de glucosa al 20% y se afora a 100 ml.

De acuerdo a lo reportado, en los experimentos de ayuno de carbono se disminuyó 20 veces la cantidad de glucosa mientras que en el ayuno de fosfato, se disminuyó 50.9 veces el Na₂HPO₄ y 612.2 veces el KH₂ PO₄.

- Medio de dilución

Sulfato de magnesio 10 mM

- TSS 2X

NaCl (Baker)	1%
Tryptona (Difco)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0.5%
MgCl ₂ (Merck)	50 mM
Polietilenglicol, PEG,8000 (Sigma)	20%
Dimetil sulfóxido, DMSO (Merck)	10%
Ajustar pH a 5.5	

- Solución amortiguadora TBE (tris-boratos-EDTA)

Trizma	90 mM
Ácido Bórico	90 mM
EDTA	10 mM
Ajustar pH a 8.19 ± 0.1	

- RNAsa

Preparar primero una solución amortiguadora Acetato-EDTA de la siguiente forma:

Acetato de sodio (Baker)	0.1 M
EDTA	3.3x10 ⁻⁵ M
Ajustar pH a 5.5	

Posteriormente, preparar la RNAsa (10 mg/ml) utilizando como disolvente la solución amortiguadora Acetato-EDTA. Hervir 10 min. a 80° C y distribuir la solución en tubos (1ml/tubo). Conservar en refrigeración a -20°C.

Reactivos para lisis alcalina

- Solución I

Dextrosa (Baker)	50 mM
EDTA (Etilen-diamin-tetracetato de sodio)	10 mM
Tris (Sigma)	25 mM
Lisozima (Sigma) añadir en fresco	*

*Para la lisis alcalina de células en FS en medio rico LB, la cantidad de lisozima que se utilizó fue de 0.005 g/ml, mientras que para células en M9 se utilizaron 0.010g/ml.

- Solución II

SDS (Dodecil sulfato de sodio)	10%
NaOH	1.0 N
Agua según volumen total de solución	

- Solución III

Acetato de potasio (Baker)	3 M
Ácido acético glacial (Baker)	11.5 ml
pH	5.6

- Colorante para DNA (6X)

EDTA	1 mM
Azul de bromofenol	0.25%
Xilen cianol	0.25%
Glicerol	30%

- Cloroquina

Cloroquina (Sigma)

1mg/ml

Antibióticos

Todos los antibióticos utilizados se disolvieron en agua y se esterilizaron por filtración utilizando una membrana Millipore de 0.45 μ m.

Rifampicina fue el único antibiótico disuelto en metanol, no se esterilizó.

Antibiótico	Solución concentrada
Ampicilina	50 mg/ml
Carbecín	25 mg/ml
Cloramfenicol	10 mg/ml

Novobiocina	25 mg/ml
Rifampicina	100 mg/ml
Kanamicina	20 mg/ml

Curvas de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento de la cepa LG4101/pMS01 se realizaron en medio mínimo de la siguiente manera:

Se inocularon 3 ml de M9-0.4% glucosa a partir de un cultivo conservado en glicerol a -70°C. Se le adicionó carbecín (300 µg/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37°C en agitación (180 r.p.m).

Se tomaron 600 µl de este inóculo y se diluían en 12 ml de medio fresco (glucosa al 4% o glucosa al 0.05%). Estos cultivos se incubaron en matraces nefelométricos de 125 ml a 37°C en agitación.

A partir de la incubación, se tomaron lecturas cada treinta minutos, el crecimiento bacteriano se midió con respecto al aumento en unidades de absorbancia lo cual es proporcional a la densidad celular del cultivo. Las lecturas se hicieron a una DO (densidad óptica) con una longitud de onda de 550nm. Se utilizó un espectrofotómetro de la marca Milton Roy Spectronic.

Obtención por transducción con P1 de la cepa AG01 $\Delta rpoS766::kan$

- a) Propagación del fago P1 *virA* en la cepa 11387 ($\Delta rpoS766::kan$).

La cepa de trabajo previamente se sembró en medio rico (LB) y se incubó toda la noche a 37°C en agitación.

De este cultivo se tomó una alícuota de 200 µl y se diluyó en 10 ml de caldo LB. Se incubó en un matraz nefelométrico a 37°C en agitación y el cultivo se monitoreó cada 30 minutos hasta una DO_{550nm} de 0.35-0.4.

Posteriormente, a este cultivo se le adicionó $CaCl_2$ a una concentración final de 5mM y se incubó 10 minutos a 37°C en agitación.

De esta mezcla se tomaron 4 muestras de 1 ml. Estas se infectaron con el fago P1 vir. Las muestras se incubaron 20 minutos a 37°C en una estufa bacteriológica.

Después de la incubación, las muestras infectadas y el control se mezclaron con agar fundido (LB+ calcio) y se vaciaron en placas de agar LB+calcio. Se incubaron a 37°C de 12 a 14h.

Posteriormente, la capa de crecimiento bacteriano en donde se observaron placas líficas se desprendió utilizando una varilla de vidrio acodada y el contenido se

colocó en tubos eppendorf. A cada muestra se le agregaron 50 μ l de caldo LB y 20 μ l de cloroformo.

Las muestras se centrifugaron a 10,000 r.p.m durante 15 minutos. La totalidad del sobrenadante se recolectó en un tubo eppendorf y se le agregaron 20 μ l de cloroformo. Finalmente, la muestra se etiquetó y se almacenó a 4°C.

b) Titulación del fago P1 *virA*.

La cepa de trabajo LG4101 se sembró previamente en medio LB y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. A partir de este cultivo se inocularon 100 μ l en 10 ml de caldo LB. El cultivo se dejó en agitación a 37°C hasta que alcanzara una DO_{550nm} de 0.35-0.4.

EL cultivo se concentró por centrifugación 10 minutos a 8,000 r.p.m (centrífuga M1812, Jovan). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de Triptona estéril al 1%.

A 4 tubos eppendorf se les agregó 100 μ l de la cepa bacteriana concentrada y 100 μ l de una solución de $CaCl_2$ (0.015 M) y $MgSO_4$ (0.030 M), se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, a los tubos (excepto el control) se les adicionó 100 μ l del fago propagado en la cepa 11387 (*rpoS* :: kan) en diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Estas mezclas se incubaron 20 minutos a 37°C en una estufa bacteriológica.

Posteriormente, cada una de las mezclas se añadieron en agar fundido Luria-calcio y éstas a su vez se vaciaron en placas de agar sólido Luria-calcio. Se incubaron 12-14 h a 37°C en una estufa bacteriológica. Al día siguiente, se realizó el conteo de placas líticas para obtener el título del fago P1 *virA*.

c) Transducción con P1 *virA* en *Escherichia coli* LG4101.

La cepa LG4101 se sembró previamente en medio LB y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. A partir de este cultivo se inocularon 100 μ l en 10 ml de caldo LB. El cultivo se dejó en agitación a 37°C hasta que alcanzara una DO_{550nm} de 0.35-0.4.

El cultivo se concentró por centrifugación 10 minutos a 8,000 r.p.m, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de Triptona al 1% estéril.

Se adicionaron 500 μ l de la cepa bacteriana concentrada y 500 μ l de una solución de $CaCl_2$ (0.015 M) y $MgSO_4$ (0.030 M). Se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 500 μ l del fago P1 (5×10^{-7} UFP/ml). Las muestras se incubaron 20 minutos a 37° en una estufa bacteriológica.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron 2 min a 5,000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en MD. Este paso se repite dos veces.

Las pastillas resuspendidas se sembraron por espatulado en el medio LB-kanamicina (40 µg/ml). Se incubó 24-48 h a 37°C en estufa bacteriológica.

Al día siguiente se seleccionaron las colonias transductantes y se conservaron en glicerol a -70°C.

Preparación de células competentes y transformación de *Escherichia coli* (Chung *et al.*, 1989).

La cepa transductante LG4101 (*rpoS766:: Kan*) previamente se sembró en medio LB y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. A partir de este cultivo se tomó un inóculo de 200 µl y se sembró en un matraz nefelométrico con 10ml de medio rico LB. El cultivo se dejó en agitación a 37°C hasta que alcanzara una DO_{550nm} de 0.35-0.4. De este cultivo se tomaron 200 µl y se mezclaron con 200 µl de TSS 2X frío.

Esta mezcla se repartió en cuatro tubos eppendorf en alícuotas de 100 µl y se adicionó DNA plasmídico de la cepa LG4101/pMS01. Para la purificación del DNA, se utilizó el Kit QIAGEN .

Las muestras se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se les dio un choque térmico a 43°C durante 5 minutos y finalmente, se volvieron a colocar en hielo durante 5 minutos. A estas muestras se les adicionó 900 µl de medio LB y se incubaron durante 1 hr. a 37°C en agitación.

Todas las muestras se sembraron por espatulado en medio LB-ampicilina (200 µg/ml). Se incubaron a 37°C por 12-14 h en estufa bacteriológica. Al día siguiente se seleccionaron las colonias transformantes y se resembraron en medio LB-kanamicina (40 µg/ml). Esto se hizo con el fin de asegurar la presencia de células con el fenotipo kan^R dado por la interrupción del gen *rpoS* con el casete de resistencia a kanamicina.

Método de lisis alcalina para purificación de DNA del plásmido pequeño multicopia pMS01 (Maniatis *et al.*, 1982) .

a) Visualización en mini-geles de agarosa.

La cepa LG4101/pMS01 se sembró en 3 ml de medio LB y se le agregó carbecín (300 µg/ml). Se incubó toda la noche a 37°C en agitación. El cultivo se concentró 2 veces por centrifugación, se descartó el sobrenadante. La pastilla celular resultante se resuspendió en 100 µl de solución I y se le adicionaron 15 µl de RNAsa (10 mg/ml). Se incubó en hielo-agua durante 5min. El tubo eppendorf debe

mantenerse abierto durante este tiempo para permitir que se lleve a cabo la reacción.

Se adicionaron 200 μ l de solución II y la mezcla se agitó vigorosamente. Se incubó 5 min en hielo. Se adicionaron 150 μ l de solución III y se mezcló por inversión. Se incubó 5 min en hielo. Posteriormente la muestra se centrifugó a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se recuperó y se mezcló con un volumen igual de alcohol absoluto (aproximadamente 450 μ l). La muestra se dejó durante 24 h a -20°C.

Al día siguiente la muestra se centrifugó a 4°C durante 15 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 1ml de etanol al 70%. La muestra se centrifugó a 4°C durante 15 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó 2 h a 37°C para deshidratar completamente la muestra.

Finalmente, la muestra se rehidrató con 15 μ l de agua y se le adicionaron 5 μ l de colorante guía para DNA 6X.

b) Obtención de la distribución de topoisómeros del plásmido.

La metodología empleada fue semejante a la utilizada en la lisis alcalina, excepto por los volúmenes utilizados de solución I, solución II y solución III para el procesamiento de las muestras. Los tiempos de incubación en todos los casos fueron de 10 min. Únicamente se utilizó alcohol absoluto para precipitar las muestras.

Método de purificación de DNA utilizando el kit QIAGEN (Qiagen Inc., Chatsworth, CA)

La purificación del DNA utilizando este kit sigue la metodología de lisis alcalina antes descrita, las excepciones para este caso fueron, la utilización de columnas de purificación así como el tratamiento térmico para las muestras.

Separación de moléculas de DNA por electroforesis en geles de agarosa

a) Separación en mini-geles de agarosa-TBE.

Disolver 1g de agarosa en 100ml de solución amortiguadora TBE. Esta agarosa fundida se vació sobre un vidrio de 7.5 cm x 6 cm y se dejó gelificar 25 minutos. Posteriormente el gel se pasó a una cámara de electroforesis con solución amortiguadora TBE para llevar a cabo la electroforesis durante 1h a 75V.

- b) Separación de los topoisómeros de un plásmido pequeño multicopia (pMS01) por electroforesis en geles de agarosa-TBE-cloroquina.

Se preparó un litro de solución amortiguadora TBE (tris-boratos-EDTA) al 1X con cloroquina (10 µg/ml) al 1%. De este volumen, se tomaron 80 ml para preparar un gel de agarosa al 1%. Con el volumen restante, se llenó la cámara de electroforesis. La agarosa fundida se vació en una charola de 15cm X 9cm y se dejó gelificar durante 25 minutos; posteriormente, el gel se pasó a la cámara de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo durante 22hrs a 25V.

Visualización y captura de las imágenes de las moléculas de DNA separadas por electroforesis en geles de agarosa.

- a) Mini-geles de agarosa.

Posterior a la electroforesis, se transfirió el gel a una solución de bromuro de etidio (2.5 µg/ml) durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavó el gel en agua durante 5 min para retirar el exceso de bromuro de etidio. Se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta para visualizar el DNA presente en el gel. La captura de imagen del gel se hizo utilizando el equipo Gel Logic 1500 (Imaging system).

- b) Geles de agarosa-TBE-cloroquina.

El gel de agarosa-cloroquina 1% se lavó con agua en agitación suave y constante durante cuatro horas. Cada hora se hizo cambio de agua. Se tiñió con bromuro de etidio (2.5 µg/ml) durante 10min. Posteriormente se lavó en agua durante 5min para retirar el exceso de bromuro de etidio.

Para visualizar los topoisómeros del plásmido monitor se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. La captura de la imagen se hizo utilizando dos diferentes equipos: Gel Logic 1500 (Imaging system) y BIO-RAD (Molecular Imager FX).

RESULTADOS

1. Superenrollamiento del DNA en células silvestres (*wt*) y mutantes *rpoS::kan* en Fase exponencial (FX), Fase estacionaria (FS) en ayuno de Carbono (C) o Fosfato (P), y en la recuperación del crecimiento.

Para estudiar la actividad de las DNA topoisomerasas, principalmente de la II o Girasa, se utilizó el plásmido reportero pMS01. El nivel de superenrollamiento del DNA (SE) de la cepa silvestre (*wt*) LG4100 *relA*⁺ se comparó con el de la cepa mutante AG01 (LG4100 *rpoS::kan*) en FX, FS de 72 horas y periodo de recuperación del crecimiento. El medio mínimo M9-MOPS se utilizó en el ayuno de P y C. Como amortiguador de pH se utilizó MOPS a una concentración de 40 mM el cual sirve para mantener el cultivo dentro del intervalo fisiológico de pH durante la FS.

Para visualizar la migración de los topoisómeros, se utilizaron geles de agarosa 1%-cloroquina 10 µg/ml y se separaron mediante electroforesis durante 22 horas a 25 V. En este sistema, los topoisómeros más superenrollados migran más rápido y por lo tanto se visualizan en la parte inferior del gel, mientras que los relajados migran más lento y se visualizan en la parte superior del gel.

Con el fin de dilucidar el mecanismo necesario para la recuperación del crecimiento posterior a la adición de medio fresco, se utilizaron distintos antibióticos antes y durante este periodo. Previamente a la recuperación del crecimiento, una alícuota del cultivo en FS (72 h) se incubó 10 minutos con el antibiótico correspondiente (cloramfenicol, rifampicina o novobiocina) y al término de este período, se adicionó medio fresco preincubado el cual contenía el mismo antibiótico. Posteriormente se incubó durante 15 minutos. Las células de FS tienen membranas menos permeables por lo que es necesario incubarlo previamente por 10 min con el antibiótico para que éste penetre e interaccione con su blanco.

El cloramfenicol (Cm) es un inhibidor de la traducción. Su mecanismo de acción se ejerce al unirse a la subunidad 50S del ribosoma. Este antibiótico bloquea a la enzima peptidil transferasa lo cual impide la formación de las uniones peptídicas, inhibiendo así la síntesis de proteínas. La rifampicina (Rlf) inhibe el inicio de la transcripción ya que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa e impide el despeje del promotor. La novobiocina (Nov) es un inhibidor de la enzima Girasa, se une a la subunidad GyrB e impide así el comienzo de un nuevo ciclo de introducción de supervueltas en el DNA. La dilución posterior de la alícuota con medio fresco adicionado del antibiótico asegura la inhibición de la transcripción, traducción o actividad de Girasa durante el periodo de recuperación.

En la Figura 1 se observa que durante el estrés nutricional de C, el SE disminuye. Es decir, los plásmidos se relajan durante la FS. La recuperación del SE en respuesta a la adición de nutrimentos se lleva a cabo tanto en células tipo silvestre (*wt*) (Fig. 1A y 1B) como en células *rpoS* (Fig. 1C y 1D). La tensión helicoidal del plásmido en este periodo es semejante a la tensión que hay durante la FX. La recuperación del SE es diferente a lo que se reportó para células en FS en medio rico en donde ésta es completa a los 30 segundos (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). En el caso de ayuno en medio mínimo, tanto en medio con 0.4% de glucosa (Fig. 1A) como en 0.05% (Fig. 1B), la recuperación del SE se observó 15 minutos posterior a la adición de nutrimentos.

Los resultados de la Figura 1 muestran que en ayuno de glucosa, la recuperación del SE en la cepa silvestre (*wt*) y en la *rpoS* posterior a la salida de la FS, no se ve afectada por rifampicina o por cloramfenicol, pero sí por novobiocina. Los resultados de la cepa silvestre en ayuno de carbono concuerdan con los resultados previamente reportados para el modelo de protección de Girasa durante FS en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Sin embargo, en las células *rpoS* en FS en medio mínimo-glucosa, el SE disminuye durante la FS y se incrementa al añadir nuevamente nutrimentos al cultivo en FS prolongada de 72h (Fig.1 C y D). Este resultado es diferente al reportado para células *rpoS* en FS en

medio rico en donde el incremento en el nivel de SE es parcial en un cultivo en FS de 18h y no se presenta en el cultivo de FS de 72h. En estas células en FS además, no se presenta una relajación homogénea de los topoisómeros del plásmido, sino que hay una distribución bimodal con topoisómeros SE y relajados (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Con respecto a las células tipo silvestre (*wt*) y *rpoS*, tanto en medio con P normal (Fig. 2A y 2C), como en bajo P (Fig. 2B y D), los resultados mostrados son similares a lo reportado para las células en ayuno de C (Fig. 1). En las células en ayuno de C (Fig. 1), como en ayuno de P (Fig. 2 Anexo), novobiocina impide la recuperación del SE.

Una diferencia cualitativa observada con respecto al SE del plásmido monitor en medio mínimo es que, a diferencia de medio rico, la compactación de las diferentes formas topológicas durante la fase exponencial no se visualiza de manera tan contrastante y clara como en medio rico. De igual manera, durante la FS el grado de relajación es menor que el observado en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Es probable que estas ligeras variaciones en la topología del plásmido, ya sea hacia el SE o a la relajación, estén asociadas a la composición del medio.

▪ **Ayuno de Carbono**

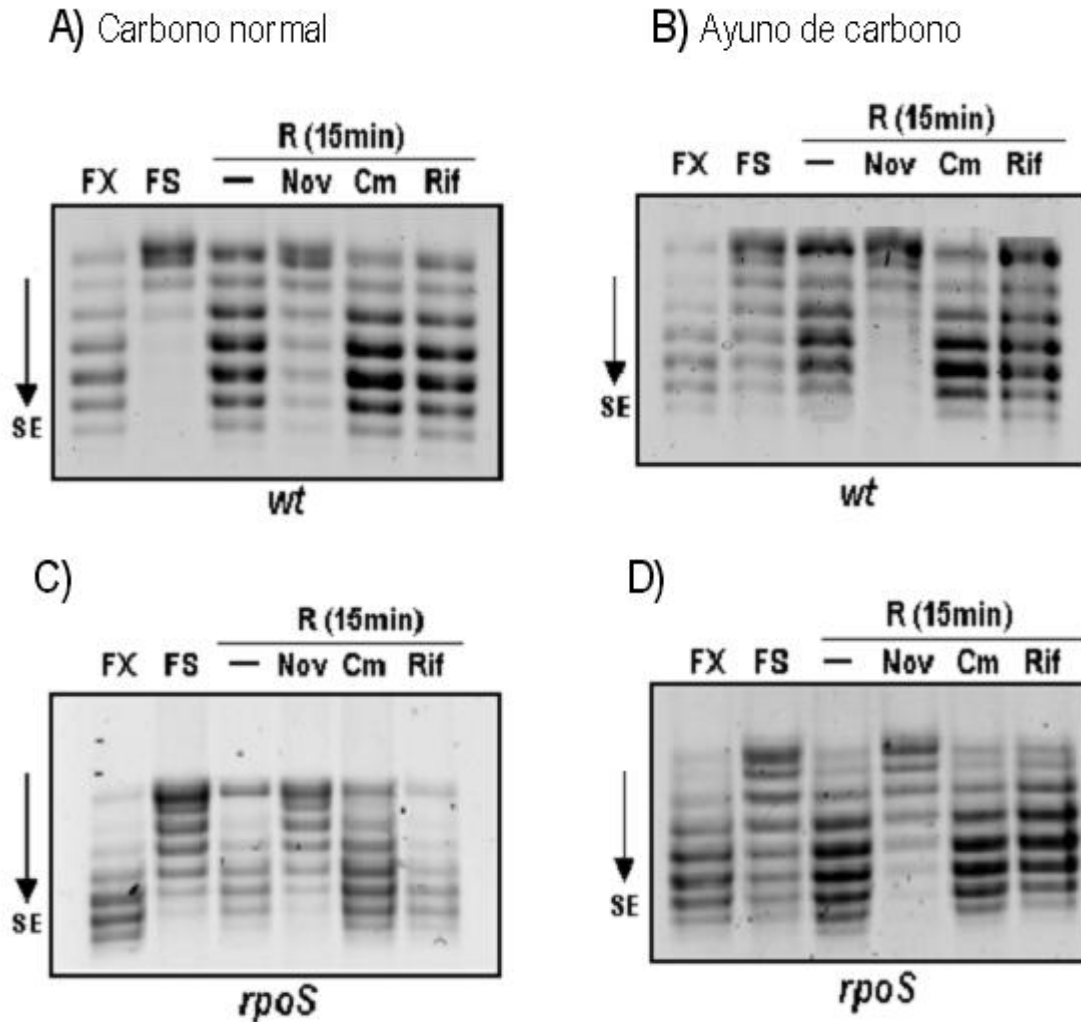


Figura 1. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa silvestre LG4100/pMS01 (*wt*) y en la cepa AG01/pMS01 (*rpoS::kan*). Las células se cultivaron en medio mínimo M9 (Material y Métodos) con diferentes concentraciones de glucosa. A) y C) Glucosa al 0.4%; B) y D) glucosa al 0.05%. Los topoisómeros se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloroquina durante 22h a 25V. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), Nov (novobiocina), Cm (cloramfenicol), Rif (rifampicina), SE (superenrollado).

- **Ayuno de Fosfato**

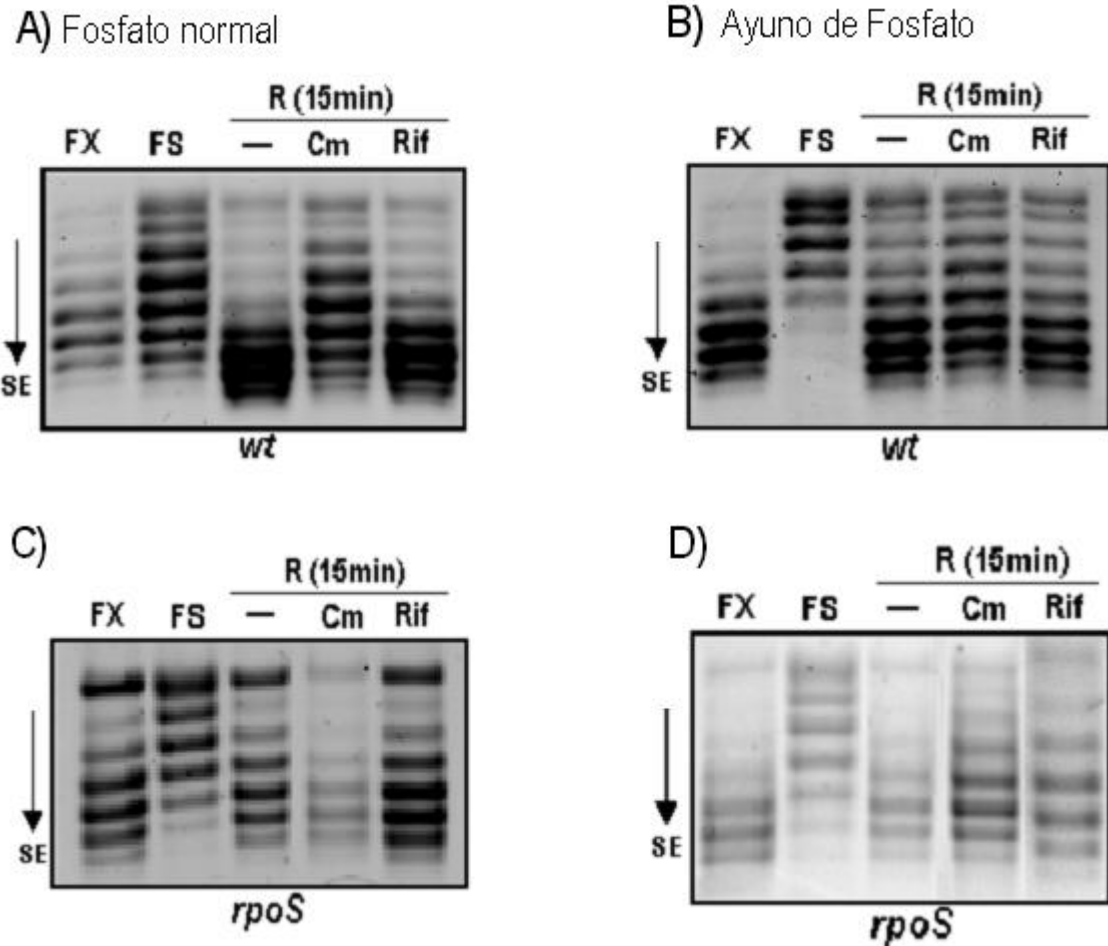


Figura 2. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa silvestre LG4100/pMS01 (*wt*) y en la cepa AG01/pMS01 (*rpoS::kan*). Las células se cultivaron en medio mínimo M9 (Material y Métodos) con glucosa al 0.4% con diferentes concentraciones de Fosfato. A) y C) KH_2PO_4 36 μM y Na_2HPO_4 83 μM ; B) y D) KH_2PO_4 22.04 mM y Na_2HPO_4 42.26mM. Los topoisómeros se separaron en un gel de agarosa al 1% como se describe en la Fig. 1. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), Cm (cloramfenicol), Rif (rifampicina), SE (superenrollado).

2. Recuperación del superenrollamiento del DNA en células silvestres y mutantes *relA1 rpoS::Tn10* y *relA⁺ rpoS::kan* en ayuno en medio rico (LB) al añadirse medio fresco al cultivo.

En un trabajo previo se reportó que en la mutante MC4100 *relA1 rpoS::Tn10* en FS prolongada de 72h en medio rico LB-MOPS, se observa una distribución bimodal de los topoisómeros del plásmido monitor; es decir, en una misma muestra hay una población de plásmidos en estado relajado y otra en estado superenrollado. Cuando a esta muestra de FS se le añadió medio fresco, no se modificó la distribución bimodal. En la cepa MC4100 *relA1* la recuperación del SE es completa y se presenta en los primeros 10 min posterior a la adición de nutrimentos (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003).

Para corroborar la relevancia del gen *relA*, así como para descartar la posibilidad de que el alelo del gen *rpoS* influya en el comportamiento reportado, se utilizó la cepa AGO1 (*relA⁺ rpoS::kan*) y se comparó con respecto a los resultados reportados para la cepa *relA1 rpoS Tn::10* (Contreras-Ferrat, 2003). Para este experimento, se empleó el medio rico LB-MOPS con la finalidad de tener resultados comparables con los reportados previamente.

En la Figura 3 se visualiza que la población de plásmidos se distribuye con el patrón bimodal reportado (Contreras-Ferrat G. 2003). Durante la FX el plásmido de la cepa *relA⁺ rpoS::kan* se encuentra en estado superenrollado similar a lo reportado para las células *rpoS::Tn10*. En FS de 24 y 72 horas se visualiza una pérdida en la homogeneidad de la tensión helicoidal en la población de plásmidos. Una fracción se mantiene superenrollada mientras que otra se relaja. En FS de 24h se observa que la recuperación del SE posterior a los 15 min de la adición de nutrimentos es parcial y la distribución de topoisómeros presenta un patrón bimodal. Algunos plásmidos quedan en un estado intermedio entre la forma más relajada y la superenrollada. Sin embargo, se observa que una fracción mayor de plásmidos recuperan la tensión helicoidal. Para la cepa en FS de 72h se visualiza

que el plásmido no recupera la tensión helicoidal aún después de los 15 minutos posteriores a la adición de nutrientes, lo cual corresponde con lo reportado con anterioridad en donde ni aún después de 60 minutos se visualiza recuperación del SE (Contreras-Ferrat , 2003).

En las condiciones experimentales estudiadas, la recuperación del superenrollamiento es independiente de la presencia o ausencia del gen *relA*. En células *relA+* (*relA+* *rpoS*::*kan*) como *relA-* (*relA1* *rpoS*::*Tn10*), la tensión helicoidal se recupera posterior a la adición de nutrientes en FS de 24h. Por lo tanto, este resultado concuerda con los resultados previos (Contreras-Ferrat, 2003).

En este trabajo se probaron dos alelos diferentes de este gen: *rpoS*::*Tn10* y *rpoS*::*kan* para confirmar su participación en la recuperación del SE en medio rico LB-MOPS y los resultados fueron reproducibles en ambos casos. En resumen, la recuperación del SE en medio rico sí depende del gen *rpoS* independientemente de su forma alélica, a diferencia de lo que sucede en células en medio mínimo, donde la recuperación es independiente de este gen (Figs 1 y 2).

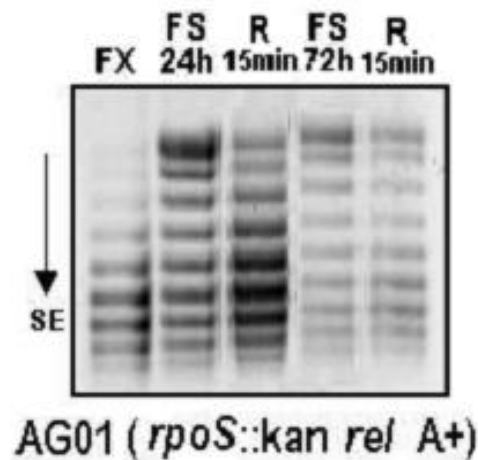


Figura 3. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa AG01(*rpoS*::*kan* *rel A+*) en células crecidas en medio rico LB-MOPS. Recuperación del superenrollamiento posterior a la adición de medio fresco a células en fase estacionaria de 24 y 72 horas. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), SE (superenrollado).

3. Papel de las chaperonas citoplasmáticas en la recuperación del superenrollamiento del DNA en células en ayuno en medio rico (LB) al añadirse medio fresco al cultivo.

Dado que el modelo de protección propuesto para Girasa durante una FS prolongada para permitir su rápida reactivación al reiniciarse el crecimiento celular (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003) parece ser válido para las células crecidas en ayuno de carbono y de fosfato, se estudió el posible papel protector de las chaperonas moleculares sobre Girasa durante el ayuno de FS. Hay reportes que indican que las proteínas de estrés calórico, en especial la chaperona DnaK, reactivan a Girasa durante un estrés calórico (Camacho-Carranza *et al.*, 1995, Ogata *et al.*, 1996). La reactivación de Girasa en el estrés calórico severo depende de la actividad del sistema de bichaperona DnaK-ClpB (Lara-Ortíz *et al.*, 2011 manuscrito en preparación), mientras que la chaperona DnaK tiene también un papel importante en la protección de AdhE durante el estrés oxidativo (Echave *et al.*, 2002).

Para corroborar esto, se utilizaron las cepas BB7222 (*wt*) y BB7224 ($\Delta rpoH$) transformadas con el plásmido monitor pMS01. La cepa $\Delta rpoH$ que se utilizó, carece de la mayoría de las chaperonas citosólicas como DnaK/DnaJ/GrpE, ClpB, IbpA, IbpB, excepto GroEL/GroES y tiene bajos niveles de proteasas. Esta cepa posee una mutación por inserción de una IS en la región reguladora de *groEL-groES* lo que le confiere una expresión constitutiva de los genes, que incrementa 4 veces la concentración de la chaperona GroE. Este incremento le permite a la cepa crecer entre 30-37⁰C (Tomoyasu *et al.*, 2001). Dado que el modelo de protección de Girasa se cumple tanto en medio rico LB-MOPS como en medio M9-MOPS, los experimentos para probar la hipótesis del papel protector de las chaperonas se realizaron en células en FS en medio rico.

Los resultados de la Figura 4 muestran que el plásmido de las células $\Delta rpoH$ tiene el mismo comportamiento tanto en la cepa silvestre (*wt*) como en la misma $\Delta rpoH$.

En ambos casos la tensión helicoidal durante la FX es alta, mientras que en la FS temprana (24h) y tardía (72h) hay una disminución en esta tensión helicoidal. Posterior a la adición medio fresco al cultivo en FS se observa un incremento de la tensión helicoidal en los primeros 10 min a un nivel similar al de las células en FX. Respecto a la disminución en la tensión helicoidal podemos decir que en estos experimentos este parámetro tuvo un comportamiento ligeramente variable sin embargo, los resultados fueron siempre reproducibles. Por lo tanto, las proteínas de estrés calórico dependientes de la expresión del factor transcripcional RpoH, no parecen funcionar como protectoras de Girasa, dado que su ausencia no influye sobre la recuperación del SE durante la recuperación del crecimiento. Sin embargo, no podemos descartar la posible participación de la chaperona GroEL/GroES en esta protección.

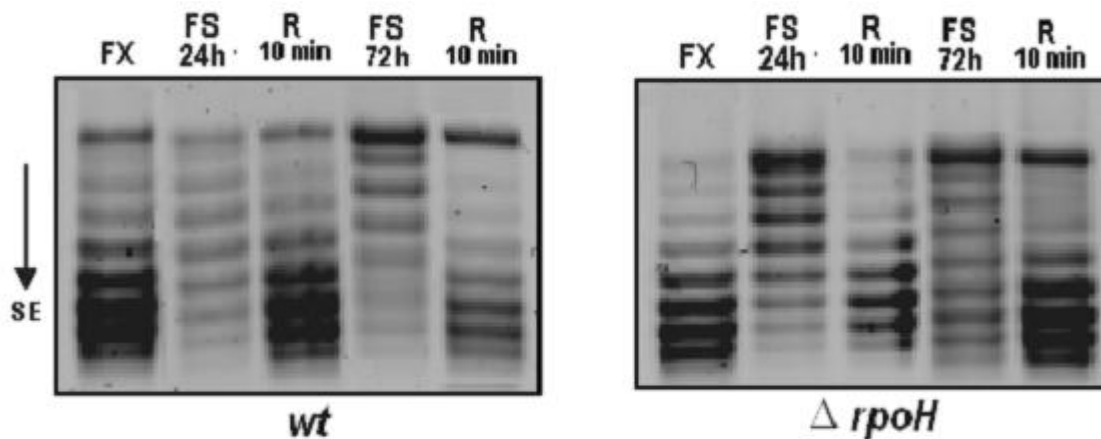


Figura 4. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en las cepas BB7222 (wt) y BB7224 ($\Delta rpoH$) en células crecidas en medio rico LB-MOPS. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), SE (Superenrollado)

4. Recuperación del superenrollamiento del DNA en células silvestres y mutantes *ppk::kan* y *ppx::kan* en ayuno en medio rico (LB) posterior a la adición de medio fresco al cultivo.

Una estrategia que forma parte de la adaptación de los microorganismos durante la entrada a FS, es la acumulación de compuestos de reserva como el polifosfato (poli-P). En *E.coli*, las principales enzimas involucradas en el metabolismo del poli-P son 2: PPK y PPX. PPK sintetiza poli-P y también cataliza la conversión reversible del fosfato γ del ATP a poli-P. PPX hidroliza y libera el fosfato terminal del polímero de poli-P (Kornberg *et al.*, 1999, Rao *et al.*, 2009).

Se ha reportado que el poli-P puede tener un papel importante como compuesto energético alternativo y se propone además que puede servir como un sustituto en reacciones de tipo cinasa con ADP, AMP, azúcares y proteínas. Se propone que el papel de poli-P como fuente energética sucede siempre y cuando éste se encuentre en altas cantidades con respecto al ATP celular. El tiempo propuesto del poli-P como fuente energética es de unos cuantos segundos (Kornberg *et al.*, 1999). En otro estudio se reporta que, si un cultivo en FS de 20hrs en medio rico con exceso de glucosa es utilizado como inóculo en medio fresco, la carga energética celular de adenilato ($ATP + \frac{1}{2} ADP / ATP + ADP + AMP$) tarda entre 15 y 20 minutos en alcanzar los valores originales del cultivo en FX (Chapman *et al.*, 1971). En un estudio previo del laboratorio se reportó que Girasa es la responsable del SE a la salida de FS, y que la recuperación del SE en medio rico (LB) en un cultivo en FS de 72h posterior a la adición de medio fresco es de 30 segundos (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Por lo tanto, se decidió corroborar el posible papel del poli-P como una fuente energética de rápida disposición en el ciclo de reacción de Girasa, por lo cual se utilizaron las cepas *ppk::kan* / pMS01 y *ppx::kan* / pMS01.

La mutante *ppk::kan / pMS01* es deficiente en la síntesis de poli-P, lo que afecta la regulación de la actividad de RpoS a nivel transcripcional, por ejemplo, en ausencia de Poli-P disminuyen los niveles de RpoS. Mientras que *ppx::kan / pMS01* es incapaz de degradar el polímero poli-P a la salida de FS.

Ya que se ha reportado que estas mutantes muestran una disminución en la sobrevivencia durante periodos largos (la muerte celular inicia posterior a las 48 horas), se decidió reducir el tiempo del cultivo en FS. Por lo tanto, en estos experimentos se trabajó con FS de 2 días (Kornberg *et al.*, 1999). Con respecto a los tiempos de recuperación, se sabe que el tiempo efectivo para que el poli-P funcione como energía está limitado a segundos, por lo cual se trabajó con algunos periodos de recuperación muy cortos (segundos).

Los resultados de la Figura 5 muestran que el plásmido de las células *ppk::kan/pMS01* muestra el mismo comportamiento que la cepa silvestre LG4101/*pMS01* (*wt*). En ambos casos la tensión helicoidal durante la FX es alta, mientras que en la FS (48h) hay una disminución en esta tensión helicoidal. Durante el periodo de recuperación se observa que el nivel de SE se recupera de manera gradual a partir de los primeros 5 segundos y se restaura completamente a los 30 segundos posteriores a la adición de medio fresco a un nivel similar al de las células en FX.

En la Figura 6 podemos ver que en el caso de la cepa *ppx::kan/pMS01*, los tiempos de recuperación son más largos, ya que la recuperación de la tensión helicoidal de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre (*wt*) se observa únicamente a partir de los treinta segundos mostrando una franca recuperación del SE al minuto posterior a la adición de medio fresco al cultivo de FS. Esto indica que la rápida recuperación del SE reportada en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003) es independiente de la presencia o ausencia de poli-P; sin embargo, con esto no se puede descartar el papel de otras ATPasas.

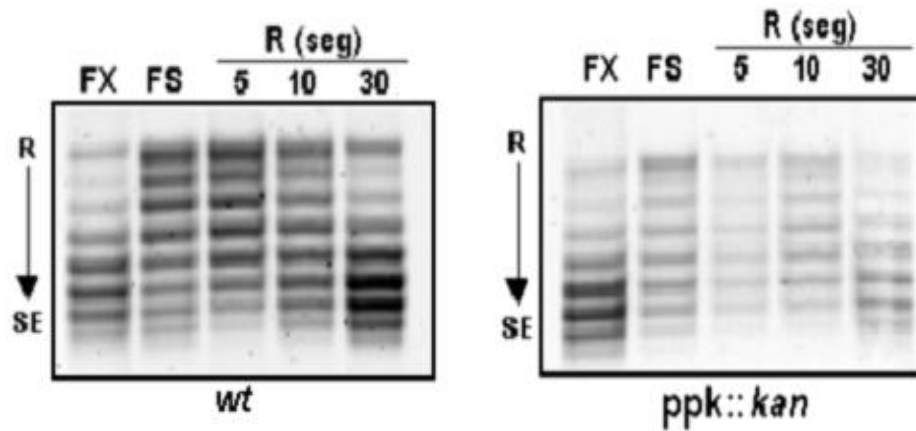


Figura 5. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa *ppk::kan/ pMS01* en células crecidas en medio rico LB-MOPS. Recuperación del superenrollamiento posterior a la adición de medio fresco a células en fase estacionaria de 48 horas. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), SE (superenrollado).

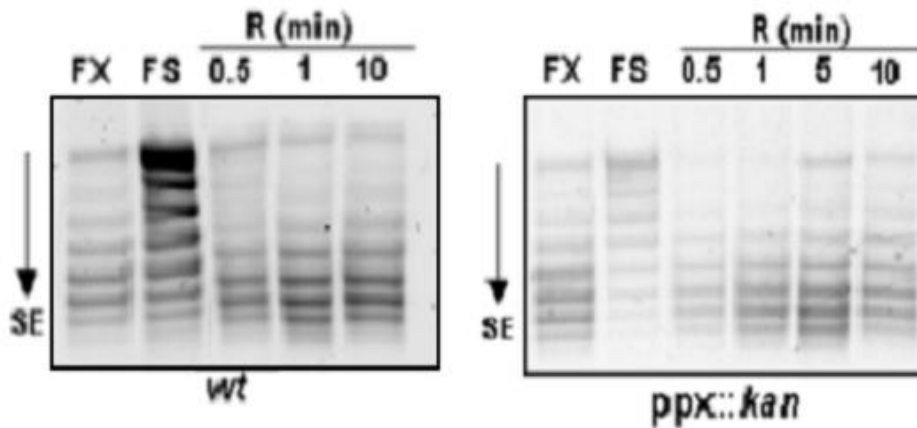


Figura 6. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa *ppx::kan/ pMS01* en células crecidas en medio rico LB-MOPS. Recuperación del superenrollamiento posterior a la adición de medio fresco a células en fase estacionaria de 48 horas. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), SE (superenrollado).

DISCUSIÓN

Hasta hace algunos años, la información respecto a la fisiología así como al patrón de expresión genética de diferentes microorganismos provenía de experimentos realizados en medio rico, específicamente de aquellos en los que se estudiaba el comportamiento durante FS. Actualmente se sabe que hay variaciones en función de la fuente nutricional en la cual se desarrollan estos microorganismos. Debido a estos hallazgos, se consideró relevante valorar la respuesta celular respecto a Girasa, la cual interviene directamente en el metabolismo del DNA. Esto cobra relevancia al salir de FS ya que las células reanudan su metabolismo y crecimiento. En un trabajo previo en donde se utilizó medio rico se había propuesto un modelo de protección y reactivación para Girasa durante FS (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Dado que la velocidad de crecimiento en un medio mínimo requiere mayor tiempo comparado con el crecimiento en LB, existía la posibilidad de que Girasa requiriera de otras estrategias para regular el SE a la salida de FS.

En los resultados correspondientes a la cepa silvestre, tanto en ayuno de C como de P, mostrados en el presente trabajo, se constata que el modelo de protección de Girasa en el periodo de ayuno es válido independientemente de las condiciones del ayuno. En las Figuras 1A, 1B, 2A y 2B se observa que la recuperación del nivel de SE, al añadirse nutrimentos al cultivo en FS, se presenta en condiciones en las que la transcripción y la traducción están inhibidas por rifampicina y cloramfenicol, respectivamente. Esta recuperación únicamente se inhibe con novobiocina. Esto muestra que, de modo semejante a lo reportado en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003), la Girasa presente en las células en FS es la encargada de la recuperación del SE. Esto implica que la enzima presente en células en FS en ayuno de C no se inactiva por carbonilación o degradación durante esta fase.

Acorde al modelo propuesto previamente, la recuperación del SE en medio mínimo (Figuras 1 y 2) sugiere que Fis se regula del mismo modo en este medio que en medio rico. Es decir, que la expresión de *fis* se induce de manera importante al reanudarse el crecimiento y que esta proteína inhibe la expresión de los genes *gyr*. Esta regulación de Fis explicaría, en parte, la propuesta de este trabajo de que la Girasa presente en las células en FS en medio mínimo, de manera similar a lo reportado en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003), es la responsable de la recuperación del nivel de SE al añadirse nutrimentos al medio. La inhibición de la transcripción de los genes *gyr*, dependiente de Fis, que se presenta en la fase lag e inicio de la fase FX, apoya la propuesta de que se requieren mecanismos de protección para Girasa en la FS. Esta protección permitiría la rápida reactivación de la enzima para la regulación del SE en las fases tempranas de la recuperación del crecimiento exponencial. Es importante mencionar que la actividad del promotor de *fis* se incrementa cuando hay un aumento en el SE, condición que se presenta durante la recuperación del SE por la reactivación de Girasa de FS al añadirse nutrimentos a un cultivo en FS.

En el caso de cultivos en ayuno en medio mínimo, la recuperación del SE es completa a los 15 minutos (Figuras 1 y 2), mientras que en medio rico se observa claramente al minuto (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003). Esto puede deberse a la diferencia en los tiempos de generación de las células, así como a la duración de las fases lag en medio rico o mínimo al añadirse nuevamente nutrimentos.

Se sabe que durante la FX la expresión de RpoS es mayor en medio mínimo que en medio rico; por lo tanto, podrían observarse diferencias en la recuperación del SE en células *rpoS* en FS en medio rico o en medio mínimo, ya que las características de estas células dependen, en parte, de la expresión del regulón RpoS (Dong and Schellhorn, 2009). En los resultados de las Figuras 1C, 1D, 2C y 2D se observa que, a diferencia de las células en medio rico, en medio mínimo la delección del gen *rpoS* no influye en la recuperación del SE. En medio mínimo el grado de SE se recupera a un nivel similar al de las células en FX; mientras que

en medio rico se observa una distribución bimodal de los topoisómeros del plásmido, con una subpoblación de plásmidos que se mantienen relajados y otra de SE (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003; Figura 3). En los resultados correspondientes al ayuno tanto de C (Figura 1C y 1D) como de P (resultados no mostrados) únicamente la novobiocina impide la recuperación del SE; por lo tanto, esta recuperación responde a la reactivación de Girasa y no requiere de la síntesis de proteínas reguladas directa o indirectamente por RpoS. Esto es relevante considerando que RpoS induce la expresión de las defensas antioxidantes durante FS.

Los resultados obtenidos diferían de lo reportado en medio rico para la cepa *relA1 rpoS::Tn10*, por lo que se probó el comportamiento de la cepa utilizada en este trabajo, *relA⁺ rpoS::kan*, en medio rico para así validar lo aquí reportado.

Como se observa en la Figura 3, la cepa *relA⁺ rpoS::kan*, que en medio mínimo recupera el nivel de SE al añadirse nutrimentos al cultivo en FS, en medio rico lo recupera de manera similar a lo descrito para la cepa *relA1 rpoS::Tn10*. Es decir, se observa una distribución bimodal de topoisómeros. Estos resultados muestran también que la proteína RelA, que está mutada en la cepa que se utilizó en el estudio de la regulación del SE y de Girasa en células de FS en medio rico (Reyes-Domínguez *et al.*, 2003), no parece ser importante en la recuperación del SE.

Es difícil proponer al gene o los genes regulados por RpoS involucrados en los posibles mecanismos de protección de Girasa en FS en células en medio rico. El programa genético que la célula establece al entrar a FS debido al agotamiento de nutrimentos específicos, como en el caso de medio mínimo, o no bien definidos como en el caso de medio rico, no es igual. Por ejemplo, se sabe que en el ayuno de C, el metabolismo se redirige principalmente hacia la asimilación de acetatos, por lo que posiblemente los genes que intervienen en esta vía son directa o indirectamente regulados por RpoS. Cabe la posibilidad de que en medio rico la

expresión de algunos transportadores dependa de *rpoS* y que éstos a su vez, permitan la asimilación de nutrimentos o bien que la respuesta se relacione con otros genes de la respuesta a estrés oxidativo no dependientes de *rpoS* como *sodA* (Farr and Kogoma, 1991).

Se ha reportado que durante el ayuno de C hay un elevado estrés oxidativo que favorece reacciones como la oxidación irreversible (carbonilación) de proteínas (Ballesteros et al., 2001; Díaz-Acosta and Membrillo-Hernández, 2006). Estos daños irreversibles pueden ocasionar la inactivación de enzimas. En el ayuno prolongado de C, en el cual la carbonilación de proteínas es mayor que en el de P, la Girasa se mantuvo reactivable (Fig. 1), por lo que es posible que bajo estas condiciones, la enzima esté protegida de estos daños. En el caso del estrés calórico, muchas proteínas, entre ellas GyrA, se desdoblaron y tienden a agregarse, lo que las inactiva (Mogk et al., 1999; Tomoyasu et al., 2001). La reactivación de estas proteínas depende del sistema bichaperona DnaK-ClpB que aumenta su concentración en respuesta a este estrés. Estas chaperonas catalizan la desagregación y plegamiento correcto de las proteínas agregadas, reactivándolas (Mogk et al., 1999; Tomoyasu et al., 2001). En el estrés calórico severo, la rápida recuperación de la actividad de Girasa, y por tanto del nivel de SE que disminuye en los primeros minutos de este estrés, depende de este sistema de bichaperonas (Lara et al., manuscrito en prep. 2011). En el caso de la carbonilación de la enzima AdhE (etanol oxidorreductasa) y de otras proteínas durante un estrés oxidativo, se reportó que DnaK la puede proteger de este daño irreversible (Echave et al., 2002). En el caso de las células en estrés nutricional, la expresión del principal regulador de la expresión de las chaperonas, RpoH, se incrementa. Dado que los resultados obtenidos con células en FS en medio rico (Reyes- Domínguez et al., 2003) y los presentados en este trabajo con células en ayuno de C o P apoyan el modelo que propone la presencia de mecanismos de protección para Girasa, se consideró importante probar si las chaperonas reguladas por RpoH participan en esta protección. En estos experimentos se utilizó medio rico ya que, debido a la

rapidez con la cual se recupera el SE se podría evaluar de manera más precisa si las chaperonas protegen o no a Girasa en FS.

En los resultados de la Figura 4 podemos ver que tanto en FS temprana (24h) como en FS tardía (72h), Girasa se reactiva durante la recuperación del crecimiento independientemente de la presencia o no de RpoH (σ^{32}). Este resultado muestra que DnaK y ClpB no participan en el mecanismo de protección de Girasa. Sin embargo, no se descarta a la chaperona GroEL/ES, ya que la mutante *rpoH* sí expresa a esta chaperona.

Se sabe que DnaK-ClpB asiste en el plegamiento de proteínas entre los 16-167 kDa, mientras que GroEL/GroES pliega proteínas de 20-60 kDa (Tomoyasu T. 2001). Aunque para algunos pesos moleculares ambas chaperonas se traslapan, la suma total de las subunidades de Girasa, e incluso únicamente la de cada subunidad (GyrA, 97 kDa y GyrB 90 KDa) sobrepasa el intervalo de acción de GroEL/GroES (Tomoyasu *et al.*, 2001). Esto sugiere que se puede descartar que GroEL/ES reactive a Girasa durante el ayuno.

La tensión helicoidal del plásmido monitor durante FS disminuye debido a que las reservas de ATP se agotan como consecuencia de la carencia de nutrientes, así como de la síntesis basal de RNA y proteínas que se observa durante la FS. En esta condición, la actividad de Girasa debe disminuir de manera importante ya que necesita ATP para realizar su ciclo catalítico. La FS es un estado reversible; es decir, basta agregar nutrientes para que la Girasa se reactive y por lo tanto el nivel de SE se recupere y las células reinicien el crecimiento.

Se ha visto que no es únicamente el ATP el responsable de favorecer que se lleven a cabo las reacciones metabólicas celulares, sino que es la carga energética total ($ATP + \frac{1}{2} ADP / ATP + ADP + AMP$) la que determina las tasas de estas reacciones en la célula. Se ha reportado que durante la FX la carga energética promedio es de 0.8 mientras que durante el ayuno, desciende hasta

llegar a 0.5 (Chapman *et al.*, 1971). Debido a la complejidad de las reacciones metabólicas necesarias para restablecer la integridad celular posterior a un ayuno se puede deducir que la regeneración de la poza ATP/ADP en la célula no será inmediata. Se ha reportado que la carga energética presente en las células de un inóculo no filtrado que se diluye en medio fresco para reiniciar un cultivo bacteriano, tarda entre 1 y 2 horas en restablecerse hasta un valor semejante al de FX (Chapman *et al.*, 1971). Posterior a la dilución del inóculo, la síntesis del DNA ocurre una hora después, es decir, antes de la división celular (García del Portillo *et al.*, 1987). Se sabe que las enzimas que consumen ATP muestran una actividad baja en niveles energéticos de 0.75 mientras que en niveles de 0.6-0.5 la actividad se vuelve casi indetectable (Chapman *et al.*, 1971). Esto cuestiona entonces la fuente energética que Girasa utiliza de manera tan inmediata en la recuperación del SE, ya que al salir de FS la célula posiblemente no regenera una poza ATP/ADP óptima en un tiempo corto.

Para evaluar el papel del poli-P como una posible fuente de ATP en el periodo de recuperación, se utilizaron las cepas Δppk y Δppx . Estos dos genes, organizados en un operón *ppk ppx* se encargan del metabolismo del poli-P; es decir, de su síntesis y degradación. La enzima PPK sintetiza poli-P el cual se especula podría sustituir ciertas reacciones dependientes de ATP ya que tiene una cinética reversible ($ATP \leftrightarrow ADP + P_i$). PPX degrada al poli-P liberando P_i durante la salida de FS (Kornberg *et al.*, 1999, Rao *et al.*, 2009).

En la Figura 5 se observa que la cepa Δppk muestra una rápida recuperación del SE la cual inicia a los 5 seg posteriores de la adición de medio fresco y concluye a los 30 seg. Esto concuerda con los datos reportados respecto a la velocidad de recuperación del SE para células silvestres en medio rico. Por otro lado, con respecto a la cepa Δppx podemos observar en la Figura 6 que la velocidad de recuperación del SE es más lenta. En este caso, la recuperación de la tensión helicoidal en el plásmido reportero comienza a visualizarse a los 30 seg y se restablece al minuto posterior de la adición de nutrimentos. Sin embargo, en

ambos casos podemos ver que la recuperación del SE es independiente de la ausencia de poli-P. Estos resultados no descartan otras ATPasas ni eventos como la fosforilación a nivel de sustrato en donde poli-P podría funcionar como un donador de P, ya que sus enlaces son de alta energía semejantes a los del ATP. Poli-P podría funcionar como un iniciador de eventos fosforilativos que funcionaran como señales intracelulares para activar una respuesta de liberación rápida de energía, la cual podría generarse a través de otras vías. Por ejemplo, con enzimas como la AMP-fosfotransferasa que genera ATP a partir del AMP.

Se ha reportado que las mutantes nulas muestran el 2% de la actividad de PPK mientras que PPX conserva una actividad del 6% lo que sugiere que existen rutas alternas para el metabolismo de poli-P. Se ha reportado que *E. coli* posee 2 enzimas con actividad de exopolifosfatasa: PPX y PPX2 o GppA (guanosina pentafosfato fosfohidrolasa). Posiblemente bajo las condiciones experimentales utilizadas, esta enzima supla la actividad degradativa de PPX (Tzeng and Kornberg, 2000; Rao *et al.*, 2009). Para poli-P no se ha reportado otra vía de síntesis; sin embargo, los niveles residuales de actividad sugieren que es así.

No hay que descartar la importancia de este polímero; se sabe que en las esporas de algunas bacterias (*Myxobacteria xanthus*, *Bacillus sp.*) hay reservas de poli-P que van acompañadas por enzimas como la fosfotransferasa y PPK (Brown and Kornberg, 2004). Posiblemente éste sea el modo por el cual generan ATP cuando tienen las condiciones propicias para germinar.

CONCLUSIONES

- En el ayuno de C o P, la Girasa presente en las células en FS es responsable de la recuperación del SE, de una manera similar a lo que se ha reportado para medio rico.
- En las células en ayuno de C o P, la recuperación del SE no depende del regulador transcripcional RpoS (σ^S).
- En las células en FS en medio rico, la recuperación del SE es dependiente de *rpoS*.
- La recuperación del SE en medio rico es independiente de la presencia o ausencia de la proteína RelA.
- En medio rico la protección de Girasa durante la FS es independiente de las principales chaperonas celulares (DnaK, ClpB) reguladas por RpoH (σ^{32}).
- La recuperación del SE no se modifica en ausencia de las enzimas que sintetizan o que degradan al polifosfato.

PERSPECTIVAS

Determinar las variaciones respecto a la poza ATP/ADP durante fase exponencial, fase estacionaria y recuperación del crecimiento. De este modo, podría sugerirse cómo se mantiene y restablece el ciclo catalítico de Girasa.

Estudiar la relevancia de ppGpp dependiente de SpoT en condiciones de ayuno de C y P, ya que SpoT es el responsable principal de la inducción de *rpoS* en estas condiciones.

Hacer ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar si hay proteínas unidas a Girasa que favorezcan su protección durante fase estacionaria.

Estudiar proteínas de unión a Girasa que influyan y/o modifiquen su actividad, como YacG la cual induce una disminución en la actividad de Girasa, y como consecuencia una disminución en el superenrollamiento y en el crecimiento microbiano.

Evaluar la protección de Girasa mediada por chaperonas en ayuno de carbono y fosfato.

Dado que en medio mínimo la recuperación del superenrollamiento no depende de *rpoS*, estudiar las implicaciones de las defensas oxidativas independientes de este regulador en células en ayuno de carbono o de fosfato.

BIBLIOGRAFÍA

- Baek, H., J., J. Kang, and Y.S. Lee.** 2007. Transcript and protein level analyses of the interactions among PhoB, PhoR, PhoU and CreC in response to phosphate starvation in *Escherichia coli*. FEMS. 254-259.
- Ball, A.C., R.Osuna, K.C. Ferguson, and R.C. Jhonson.** 1992. Dramatic changes in Fis level upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 8043-8056.
- Ballesteros, M., S, Fredriksson, J., Henriksson and T. Nystrom.** 2001. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells dictated by the accuracy of the ribosomes. EMBO. 20: 5280-5289.
- Blot, N., R. Mavathur, M. Geertz, A. Travers, and G. Muskhelishvili.** 2006. Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. EMBO. 710-715.
- Bougdour, A., S. Wickner, and S. Gottesman.** 2006. Modulating RssB activity: Ira P, a novel regulator of σ^s stability in *Escherichia coli*. Genes and development. 20:884-897.
- Bougdour, A., C. Cuning, P. Jean-Baptiste, T. Elliot, and S. Gottesman.** 2008. Multiple pathways for regulation of σ^s (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. Mol. microbiol. 68(2), 298-313.
- Bougdour, A., and S. Gottesman.** 2007. ppGpp regulation of RpoS degradation via antiadaptor protein IraP. PNAS. 12896-12901.
- Bowater, R.P.** 2005. Supercoiled DNA: Structure. ENCICLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, John Wiley and Sons: 1-9.
- Brown, W.M., and A. Kornberg.** 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. PNAS. 16085-16087.
- Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernández, J. Ramírez-Santos, J. Castro-Dorantes, V. Chagoya de Sánchez and M. C. Gómez- Eichelmann.** 1995. Topoisomerase activity during the Heat Shock Response in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 3619-3622.

- Chapman, A., L. Fall, and D.E. Atkinson.** 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. J. Bacteriol. 1072-1086.
- Chung, C., L. Suzanne, and R. Miller.** 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 2172-2175.
- Contreras-Ferrat, G.** 2003. El superenrollamiento del DNA y el regulador transcripcional σ^S en la fase estacionaria de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.
- Díaz-Acosta, A., and J. Membrillo-Hernández.** 2006. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. TIP. Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol. 9(1)34-44.
- Dillon, C.S., and C.Dorman.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat. Reviews. 185-195.
- Dong ,T., and H.E. Schellhorn.** 2009. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. Mol. Genet. Genomics. 281:19-33.
- Dorman, J.C.** 1996. Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental stress. Trends in Microbiol., 6 (4) :214-216.
- Dorman, J. C.** 2006. DNA supercoiling and bacterial gene expression. Sci. progress. 89 (3/4): 151-166.
- Drolet, M.** 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. Mol. Microbiol. 59: 3, 723-730.
- Dukan, S., and T.Nyström.** 1998. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. Genes Dev. 12: 3431-3441.
- Echave, P., M.A. Esparza-Cerón, E. Cabiscol, J., Tamarit, J. Ros, J. Membrillo-Hernández, and C.C. Lin.** 2002. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. PNAS. 4626-4631.
- Farr, B.S., and T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiological Rev. 561-585.

- Fisher, M.L., A.R.Hopewell, E.C.Margerrison, M.Oram, S.Patel, K.Plummer, J.H.Sng, and S.Sreedharan.** 1992. DNA supercoiling and relaxation by ATP-dependent DNA topoisomerases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 336: 83-91.
- Fredriksson, A., M., C.N. Ballesteros, O. Peterson, T. Persson, J. Silhavy, and T. Nystrom.** 2007. Decline in ribosomal fidelity contributes to the accumulation and stabilization of the master response regulator σ^S upon carbon starvation. *Genes Dev.* 21: 862-874.
- García del Portillo, F., A. G. Pisabarro, E. J. de la Rosa, and M.A. de Pedro.** 1987. Modulation of cell wall synthesis by DNA replication in *Escherichia coli* during initiation of cell growth. *J. Bacteriol.* 2410-2416.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M.H. O'Dea, and H. A. Nash.** 1976. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (11): 3872-3876.
- Gilles, D. E.** 2006. Signal transduction and regulation in bacteria. *Computers and chemical engineering.*30:1687-1699.
- Gómez-Eichelmann, M.C., and R. Camacho-Carranza.** 1995. Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 37: 291-304.
- Hanni, W., and D. Ussery.** 2004. Chromatin architecture and gene expression in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 252-256.
- Henge-Aronis, R. 2002.** Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of the RNA polymerase. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 66 (3): 373-395.
- Hsu, H.,Y., W.M. Chung, and K.T. Li.** 2006. Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: implications for nucleoid organization. *Nucl Acids Res.*3128-3138.
- Jenkins D., E. Auger, and A. Matin.** 1991. Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* 1992-1996.
- Jishage,M., K.Kvint, V.Shingler, and T.Nyström.** 2002. Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16: 1260-1270.

- Jozefczuk, S., S. Klie, G. Catchpole, J. Szymanski, A. Cuadros Inostroza, D. Steinhauser, J. Selbig, and L. Willmitzer.** 2010. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Mol sys biol* 6: 364, 1-16.
- Keane, M.O. and C. Dorman.** 2003. The *gyr* genes of *Salmonella enterica* serovar typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, FIS. *Mol. Gen. Genomics*. 270: 56-65.
- Khodursky, B. A.** 2007. Evolution, Adaptation and Supercoiling. *J. Bacteriol.* 186: 5789-5791.
- Kornberg, A., N.N. Rao, and D. Ault-Riché.** 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89-125.
- Lacour, S., and P. Landini.** 2004. σ^S -Dependent Gene Expression at the onset of Stationary Phase in *Escherichia coli*: Function of σ^S -Dependent Genes and Identification of their Promoter Sequences. *J. Bacteriol.* 186: 7186-7195.
- Lara-Ortíz, T., J. Castro-Dorantes, J. Ramírez-Santos, and M.C. Gomez-Eichelmann.** 2011. Role of the DnaK-ClpB chaperone system in DNA Gyrase reactivation during the heat shock response in *Escherichia coli* K12. Manuscript in preparation.
- Llorens, N. M. J., A. Tormo, and E. Martínez-García.** 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 34: 476-495.
- Magnusson, U., L.A. Farewell, and T. Nyström.** 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *ELSEVIER*. 236-242.
- Mandel, M. J., and T. Silhavy.** 2005. Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *J. Bacteriol.* 187: 434-442.
- Maniatis, T., E. Fritschy, and J. Sambrook.** 1982. Alkaline lysis method in: *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor lab. N.Y.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen, and B. Bukau.** 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO*. 6934-6949.

- Moreau, P. L., F. Gérard, N.W Lutz, and P. Cozzone.** 2001. Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 39: 1048-1060.
- Natividad, R., and J.T. Silhavy.** 2003. Constitutive Activation of the *Escherichia coli* Pho Regulon Upregulates rpoS Translation in a HFQ-Dependent Fashion. *J. Bacteriol.* 5984-5992.
- Noda, Y., S.B Berlett, R.E Stadtman, A. Aponte, M. Morgan, and F.S Shen.** 2007. Identification of enzymes and regulatory proteins in *Escherichia coli* that are oxidized under nitrogen, carbon or phosphate starvation. *PNAS.* 18456-18460.
- Nöllmann, M., N. J. Crisona., and P. B. Arimondo.** 2007. Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: From *in vivo* function to single-molecule mechanism. *ELSEVIER.* 89: 490-499.
- Nyström T.** 2002. Aging in bacteria. *Curr opin Microbiol.* 5: 596-601.
- Nyström T.** 2004. Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 161-181.
- Ogata Y., T. Mizushima, K. Kataoka, K. Kita, T. Miki and K. Sekimizu.** 1996. DnaK Heat shock protein of *Escherichia coli* maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. *J. Biol.Chem.* 271(46): 29407-29414.
- Peebles, C.L., N.P. Higgins, K.N. Kreuzer, A.Morrison, P.O. Brown, A.Sugino and R.Cozzarelli.** 1978. Structure and Activities on *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Cold Spring Harbor Symp.Quont. Bil.* 43:41-52.
- Peter, J.B., J. Arsuaga, A.M Breier, A.B Khodursky, P.O Brown, and N.R Cozzarelli.** 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biology*, 5:R87.
- Peterson, C.N., M.J. Mandel, and T. Silhavy.** 2005. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. *J. Bacteriol:* 7549-7553.
- Prueanu, M, and R. Henge-Aronnis.** 2002. The cellular level of recognition factor RssB is rate limiting for σ^S proteolysis: Implications for RssB regulation and signal transduction in σ^S turnover in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45: 1701-1713.
- Ramírez-Santos, J., G. Contreras-Ferrat, and M.C Gómez-Eichelmann.** 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Rev. Latinoam. de Microbiol.* 3-4: 86-95.

- Rao, N., M.R. Gómez-García, and A.Kornberg.** 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 605-647.
- Reyes-Domínguez, Y., G. Contreras-Ferrat, J. Ramírez-Santos, J. Membrillo-Hernández, and M.C. Gómez-Eichelmann.** 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary phase cells. *J. Bacteriol.* 185:1097-1100.
- Rui,S., and Y.C.Tse-Dinh.** 2003. Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Frontiers in Bioscience* 8: 256-263.
- Schneider,R., A.Travers, T.Kutateladze, and G.Muskhelisvili.** 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli* . *Mol Microbiol.* 34(5): 953-964.
- Schoeffler, J.A., and J.M. Berger.** 2005. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochemical Society Transactions.* 1465-1470.
- Schurdell, M.S, G.M. Woodbury, and W.R McCleary.** 2007. Genetic Evidence Suggest that the intergenic Region between *pstA* and *pstB* Plays a Role in the regulation os *rpoS* Translation during Phosphate Limitation. *J. Bacteriol.* 1150-1153.
- Siegele, A.D., and R. Kolter.** 1992. Life after log. *J. Bacteriol.* 345-348.
- Spira,B., B.Silberstein, and E.Yagul.** 1995. Guanosine 3'-5'-byspirophosphate (ppGpp) syntesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol.* 177: 4053-4058.
- Spira, B., X.Hu, and T.Ferenci.** 2008. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratoru strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol.* 154: 2887-2895.
- Tanaka, K., T. Yuko, F. Nobuyuki, A. Ishihama, and H. Takahashi.** 1993. Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: The *rpoS* gene product σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3511-3515.
- Tomoyasu, T., A. Mogk, H. Langen, P. Goloubinoff, and B. Bukau.** 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* 40(2): 397-413.

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

Wang, D.J., and P.A.Levin. 2009. Metabolism, cell growth and the bacterial cycle. *Nature.* 7: 822-827.

Willnbrock, H., and D.W.Ussery. 2004. Chromatin architecture and gene expression in *Escherichia coli*. *Genome Biology.* 5: 252.

Wu, J., and J. Xie. 2009. Magic spot: (p)ppGpp. *J. Cel. Physiol.* 220: 297-302.

Anexo

▪ Ayuno de Fosfato

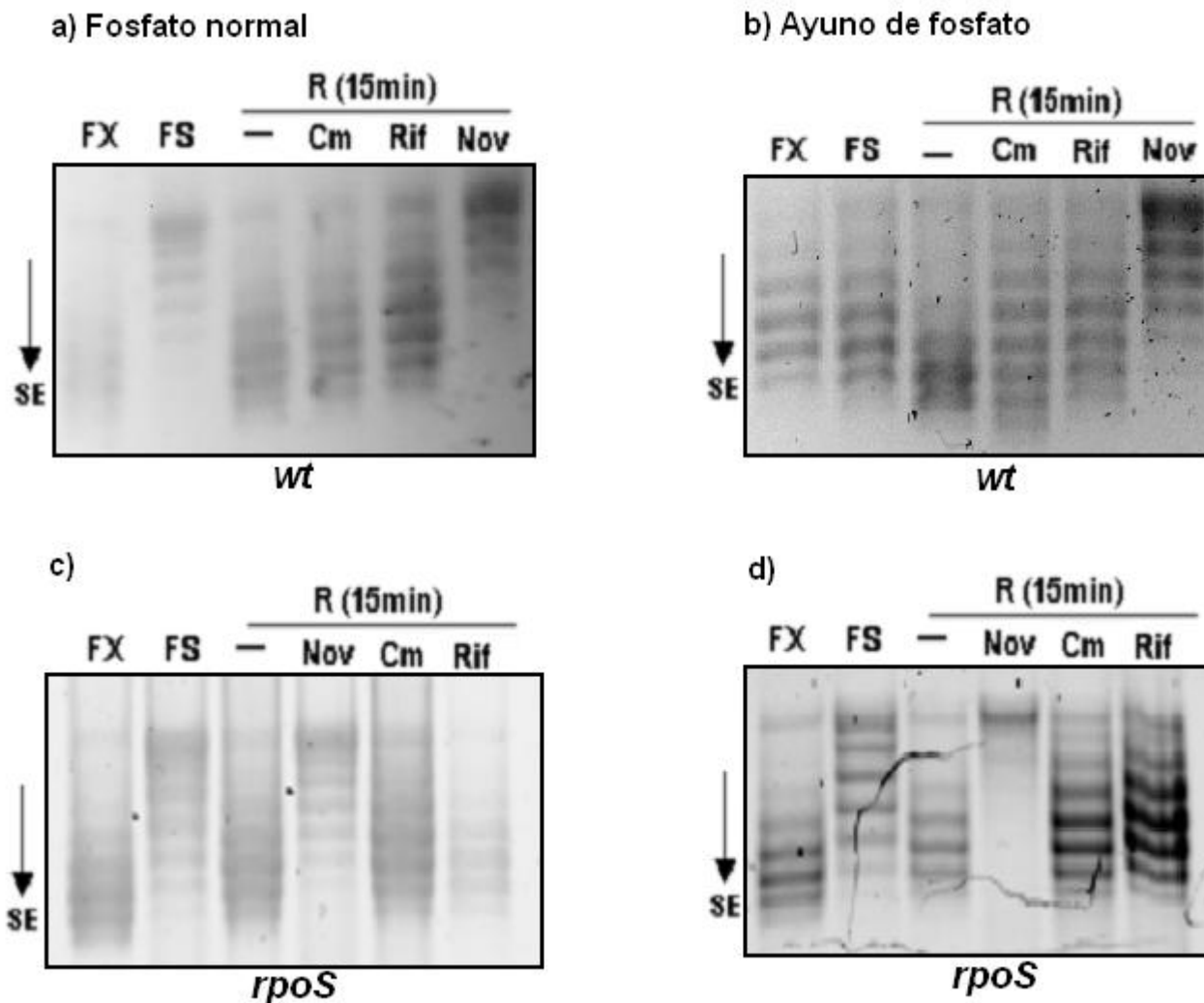


Figura 2 Anexo. Distribución de topoisómeros del plásmido monitor pMS01 en la cepa silvestre LG4100/pMS01 (*wt*) y en la cepa AG01/pMS01 (*rpoS::kan*). Las células se cultivaron en medio mínimo M9 (Material y Métodos) con glucosa al 0.4% con diferentes concentraciones de Fosfato. A) y C) KH_2PO_4 36 μM y Na_2HPO_4 83 μM ; B) y D) KH_2PO_4 22.04 mM y Na_2HPO_4 42.26mM. Los topoisómeros se separaron en un gel de agarosa al 1% como se describe en la Fig. 1. FX (Fase exponencial), FS (Fase estacionaria), R (Recuperación), Nov (novobiocina), Cm (cloramfenicol), Rif (rifampicina), SE (superenrollado).