

Tesis de Posgrado

Control genético de la división y forma celular en bacterias

Costa, Cristina Susana

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Costa, Cristina Susana. (1995). Control genético de la división y forma celular en bacterias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2706_Costa.pdf

Cita tipo Chicago:

Costa, Cristina Susana. "Control genético de la división y forma celular en bacterias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2706_Costa.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

“Control genético de la división y forma celular en bacterias”

Lic. Cristina S. Costa

Directora: Dra. Dora N. Antón

**Lugar de trabajo: Comisión Nacional de Energía Atómica,
Departamento de Radiobiología**

-1995-

TESIS

1/2

Agradecimientos

-A la Dra. Dora Antón, por sus excelentes enseñanzas y consejos, la permanente dedicación y entusiasmo puestos en este trabajo, las "horas extra" dedicadas a corregir esta tesis, y el afecto y apoyo recibidos.

-A Ana y a Loli Flores, por la gran ayuda que me dieron en la parte experimental y preparación del material, por brindarme su amistad, y por los momentos compartidos.

-Al Dr. Oscar Opezzo, por su invaluable ayuda con las PBPs y el ppGpp, y su paciencia ante mis preguntas de bioquímica.

- A los Drs. Enzo Muñoz y Ramón Pizarro, por su interés y disposición para resolver todo tipo de problema.

- A la Dra. Mandy Schwint y al Bqco. Rubén Fernández, por su buena predisposición cada vez que los consulté.

- A la Dra. Hebe Durán, por su amistad, y a la Lic. Cristina Fernández, Lic. Mónica Palmieri, Lic. Ana Palermo y Patricia Pereyra, por los gratos momentos compartidos.

- A Martín Scalabrini Ortiz, por estar a mi lado.

- A mis padres, abuelos, las dos Silvias, Estela, Anita y Susi, por su amor y constante apoyo.

A mis padres

INDICE

- Resumen	1
- Introducción	4
I. La cubierta celular en enterobacterias	5
1. Composición de la pared celular	5
2. Mureína: composición y síntesis.....	7
II. División y forma celular en <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i>.....	11
1. Control genético de la división celular	12
2. Control genético de la forma celular.....	14
3. Resistencia a mecilnam y tolerancia a mutaciones letales de forma celular	20
III. Fase estacionaria de crecimiento bacteriano.....	22
- Objetivos.....	28
- Materiales y Métodos.....	30
1. Cepas, bacteriófagos y plásmidos	31
2. Medios y drogas	31
3. Procedimientos genéticos	36
3.1. Transducción.....	36
3.2. Conjugación	36
3.3. Transformación	37
3.4. Complementación	38
3.5. Curri del transposón Tn10.....	38
4. Pruebas de sensibilidad a bacteriófago H5 y lisogenia	38
5. Obtención y caracterización de mutantes	39
5.1. Aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a mecilnam	39
5.2. Aislamiento e identificación genética de mutantes esféricos obtenidos por transposición	40
5.3. Aislamiento de mutantes auxótrofos por transposición	42

5.4. Obtención de mutantes <i>nalB</i>	43
5.5. Aislamiento y caracterización de mutaciones <i>rpoS</i>	44
6. Ensayos de tolerancia.....	44
7. Cinéticas de crecimiento.....	45
8. Tinción con naranja de acridina.....	46
9. Medición de respiración celular.....	47
10. Ensayo de aminoacil-tARN sintetasas.....	47
11. Detección de guanosina tetrafosfato (ppGpp).....	48
- Resultados.....	50
I. Obtención y caracterización de mutantes de forma	
por transposición.....	51
1. Obtención de inserciones en genes de forma.....	51
2. Identificación genética de los mutantes de forma por inserción.....	53
2.1. Mutantes <i>rodA/pbpA</i>	54
2.2. Mutantes <i>mre</i> y <i>divD</i>	55
3. Características de las mutaciones de forma por inserción.....	57
3.1. Efecto de mecilnam.....	57
3.2. Tolerancia a mutaciones de forma por inserción.....	58
II. Caracterización de una cepa tolerante condicional a	
mutaciones letales de forma celular.....	62
1. Resistencia a mecilnam y tolerancia a mutaciones de forma	
en la cepa DA1138.....	62
2. Identificación genética de la mutación responsable de la	
resistencia a mecilnam y tolerancia condicional de la cepa DA1138.....	64
2.1. Mapeo preliminar por conjugación.....	64
2.2. Mapeo de <i>mec-4</i> por cotransducción con marcadores cercanos.....	66
2.3. Identificación por complementación del gen afectado por <i>mec-4</i>	70
2.4. Actividad de alanil-tARN sintetasa en DA1138.....	73
3. Relación de ppGpp con la resistencia a mecilnam en DA1138.....	75
3.1. Nivel de ppGpp en DA1138.....	75
3.2. Efecto de una mutación <i>relA</i> en la resistencia a mecilnam	
de DA1138.....	76

III. Efecto de la temperatura sobre derivados esféricos de DA1138 en fase logarítmica	78
1. Cinéticas de crecimiento de los derivados esféricos de DA1138.....	79
2. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular.....	85
3. Medición de la respiración celular.....	88
IV. Comportamiento de la cepa DA1138 <i>rodA22::Tn10Δ16Δ17</i> en fase estacionaria	90
1. Recuperación de la viabilidad celular en condiciones de no-tolerancia en fase estacionaria.....	90
2. Recuperación de la viabilidad celular por acción de acetato o benzoato.....	91
V. Efecto de mutaciones <i>rpoS</i> en el comportamiento de la cepa DA1138 <i>rodA22::Tn10Δ16Δ17</i>	97
1. Obtención y caracterización de mutaciones <i>rpoS</i>	97
1.1. Obtención de mutaciones <i>rpoS</i>	97
1.2. Caracterización genética de las mutaciones <i>rpoS1061</i> y <i>rpoS1062</i>	99
1.3. Caracterización fenotípica de las mutaciones <i>rpoS</i>	101
2. Comportamiento de derivados <i>rpoS</i> de la cepa DA1138 <i>rodA22::Tn10Δ16Δ17</i>	103
2.1. Derivados DA1138 <i>rodA22 rpoS1061</i> y <i>rpoS1062</i>	103
2.2. Derivado DA1138 <i>rodA22 rpoS::Amp-R</i>	106
- Discusión y Conclusiones	111
I. Discusión	112
1. Mutaciones de forma celular obtenidas por transposición.....	112
2. Naturaleza de la mutación condicional de resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma de la cepa DA1138.....	115
3. Efecto de mutaciones de forma durante la fase exponencial en condiciones de no-tolerancia.....	118
4. Restauración de la viabilidad en mutantes de forma celular.....	123
II. Conclusiones	129
- Referencias	131



Resumen

En este trabajo se investigaron las funciones esenciales de los genes involucrados en el mantenimiento de la forma bacilar en *Salmonella typhimurium* a través del estudio de las alteraciones que provocan en el crecimiento bacteriano mutaciones que inactivan totalmente a dichos genes.

Se aislaron inserciones del transposón Tn10 Δ 16 Δ 17 correspondientes a 3 de los 4 tipos de mutantes de forma conocidos: *rodA*, *mre* y *divD*. Las mutaciones *rodA* y *mre* no pudieron transducirse eficientemente a cepas salvajes, pero fueron toleradas por derivados resistentes al antibiótico β -lactámico mecilinam (Mec-R), y por mutantes *cya* o *crp*. Por otra parte, la única inserción *divD* obtenida pudo ser transducida con alta eficiencia a cualquier tipo de cepa. Estos resultados indican que los tres tipos de genes controlan la forma celular pero, además, *rodA* y *mre* llevan a cabo alguna función esencial en bacterias salvajes cuya falta es tolerada por cepas Mec-R, *cya* o *crp*.

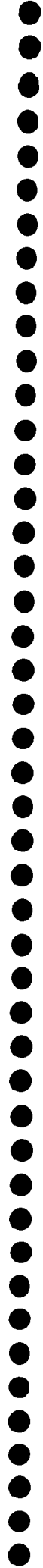
Se estudió uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones letales de forma mediante la caracterización de la cepa DA1138. Se determinó que esta cepa presenta una mutación condicional en el gen de la alanil-tARN sintetasa (*alaS206*) que es responsable de la resistencia a dicho antibiótico y tolerancia termosensibles. Ambas características dependen del efector de la respuesta estricta ppGpp, cuyo nivel se eleva al expresarse, a 41°C, la mutación *alaS206*.

Se construyeron derivados de la cepa DA1138 portadores de las mutaciones *rodA22::Tn10 Δ 16 Δ 17*, *mre-17::Tn10 Δ 16 Δ 17* y *divD135::Tn10 Δ 16 Δ 17* para el estudio de su crecimiento en fase exponencial en condiciones de ausencia de tolerancia a mutaciones letales de forma (30°C). En dicha condición, los derivados *rodA22* y *mre-17* mostraron inhibición de la división celular y pérdida de la capacidad de formación de colonias a pesar de mantener las células sus signos vitales. Por el contrario, el derivado *divD135* creció normalmente a 30°C. Los

resultados obtenidos indican que la ausencia de los productos RodA y Mre (no así DivD) altera seriamente la división celular y la capacidad de formación de colonias en cepas salvajes durante la fase logarítmica. Dado el normal crecimiento de los tres derivados en condiciones de tolerancia (41°C), se concluye que las alteraciones ocasionadas por la falta de los productos RodA o Mre son compensadas por mutaciones que elevan el nivel del efector transcripcional ppGpp, probablemente a través de la inducción de algún mecanismo alternativo de división celular.

Se demostró que la inhibición de la capacidad de formación de colonias del derivado *rodA22* en condiciones de no-tolerancia puede revertirse en tres casos: a) con la llegada a la fase estacionaria, caracterizada por la inducción del gen *rpoS*, que codifica el factor σ^s , b) en fase logarítmica, en presencia de acetato o benzoato, posibles inductores del gen *rpoS*, y, c) en fase logarítmica, en ausencia del producto σ^s . Sin embargo, en ninguno de los tres casos se normaliza la división celular. No se observó resistencia a mecilinam ni tolerancia a mutaciones letales de forma en una cepa portadora de una mutación nula *rpoS*, lo que indica que la recuperación de la capacidad de formación de colonias es por sí sola insuficiente para conferir tolerancia y que este fenómeno requiere la restauración de la división celular. Los resultados obtenidos permitieron postular un modelo según el cual el regulador global σ^s actuaría controlando la capacidad de formación de colonias de mutantes letales de forma celular por medio de la transcripción diferencial de genes con funciones opuestas.

Introducción



I. La cubierta celular en enterobacterias

Gran parte de las funciones que en organismos superiores son desempeñadas por estructuras especializadas, en las bacterias son cumplidas por la envoltura celular. Así es como esta compleja estructura, formada por varias capas de composición y funciones diferentes, y una zona virtual, el espacio periplásmico, actúa como soporte de importantes procesos metabólicos tales como la respiración, transporte activo, síntesis de lipopolisacárido, mureína y otras macromoléculas, y también en el mantenimiento de funciones esenciales como el control del crecimiento y la división celular, el mantenimiento de la forma bacteriana, y la coordinación entre la célula y el medio.

1. Composición de la pared celular

La cubierta o pared celular en bacterias gram negativas está formada por tres capas: la membrana interna o citoplasmática, la capa de mureína y la membrana externa. El espacio, virtual o real según las condiciones osmóticas ambientales, entre las membranas interna y externa se denomina espacio periplásmico, y en él se encuentran, además de la mureína, gran cantidad de sustancias que intervienen en la captación y transporte de metabolitos, así como también enzimas hidrolíticas (Neu y Heppel, 1965; Rosen y Heppel, 1973).

La membrana interna está constituida por una bicapa de fosfolípidos y proteínas (Cronan y col., 1987); los lípidos están orientados con sus grupos no polares dirigidos hacia el interior de la bicapa y con sus zonas hidrofílicas hacia el exterior, mientras que las proteínas están en algunos casos insertadas en la bicapa, atravesándola, y en otros asociadas con alguna de sus dos superficies.

Las proteínas que componen esta membrana son muy variadas y muchas de ellas son enzimas fundamentales del metabolismo celular, encontrándose entre

ellas las responsables de los pasos finales de la síntesis de la capa siguiente, denominada mureína.

La mureína es una gran macromolécula que envuelve a la célula y está formada por largas cadenas de hidratos de carbono unidas entre sí por cortos puentes peptídicos (Park, 1987). Debido a su rigidez, se ha atribuido a esta capa el mantenimiento de la forma bacilar (Weidel y Pelzer, 1964) característica de las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

La capa externa, sólo presente en bacterias gram negativas, muestra una estructura de bicapa fosfolipídica, pero de composición muy diferente a la de la membrana interna. Hacia el lado de la mureína, presenta una capa de fosfolípidos con su extremo polar hacia la misma. La otra superficie de la membrana externa está constituida por lipopolisacáridos: cada molécula posee seis o siete ácidos grasos dirigidos hacia el lado interno de la bicapa unidos a un lípido complejo del cual se proyectan largas cadenas hidrocarbonadas que cubren la superficie bacteriana y son responsables de la antigenicidad celular (Nikaido y Vaara, 1985).

La mureína y la membrana externa están conectadas por medio de la lipoproteína de Braun; ésta es una molécula de bajo peso molecular que está unida por su parte proteica a la mureína y por su porción lipídica a la zona no polar de la membrana externa (Inouye, 1974).

Atravesando la bicapa lipídica de la capa externa se encuentran proteínas llamadas porinas (Lutkenhaus, 1977; Van Alphen y col., 1978) que se asocian de a tres para formar poros o canales no-específicos que permiten el paso de moléculas hidrofílicas pequeñas y facilitan así la difusión de nutrientes y de algunos antibióticos como los β -lactámicos (Nikaido y Vaara, 1985).

Las membranas interna y externa no son completamente independientes ya que existen entre ellas zonas de unión denominadas uniones de Bayer, cuya

función no ha sido aún aclarada pese a que se las ha involucrado en numerosos procesos, desde la entrada a la célula de ácidos nucleicos hasta la salida a la membrana externa de compuestos (como por ejemplo lipopolisacáridos) que son sintetizados total o parcialmente en el interior de la bacteria, pero que cumplen su función en el exterior (Bayer, 1979).

Es también importante destacar que el mantenimiento de una presión osmótica positiva en el interior de la bacteria con respecto al medio, esencial para la normal actividad celular, contribuye a la interacción de las capas de la envoltura, ya que mantiene a la membrana interna adosada a la capa de mureína, que con su rigidez le da soporte y evita que la célula estalle.

2. Mureína: composición y síntesis

Como se explicó previamente, la rígida capa de mureína es la responsable del mantenimiento de la forma bacilar de *E. coli* y *S. typhimurium*. Esta capa es una red formada por largas cadenas de ácido N-acetilmurámico alternado con N-acetilglucosamina paralelas entre sí y perpendiculares al eje largo del bacilo. Las cadenas, a su vez, están conectadas por cortos puentes peptídicos (Park, 1987).

Los precursores de la mureína están constituidos por una molécula de N-acetilglucosamina asociada covalentemente a una molécula de ácido N-acetilmurámico del cual pende una cadena peptídica compuesta inicialmente por L-alanina – ácido D-glutámico – ácido meso-diaminopimélico – D-alanina – D-alanina, aunque uno o los dos residuos terminales de D-alanina pueden perderse durante la formación de la red (Park, 1987). Estos precursores son sintetizados en el citoplasma y translocados al periplasma, donde las proteínas captadoras de penicilina (PBPs) llevan a cabo los pasos finales de la síntesis de la mureína (Matsushashi y col., 1981). Las PBPs son aproximadamente siete

enzimas ancladas en la membrana interna con su sitio catalítico expuesto en el periplasma (Spratt y Cromie, 1988). Han sido denominadas así por su capacidad de captación de antibióticos de la familia de las β -lactamas (penicilinas y cefalosporinas).

Las funciones de transglicosilación (formación de la cadena de carbohidratos) y transpeptidación (formación de los puentes entre cadenas) son llevadas a cabo por cuatro enzimas esenciales, las PBPs de alto peso molecular, PBP 1A, PBP 1B, PBP 2 y PBP 3 (Spratt, 1975), capaces de realizar, cada una de ellas, las dos actividades (Ishino y col., 1980; Matsushashi y col., 1981). En el caso de PBP 2, que está relacionada con el mantenimiento de la forma celular, sólo se ha demostrado su actividad como transpeptidasa *in vitro* (Ishino y col., 1982) y únicamente en presencia del producto de otro gen relacionado con la forma celular (*rodA*) se pudo observar actividad de transglicosilasa (Ishino y col., 1986).

Las PBPs de alto peso molecular constituyen el blanco de acción de los antibióticos β -lactámicos que son reconocidos como sustratos por el sitio de transpeptidación de las enzimas, ocasionando su inactivación, la detención de la síntesis de mureína, y, finalmente, la lisis celular (Matsushashi y col., 1982).

El resto de las proteínas captadoras de penicilina tienen bajo peso molecular y son enzimas aparentemente no esenciales para el crecimiento bacteriano denominadas PBP 4, PBP 5 y PBP 6. Estas enzimas tienen como función el remodelado de las cadenas peptídicas de los precursores de mureína debido a su actividad como DD-carboxipeptidasa, eliminando los residuos de D-alanina terminales; PBP 4 posee además actividad DD-endopeptidasa (Waxman y Strominger, 1983). En la Tabla I se muestran las principales características y funciones de las distintas PBPs.

Tabla I. Características de las PBPs

PBP	Peso molecular	Gen	Actividad enzimática	Función
1A	92 kD	<i>ponA</i>	transglicosilasa transpeptidasa	síntesis de mureína de la pared celular
1B	90 kD	<i>ponB</i>	transglicosilasa transpeptidasa	síntesis de mureína de la pared celular
2	66 kD	<i>pbpA</i>	transpeptidasa transglicosilasa (asociada con RodA)	mantenimiento de la forma bacilar, síntesis de mureína de la pared celular
3	60 kD	<i>ftsI</i>	transglicosilasa transpeptidasa	síntesis de mureína del septo
4	49 kD	<i>dacB</i>	DD-endopeptidasa DD-carboxipeptidasa	remodelado de mureína
5	42 kD	<i>dacA</i>	DD-carboxipeptidasa	remodelado de mureína
6	40 kD	<i>dacC</i>	DD-carboxipeptidasa	remodelado de mureína

En base a estudios realizados con mutantes y con β -lactamas que se unen específicamente a determinadas PBPs de alto peso molecular, se les han asignado diferentes funciones durante el proceso de síntesis de la mureína. Se ha determinado que PBP 1A y 1B son las enzimas responsables de la síntesis de mureína durante la elongación de la pared celular (Spratt, 1975), mientras que PBP 2 cumple con la función de mantenimiento de la forma bacilar durante ese proceso (Spratt, 1975; Spratt y Pardee, 1975). Por otra parte, la síntesis de la mureína que constituye el septo durante la división celular sólo requiere la actividad de PBP 3 (Spratt, 1975; Spratt, 1977; Botta y Park, 1981).

Aunque esos son los roles atribuidos a PBP 1A, PBP 1B y PBP 2, se han obtenido recientemente resultados que no están de acuerdo con esa asignación (Wientjes y Nanninga, 1991). En el modelo elaborado por esos autores, se intenta explicar la función específica de las PBPs de alto peso molecular en la síntesis de mureína. Según este modelo, las PBP 1A y 1B sintetizan iniciadores de mureína (cadenas hidrocarbonadas) que son continuados por PBP 2 en el cuerpo de la bacteria y por PBP 3 en la zona de septación, produciéndose posteriormente la unión de esas cadenas a través de los puentes peptídicos.

De hecho, durante el ciclo celular bacteriano se observan dos procesos morfogenéticos diferentes: la elongación celular y la septación, y existen varios modelos para explicar de qué manera las PBPs intervienen en esos procesos y cómo, a través de ellos, se regula la división y la forma celular. Según uno de los modelos propuestos, ambos procesos se alternarían, de manera tal que la forma celular resultaría del balance entre ambos (Satta y col., 1979). Este modelo es avalado por el descubrimiento de Woldringh y col. (1987) de que PBP 2 y PBP 3, enzimas responsables de la elongación y septación, respectivamente, actúan en forma alternada.

Por otra parte, a las evidencias de que PBP 3 utiliza preferentemente tripéptidos como aceptores en la transpeptidación (Beck y Park, 1976), se han sumado datos recientes que demuestran que aquellos procedimientos o condiciones que remueven las D-alaninas terminales de los grupos peptídicos laterales, aumentando así la proporción de tripéptidos en relación a pentapéptidos, favorecen la septación (Begg y col., 1990). Por el contrario, el incremento de actividad de MurF, enzima que convierte tripéptidos en pentapéptidos por adición de D-alanil:D-alanina, bloquea la septación, presumiblemente por reducción de los tripéptidos disponibles para PBP 3 (Meugin-Lecreux y col., 1989). Asimismo, el aumento de PBP 5

(DD-carboxipeptidasa que remueve D-alaninas terminales convirtiendo a los pentapéptidos en tripéptidos) hace que las células adopten forma esférica por inhibición del sistema de elongación (Markiewicz y col., 1982). En base a estas evidencias se ha elaborado un modelo que propone que los procesos de elongación y septación utilizan distintos precursores, siendo aquellos portadores de cadenas de tripéptidos preferentemente usados por PBP 3 para la septación, mientras que los pentapéptidos serían utilizados por PBP 2 en la elongación. Por ello, la variación en la proporción entre los dos tipos de precursores, dada por el balance entre las actividades enzimáticas de las PBPs de bajo peso molecular, determinaría la elongación o la división de la célula (Begg y col., 1990). Este modelo es compatible con la hipótesis inicialmente propuesta por Satta y col. (1979).

II. División y forma celular en *S. typhimurium* y *E. coli*

El ciclo celular en *S. typhimurium* y *E. coli* es un proceso que involucra varias etapas. Las células crecen manteniendo la forma bacilar hasta alcanzar una cierta masa crítica; en ese momento, se inicia la replicación del cromosoma. Los cromosomas hijos son entonces dirigidos hacia los polos de la célula, en un proceso denominado partición. La citocinesis comienza con la formación de un anillo en la zona central de la célula que es el lugar donde se producirá la invaginación coordinada de todas las capas de la pared celular (septación). Finalmente, las células hijas se separan. Aunque aparentemente simple, este proceso requiere una fina y compleja regulación que asegure la coordinación de los diferentes pasos y permita su exitosa realización.

1. Control genético de la división celular

La división celular en bacterias gram negativas requiere la invaginación coordinada de las tres capas de la pared celular en un lugar específico y en un momento determinado del ciclo celular. Aparentemente, no se requieren demasiadas proteínas para llevar a cabo este proceso; en *E. coli* el grupo de proteínas básicas de división celular incluye a PBP 3, FtsQ, FtsA, FtsZ, FtsW y EnvA. Los genes que codifican estas proteínas forman parte del operon *mra*, ubicado en el minuto 2 del mapa genético (Figura 2).

La división celular está estrechamente asociada a la duplicación del cromosoma bacteriano. La replicación del ADN requiere una adecuada cantidad de la proteína iniciadora DnaA, que se une a la zona *oriC* y separa las dos cadenas de ADN en dicho lugar permitiendo el acceso de las enzimas replicativas (Mc Macken y col. 1987). Los cromosomas hijos son decatenados por acción de la DNA girasa y la topoisomerasa IV (Steck y Drlica, 1985; Kato y col., 1990). La separación de los cromosomas recién sintetizados (partición) ocurre en presencia de las proteínas MukA y MukB, que funcionarían en forma análoga al aparato mitótico de eucariotas (Hiraga y col., 1989; Niki y col., 1991).

Una vez alcanzada una distancia predeterminada entre los cromosomas hijos, se hace disponible, en el plano ecuatorial de la célula, el sitio de división celular. En ese lugar, la proteína FtsZ, que se encuentra dispersa en gran cantidad en el citoplasma, se polimeriza formando un anillo alrededor de la superficie interna de la membrana citoplasmática (Bi y Lutkenhaus, 1991). Posteriormente a la formación del anillo se requiere una cantidad determinada de las proteínas FtsA y FtsQ (Begg y col., 1985; Carson y col., 1991; Dai y Lutkenhaus, 1992), en una función que se desconoce. Se ha observado que la transcripción del gen *ftsZ* es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento y se ha sugerido que la

producción de transcritos a partir de dicho gen está regulada por la replicación cromosómica, de manera que por cada ciclo de división se produce una cantidad fija de moléculas FtsZ, independientemente del tamaño celular, formándose así sólo un anillo por cada par de cromosomas recientemente replicados (Donachie, 1993); la regulación de los genes *ftsQ* y *ftsA* podría estar controlada en forma similar a *ftsZ*. El mecanismo de este tipo de regulación dependiente de la tasa de crecimiento aún no ha sido aclarado. Como posibles reguladores del operon *ftsQAZ* se han propuesto algunos efectores globales cuya concentración está inversamente relacionada con la velocidad de crecimiento (ppGpp, el factor σ^s), pero aún no se ha demostrado su participación en este mecanismo (Vinella y col., 1993; Hengge-Aronis, 1993).

Una vez formado el anillo FtsZ, la mureína crece hacia el interior como una doble capa unida covalentemente (septo) gracias a la actividad de la transglicosilasa-transpeptidasa específica PBP 3, tal vez en asociación con otra proteína transmembrana, FtsW (Matsushashi y col., 1990).

La formación del septo en el lugar correcto está asegurada por un grupo de 3 proteínas, productos del operon *min*, que evitan la septación cerca de los polos celulares (de Boer y col., 1989; Rothfield y col., 1990; de Boer y col., 1992). La proteína MinC, activada por MinD, evita la división en cualquier sector de la célula (probablemente, por interacción directa con FtsZ), salvo que la proteína MinE esté presente. En este caso, que corresponde a la situación normal, la división es evitada en los polos de la célula pero no en el centro.

Durante su formación, el septo se va separando en dos capas, proceso que requiere de la proteína EnvA (Wolf-Watz y Normark, 1976). La membrana externa acompaña a las capas de mureína que se están separando, y se une a ellas a través de la previamente mencionada lipoproteína de Braun.

2. Control genético de la forma celular

De la misma manera que el proceso de división celular, el mantenimiento de la forma bacilar en *E. coli* y *S. typhimurium* también está regulado genéticamente.

El antibiótico β -lactámico mecilinam (Lund y Tybring, 1972) es capaz de unirse específicamente a PBP 2 (Spratt y Pardee, 1975), enzima a la que se atribuye la función de mantenimiento de la forma bacilar ya que cuando una cepa salvaje es puesta en contacto con esa β -lactama, las células adoptan forma esférica, y, finalmente, según la concentración del antibiótico, lisan (Melchior y col., 1973; Matsushashi y col., 1974).

En forma casual, pero sobre todo mediante el aislamiento de mutantes resistentes a mecilinam, se han obtenido cepas que presentan forma esférica independientemente de la presencia del antibiótico (Normark, 1969; Iwaya y col., 1978; Antón y col., 1983). El estudio de estas cepas permitió el descubrimiento de varios genes relacionados con el mantenimiento de la forma en enterobacterias: las mutaciones en los mismos determinan que la bacteria cambie su forma bacilar a esférica.

En *E. coli* se han descrito dos grupos de genes relacionados con la forma celular. Uno de ellos, ubicado en el minuto 14, y formado por los genes *rodA* y *pbpA* (también llamados *mrdB* y *mrdA*, respectivamente) (Spratt y col., 1980; Tamaki y col., 1980) ha sido también identificado en *S. typhimurium* (Antón y col., 1983; Costa y Antón, 1992; Costa y Antón, datos no publicados). El otro grupo, en el minuto 71, corresponde a un gen inicialmente conocido como *envB* en *E. coli* y *S. typhimurium* (Westling-Häggström y Normark, 1975; Antón y col., 1983). Posteriormente, se demostró en *E. coli* que este grupo comprende a los genes *mreB*, *mreC* y *mreD* (Doi y col., 1988; Wachi y col., 1989), involucrados en el control de la forma celular y sensibilidad a mecilinam.

En *S. typhimurium* se han aislado, además, mutantes esféricos sin utilizar mecilina como agente selectivo, en cepas que son capaces de formar filamentos por desrepresión del operon histidina (Wyche y col., 1974; Antón, 1979). Este método permitió el descubrimiento de otro gen involucrado en la forma celular, *divD*, ubicado en el minuto 54. En *E. coli* no se ha encontrado este tipo de mutantes ya que no son resistentes a mecilina (Antón y col., 1983); sin embargo, el hecho de que un mutante *divD* de *S. typhimurium* pueda ser complementado por la región homóloga de *E. coli* (Wyche y col., 1974) indica que el gen *divD* también está presente en esta especie.

Salvo el gen *divD*, el resto de los genes mencionados han sido clonados, secuenciados y expresadas sus proteínas. El gen *pbpA* codifica la proteína PBP 2 (Spratt y col., 1980), responsable del mantenimiento de la forma bacilar durante la elongación, y con el gen *rodA*, cuyo producto, la proteína RodA, es requerida por PBP 2 para llevar a cabo su actividad de transglicosilasa, constituye una unidad transcripcional (Matsuzawa y col., 1989). En cuanto a los productos de los genes *mreB*, *mreC* y *mreD*, son proteínas de 37, 40 y 15 kD, respectivamente (Doi y col., 1988; Wachi y col., 1989), cuya función aún se desconoce. Se ha observado que MreB presenta un dominio de ATPasa que también se encuentra en FtsA así como en las proteínas eucarióticas actina, hexoquinasa y proteínas de "heat shock" hsp 70 (Bork y col., 1992). La observación de que un mutante *mre* es capaz de elevar la producción de β -galactosidasa en una fusión del operón lactosa al gen *ftsI*, que codifica la PBP 3, llevó a proponer un control regulatorio negativo de *mre* sobre *ftsI*, y de esta manera sobre la división celular (Wachi y Matsuhashi, 1989).

Otro gen relacionado con el control de la forma bacteriana es el gen *boIA*. Ese gen es el responsable de la normal disminución de tamaño que se observa cuando un cultivo se acerca a la fase estacionaria de crecimiento (Aldea y col.,

1988), y se ha observado que resulta necesario para la alta expresión de PBP 6 que se observa en esa fase (Aldea y col., 1989). Como ya se mencionara, PBP 6 cataliza la remoción de la D-alanina terminal de las cadenas laterales de pentapéptidos de la mureína, determinando el aumento de tripéptidos, preferentemente utilizados por la PBP 3 para sintetizar el septo. El incremento del nivel de PBP 6 por acción de *bo/A* cuando las células entran en fase estacionaria sugiere que *bo/A* actuaría favoreciendo la división celular, lo que explicaría la formación de bacilos mucho más cortos que los observados en fase exponencial (Aldea y col., 1989).

En la Figura 1 se muestran los principales pasos, así como los genes involucrados, del ciclo morfogénético y división celular en *E. coli*, especie con la que se cuenta con la mayor cantidad de datos disponibles. En la Figura 2 puede observarse la localización cromosómica de dichos genes en *E. coli* y *S. typhimurium*

Figura 1. Morfogénesis y división celular en *E. coli*

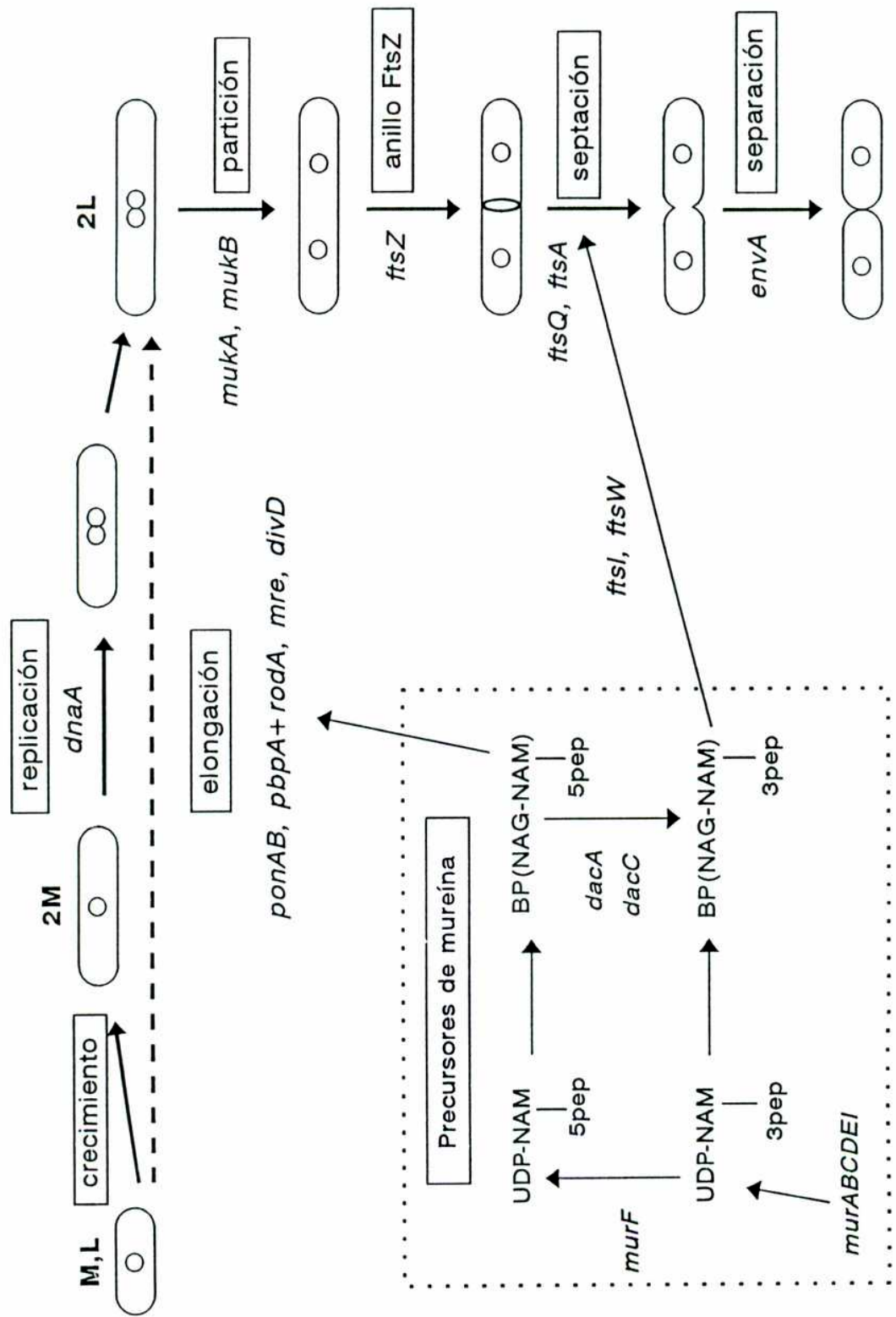


Figura 1. (continuación)

La figura, adaptada de Donachie (1993), muestra los principales pasos del ciclo celular y morfogénesis en *E. coli*.

Referencias:

UDP-NAM-3pep o -5pep: UDP-N-acetilmuramil tripéptido o pentapéptido.

BP(NAG-NAM)-3pep o -5pep: bactoprenil N-acetilglucosaminil:N-acetilmuramil tripéptido o pentapéptido.

3pep: cadena peptídica constituida por L-alanina, ácido D-glutámico y ácido meso-diaminopimélico.

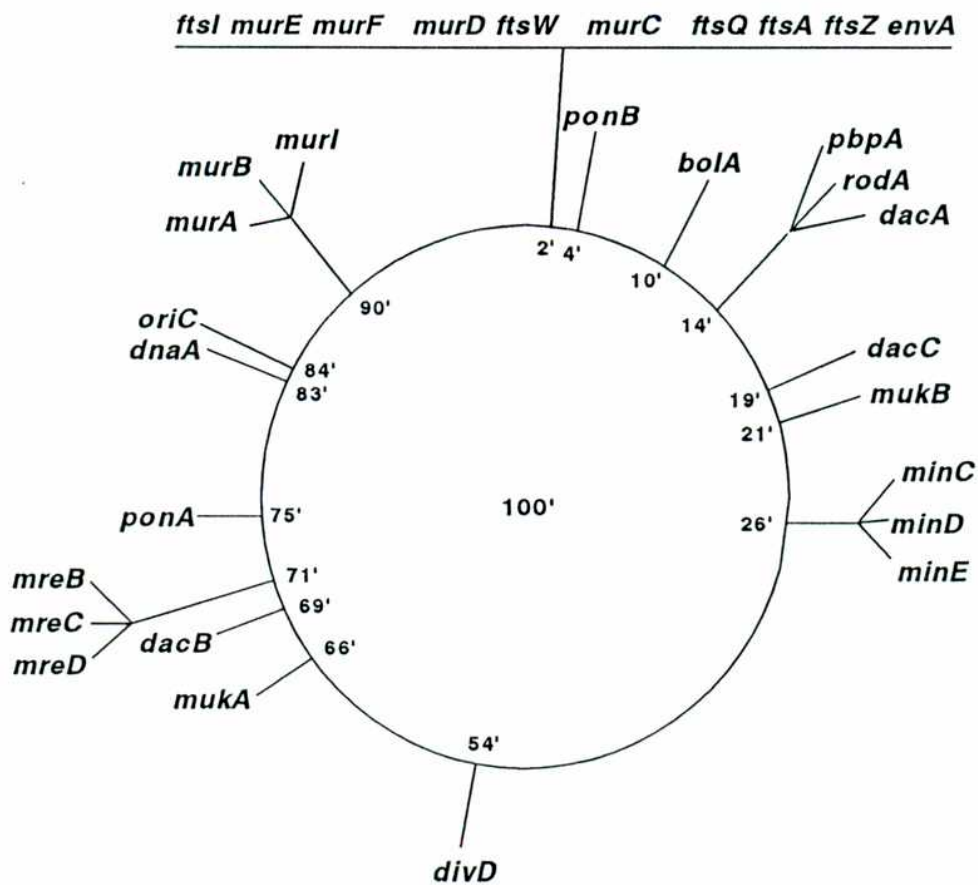
5pep: igual a 3pep, pero con dos moléculas de D-alanina terminales.

L: longitud celular inicial.

M: masa celular inicial.

Los genes *murABCDEI* son los responsables de la síntesis de UDP-NAM-3pep. La enzima MurF adiciona D-alanil:D-alanina a la cadena tripeptídica de ese compuesto, obteniéndose el precursor UDP-NAM-5pep. Los compuestos BP(NAG-NAM)-3pep y BP(NAG-NAM)-5pep se sintetizan en el citoplasma a partir de los precursores correspondientes, y atraviesan la membrana citoplasmática para actuar en el periplasma como sustrato de las PBPs. Según el modelo propuesto (Begg y col., 1990), el precursor BP(NAG-NAM)-5pep es utilizado por PBP 2 (producto del gen *pbpA*) en la síntesis de mureína durante la elongación, mientras que PBP 3 (producto del gen *ftsI*) utiliza el precursor 3pep. El compuesto BP(NAG-NAM)-5pep, por acción de las carboxipeptidasas PBP 5 y PBP 6 (productos de los genes *dacA* y *dacC*, respectivamente), pierde las dos alaninas terminales de la cadena peptídica originando su similar 3pep.

Figura 2. Genes de división y forma celular de *E. coli* y *S. typhimurium*



La ubicación en el mapa genético de los genes mencionados (la mayoría de los cuales, hasta ahora, se han identificado sólo en *E. coli*) fue tomada de los trabajos de Bachmann (1991) y Sanderson y Roth (1988).

3. Resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones letales de forma celular

Entre las cepas seleccionadas por resistencia a mecilinam, se han obtenido, además de mutantes esféricos, cepas que mantienen su forma bacilar normal en ausencia del antibiótico, pero que son capaces de crecer, como células esféricas, con concentraciones de mecilinam que impiden el desarrollo del tipo salvaje.

Este tipo de mutantes es frecuente y varios han sido estudiados tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*. Sin embargo, no en muchos se ha identificado el gen responsable de la resistencia al antibiótico.

En *E. coli* K-12 se ha observado que las mutaciones *cya* o *crp*, que afectan, respectivamente, la síntesis o función del AMP cíclico (cAMP) confieren resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones letales de forma (Aono y col., 1979; Ogura y col., 1989). A pesar de la gran semejanza entre *E. coli* y *S. typhimurium*, se encontró que los mutantes *cya/crp* de la segunda especie mantienen su sensibilidad a mecilinam aunque sí muestran tolerancia (Costa y Antón, 1992). Esta aparente discrepancia ha quedado aclarada al demostrarse recientemente que si bien, aisladamente, las mutaciones que afectan al lipopolisacárido (LPS), al gen *spoT*, responsable de la degradación y síntesis minoritaria de ppGpp, y al sistema cAMP/CRP, no confieren resistencia a mecilinam, la presencia simultánea de mutaciones de al menos dos de esos tipos resulta en alto nivel de resistencia (Antón, 1995). Dado que *E. coli* K-12 es naturalmente portadora de una mutación de LPS (Liu y Reeves, 1994), los mutantes *cya/crp* de esta bacteria son dobles mutantes, y por lo tanto resistentes a mecilinam, en tanto que los correspondientes mutantes *cya/crp* de *S. typhimurium*, que es una cepa con LPS normal, son mutantes simples y mantienen su sensibilidad.

En ambas especies, se han obtenido cepas portadoras de mutaciones en aminoacil-tARN sintetasas, las enzimas responsables del cargado de cada aminoácido en su correspondiente tARN. En estas cepas se ha demostrado que la resistencia y la tolerancia eran debidas al incremento en la concentración de ppGpp, efector de la respuesta estricta (Cashel y Rudd, 1987), causada por la disminución de tARN cargado (Vinella y col., 1992; Joseleau-Petit y col., 1994; Costa, esta tesis)

Por otra parte, en *E. coli*, la superproducción de la proteína de división celular FtsZ confiere resistencia a mecilinam y tolerancia a la inactivación de PBP 2 (Vinella y col., 1993), y en *S. typhimurium* se ha demostrado recientemente que los genes reguladores de la biosíntesis de cisteína (*cysB* y *cysE*) están involucrados en la sensibilidad al antibiótico pues se han aislado mutaciones en esos dos genes que causan resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones letales de forma (Oppezzo y Antón, 1995).

A pesar de que los mutantes de forma celular son perfectamente viables y su crecimiento es normal, se ha demostrado por transducción que ciertas mutaciones *mre* y *rodA* de *S. typhimurium* son excluidas por receptoras de genotipo salvaje, siendo sí toleradas por cepas portadoras de mutaciones que confieren resistencia a mecilinam (Antón, 1987; Costa y Antón, 1992). Coincidentemente, Ogura y col. (1989), observaron que en *E. coli* K-12 la inactivación del gen *pbpA* por inserción de un cassette de kanamicina resulta en una mutación letal que sólo es viable en cepas *cya* o *lov-1*, ambas resistentes a mecilinam.

La aparente viabilidad de las mutaciones comunes *mre*, *rodA* y *pbpA* se debe, en muchos casos, a la presencia simultánea en las cepas de mutaciones secundarias, ligadas o no a la de forma, que confieren resistencia a mecilinam y tolerancia (Antón, 1987). No puede descartarse, tampoco, que algunas

mutaciones de forma alteren este caracter afectando sólo parcialmente la viabilidad.

Las evidencias presentadas indican que los productos de los genes *rodA*, *mre* y *pbpA* desempeñan dos papeles durante el ciclo celular: a) el mantenimiento de la forma bacilar, no vital para el crecimiento bacteriano, y, b) una o más funciones esenciales, de naturaleza aún desconocida, cuya inactivación es letal en cepas salvajes pero es tolerada por cepas portadoras de mutaciones de resistencia a mecilinam.

III. Fases del crecimiento bacteriano: la fase estacionaria

En un cultivo cerrado, una población no puede crecer en forma indefinida con ritmo exponencial. La limitación del crecimiento se produce por agotamiento de algún nutriente esencial o por acumulación de algún producto metabólico tóxico. El período en el que cesa el crecimiento de una población se ha denominado fase estacionaria. En condiciones naturales, las células bacterianas pasan la mayor parte de su existencia bajo condiciones de privación nutricional, en las cuales no son posibles altas tasas de crecimiento. Este estado se asemeja al estado de fase estacionaria definido para cultivos de laboratorio.

Si bien *E. coli* o *S. typhimurium* no muestran los cambios morfológicos evidentes característicos de bacterias capaces de formar esporas, en situaciones de estrés como las que se observan en fase estacionaria (carencia de nutrientes, acumulación de metabolitos tóxicos) también ocurren cambios globales en el patrón de expresión génica que permiten a las células alcanzar un estado de máxima resistencia que les permitirá sobrevivir durante prolongados períodos de abstinencia.

Los estudios de transcripción de genes inducidos por carencia nutricional, así como el patrón de proteínas sintetizadas durante la entrada en fase estacionaria, han permitido identificar en *E. coli* un gran número de genes cuya expresión se manifiesta en dicha fase (Groat y col., 1986; Lange y Hengge-Aronis, 1991) y se ha observado que muchos de ellos están controlados por un regulador global codificado por el gen *rpoS* (Lange y Hengge-Aronis, 1991).

El gen *rpoS* fue descubierto independientemente por varios investigadores como mutaciones regulatorias en el minuto 59 que afectaban diferentes procesos: resistencia a ultravioleta cercano (*nur*) (Tuveson, 1981), producción de fosfatasa ácida (*appR*) (Touati y col., 1986), producción de catalasa HPII (*katF*) (Loewen y Triggs, 1984), etc. Se determinó que todas esas mutaciones afectaban al mismo locus, denominado *rpoS* (Lange y Hengge-Aronis, 1991) y la secuencia nucleotídica del mismo demostró una gran homología con el gen *rpoD*, que codifica al factor σ^{70} , el principal factor sigma de la ARN polimerasa de *E. coli*, lo que sugirió que *rpoS* se trataba de un factor sigma de reconocimiento de promotores (Mulvey y Loewen, 1989). El factor sigma bacteriano es la subunidad de la ARN polimerasa responsable de la iniciación de la transcripción por unión al núcleo de la ARN polimerasa (constituído por dos subunidades α , una subunidad β y una subunidad β'), posterior reconocimiento de una secuencia promotora específica, y formación del complejo abierto necesario para iniciar la transcripción. Recientemente se ha confirmado que el producto de *rpoS*, llamado σ^5 , actúa *in vitro* como un factor sigma (Tanaka y col., 1993; Nguyen y col., 1993).

Se ha observado que al menos 30 proteínas requieren del gen *rpoS* para su expresión y que muchas de ellas son fundamentales en el desarrollo del estado de resistencia observado en fase estacionaria (Mc Cann y col., 1991). En poco tiempo se identificó un gran número de genes dependientes de *rpoS* dispersos por todo el cromosoma, cuyos productos desempeñan una amplia variedad de

funciones en dicha fase. En la Tabla II se muestra una lista parcial de genes dependientes de *rpoS*, con sus productos y función (Hengge-Aronis, 1993).

Tabla II. Genes dependientes de *rpoS*

Gen	Producto	Función
Morfología <i>bolA</i>	BolA	Reducción del tamaño celular
Estrés oxidativo <i>xthA</i>	Exonucleasa III	Reparación de daño en ADN por estrés oxidativo o radiación UV
<i>katE</i>	Catalasa HPII	Descomposición del H ₂ O ₂
<i>dps</i>	Dps	Formación de complejos con ADN <i>in vitro</i> , regulación de expresión génica
Estrés osmótico <i>otsA</i>	Trehalosa-6-fosfato sintetasa	Síntesis del protector osmótico trehalosa
<i>otsB</i>	Trehalosa-6-fosfatasa	Síntesis del protector osmótico trehalosa
<i>treA</i>	Trehalasa	Utilización de trehalosa
Antibióticos operón <i>mcc</i>	Microcina C7	Antibiótico (inhibidor de síntesis de proteínas)
Patogénesis operón <i>csgAB</i>	Curli (fibras de la superficie bacteriana)	Unión a tejidos eucarióticos
<i>spv</i>	Spv	Virulencia
Otros operón <i>hdeAB</i>	HdeA y HdeB (proteínas periplásmicas)	Desconocida

Para que se produzca la inducción del regulón *rpoS* en fase estacionaria deben reconocerse las condiciones de estrés, de manera que éstas se traduzcan en la producción de un σ^S activo. Se han propuesto varios candidatos como señales de

activación del regulón. Por ejemplo, pequeñas fluctuaciones en el ΔpH o $\Delta\Psi$ podrían ser señales para sensores regulatorios que las transducirían a la maquinaria celular como privación de nutrientes (Siegele y Kolter, 1992). Recientemente se ha propuesto a ppGpp, nucleótido que se acumula en ciertas condiciones de privación de aminoácidos o fuentes de energía y es el efector de la denominada respuesta estricta (Cashel y Rudd, 1987), como factor determinante de la síntesis de σ^s (Gentry y col., 1993). Mediante el uso de fusiones génicas se ha observado que el acetato, metabolito normalmente acumulado hacia el final de la fase logarítmica en algunos medios, es capaz de inducir la transcripción del gen *rpoS* aún en fase exponencial (Mulvey y col., 1990) y similar resultado se obtuvo con benzoato (Schellhorn y Stones, 1992). Por otra parte, también la homolactora serina, un metabolito sintetizado a partir de intermediarios de la síntesis de treonina, es capaz de inducir *rpoS* (Huisman y Kolter, 1994).

Lange y Hengge-Aronis (1994) han demostrado que la expresión de σ^s está sujeta a control transcripcional, traduccional y post-traduccional que determinan que su inducción, producida a mediados de la fase logarítmica, alcance su nivel máximo en fase estacionaria. En ese trabajo, los autores proponen un modelo para la compleja regulación de *rpoS*: su transcripción sería estimulada por una reducción en la tasa de crecimiento, mientras que su traducción podría inducirse por señales relacionadas con la densidad celular o la osmolaridad del medio. Además, alguna señal indicando carencia de nutrientes actuaría estabilizando a la proteína σ^s , que es sumamente inestable en fase logarítmica.

En *S. typhimurium*, el análisis de proteínas por electroforesis bidimensional también indicó la presencia de genes inducidos por situaciones de carencia nutricional (Spector y col., 1986). Fang y col. (1992) han reportado la presencia del gen *rpoS* en esa especie y demostraron su rol en la regulación de los genes

de virulencia *spv*. Asimismo, en un trabajo reciente, también en ese microorganismo se constató la necesidad del factor σ^5 en la regulación de la expresión de fusiones génicas que responden a privación nutricional (O'Neal y col., 1994). La comparación de las secuencias nucleotídicas de los genes *rpoS* de *E. coli* y *S. typhimurium* ha demostrado un alto grado de conservación, aunque existen diferencias significativas en las zonas regulatorias extragénicas (Prince y col., 1994).

Los dos principales factores σ presentes en fase vegetativa en *E. coli* y *S. typhimurium* (σ^{70} y σ^5) son muy similares en cuanto a sus dominios de reconocimiento de promores (Mulvey y Loewen, 1989; Lonetto y col., 1992), lo que indica que deberían reconocer secuencias muy similares (Tanaka y col., 1993; Hengge-Aronis, 1993). No se ha encontrado todavía una secuencia consenso para promotores dependientes de σ^5 , y aún se desconoce cuántos de ellos están directamente controlados por ese factor. Existen otros factores σ minoritarios que transcriben genes poseedores de secuencias promotoras muy distintas de las reconocidas por σ^{70} , lo que determina que sólo sean transcritos por su factor σ específico. Entre esos genes, que responden a condiciones ambientales muy precisas, se encuentran los genes de "heat shock" (Gross y col., 1990), genes de carencia de nitrógeno (Kustu y col., 1989), y genes de síntesis de flagelos y quimiotaxis (Arnosti y Chamberlin, 1989). La gran similitud entre σ^{70} y σ^5 , así como la existencia de promotores (dependientes o no de *rpoS*) transcritos tanto con σ^{70} como con σ^5 (Tanaka y col., 1993; Nguyen y col., 1993) plantea la duda acerca de la existencia de promotores reconocidos exclusivamente por σ^5 . En estudios de transcripción *in vitro*, se ha demostrado que el promotor del gen *fic-pabA* (relacionado con la síntesis de *p*-aminobenzoico), cuya expresión se incrementa en fase estacionaria, es casi exclusivamente reconocido por σ^5 (Tanaka y col., 1993). En estudios del mismo tipo, se demostró que si bien el gen

de fase estacionaria *bolA* es transcripto tanto por σ^{70} como por σ^s , las holoenzimas formadas con uno u otro factor tendrían diferente afinidad por la secuencia promotora, ya que la transcripción con σ^s es mucho más intensa (Nguyen y col., 1993). Los autores de este trabajo sugieren que la diferencia de afinidad entre ambos factores por el promotor de *bolA* podría deberse a algún componente actuando en *cis* (secuencia, número de bases entre las zonas de reconocimiento del factor σ o conformación del ADN de dicho promotor). Sin embargo no queda claro porqué ese promotor no se expresa en fase exponencial, dado que puede ser reconocido por σ^{70} , aunque es probable que dicha transcripción se evite, *in vivo*, por factores que actúen en *trans* (Nguyen y col., 1993).

En un trabajo reciente se demostró que los promotores de los genes *bolA* y *katE*, ambos dependientes de *rpoS*, no son transcritos por σ^{70} , *in vivo* (Arnqvist y col., 1994). A diferencia de esos genes, en el mismo trabajo se observó que los operones *csgAB* y *hdeAB*, ambos dependientes de *rpoS*, pueden ser transcritos *in vivo* mediante la holoenzima σ^{70} si no está presente la proteína asociada al nucleoide H-NS. Los autores proponen que un grupo de promotores dependientes de *rpoS* pueden ser reconocidos tanto por σ^{70} como por σ^s *in vivo*, pero que la interacción de H-NS con esas secuencias evitaría la iniciación de la transcripción vía σ^{70} durante la fase estacionaria.

Si bien se han realizado interesantes descubrimientos acerca de la fisiología de *S. typhimurium* y *E. coli* en fase estacionaria, recién comienzan a investigarse las bases moleculares que modulan su expresión. *rpoS* es probablemente el primero de una serie de genes que controlan la expresión en dicha fase, y aún queda mucho por averiguar con respecto a los complejos mecanismos regulatorios en los cuales se encuentra involucrado.

Objetivos

En este trabajo se encaró el estudio de la tolerancia a mutaciones letales de forma celular con el propósito de investigar la función vital de los genes involucrados en el mantenimiento de la forma durante el crecimiento bacteriano.

Con ese propósito, se aislaron mutantes esféricos utilizando el método de mutagénesis por transposición, para lograr mutaciones absolutas y evitar el uso de mecilinam como agente selectivo. Los mutantes obtenidos fueron identificados genéticamente, y caracterizados en cuanto al requerimiento de mutaciones de tolerancia adicionales.

En una segunda parte, se caracterizó una cepa que presenta tolerancia condicional a mutaciones de forma. Esta cepa, aislada por resistencia a mecilinam dependiente de la temperatura, se identificó genéticamente y se estudiaron sus propiedades bioquímicas relacionadas con la resistencia al antibiótico y tolerancia.

Posteriormente, utilizando a la cepa tolerante condicional como receptora, se construyeron derivados portadores de diferentes tipos de mutaciones de forma por transposición y se estudió su comportamiento en condiciones de no-tolerancia. En base a los resultados obtenidos, se analizó el papel del gen *rpoS* en el comportamiento de los derivados portadores de mutaciones letales de forma celular en ausencia de tolerancia.

Materiales y Métodos

1. Cepas, bacteriófagos y plásmidos

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo son derivadas de *Salmonella typhimurium* LT2, a excepción de la cepa SF1005, que es un derivado de *S. typhimurium* ATCCC 14028s (tipo salvaje); sus orígenes y características genéticas se detallan en la Tabla III.

Las transducciones fueron realizadas con un derivado del bacteriófago P22, el fago HT105/1 *int 201* (Anderson y Roth, 1978), que posee bajo poder de lisogenización y alta frecuencia de transducción. Las pruebas de sensibilidad a fago se llevaron a cabo con H5, que es una variante virulenta del bacteriófago P22. Los plásmidos utilizados también se describen en la Tabla III.

2. Medios y drogas

Como medio completo se utilizó el medio L, que contiene 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona por litro de agua (Davis y col., 1980). Los medios mínimos fueron el medio E (Vogel y Bonner, 1956), adicionado con 0,5% de glucosa, y el medio M9 (Adams, 1959), con ácido succínico 50 mM como fuente de carbono. Los medios sólidos se obtuvieron agregando 15 g de agar por litro. En el caso del agar blando, se adicionó al medio líquido 7,5 g de agar por litro. Para la selección de la mutación *nalB411* se utilizó el medio completo BT (Hane y Wood, 1969).

La detección de marcadores *cya* y *crp* se llevó a cabo en agar eosina azul de metileno (EMB) con 1% de maltosa y 1% de xilosa como azúcares fermentables. Las pruebas de fermentación de trehalosa se realizaron en medio EMB con 1% de trehalosa como fuente de carbono.

En algunos experimentos de transducción se adicionó al medio ácido etilen-bis (oxy-etilennitrilo) tetraacético (EGTA), a una concentración 10 mM y pH 7, a fin de evitar la adsorción de fago (Davis y col., 1980).

Tabla III. Cepas y plásmidos utilizados

Cepa o plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
<i>S. typhimurium</i>		
LT2	tipo silvestre	Colección del laboratorio
<i>argC95</i>	<i>argC95</i>	K. E. Sanderson
<i>cysI23</i>	<i>cysI23</i>	K. E. Sanderson
GW1704	<i>hisD3052 mutS121::Tn10</i>	G. C. Walker
<i>hisW1509</i>	<i>hisW1509 rpoS1062</i>	Roth y col. (1966) vía P. E. Hartman
KS180	<i>hisF1009 trpC2 metA22 rpsL201 xylA1 zfi-2009::Tn10</i>	J. Somers
PP1037	<i>crp-773::Tn10 trpB223</i>	K. E. Sanderson
SA342	<i>lip-2 ara-9</i>	K. E. Sanderson
SA464	HfrK1, <i>serA13 rfa-3058</i>	K. E. Sanderson
SA722	HfrK10, <i>serA15 pur-268</i>	K. E. Sanderson
SA828	HfrK25, <i>serA15</i>	K. E. Sanderson
SB1294	<i>cysJ109 cysD125</i>	P. E. Hartman
SB2298	<i>hisF3031 trpA3</i>	P. E. Hartman
SF1005	<i>rpoS::Amp-R</i>	Fang y col. (1993) vía K. E. Sanderson
TN2500	<i>zae-1613::Tn10Δ16Δ17(Kan)</i>	C. Miller
TN2700	<i>leuBCD485 recA zfi-1623::Tn10dcam</i>	C. Miller
TS736	<i>hsdL6(r⁺m⁺) hsdSA29(r⁺m⁺)</i>	Palva y col. (1981) vía R. Nagel
TT521	<i>srl-202::Tn10 recA1</i>	J. Roth
TT2104	<i>cya961 zid-62::Tn10 argI539</i>	J. Roth
TT7542	<i>relA21::Tn10</i>	J. Roth
TT10423	<i>proAB47/F'128 pro⁺ lac⁺ zzf-1831::Tn10Δ16Δ17(Tet)</i>	J. Roth
TT10427	LT2/pNK972	J. Roth

Tabla III. (continuación)

Cepa o plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
DA79	F ⁺ <i>alaS206(Ts) pur-268</i>	DA1713 x SA722 ^a
DA529	<i>aroE32 galE1922 ara-9 mec-2</i>	Colección del laboratorio
DA773	Δ (<i>hisOG</i>)203 <i>leu-1259</i>	Colección del laboratorio
DA996	DA773 <i>mec-1</i>	Colección del laboratorio
DA1041	<i>mre-9 argR372::Tn10 mec-10</i>	Colección del laboratorio
DA1048	SB2298 <i>srl-202::Tn10</i>	Colección del laboratorio
DA1138	LT2 <i>alaS206(Ts)</i>	Colección del laboratorio
DA1228	<i>hisS6331 mec-11</i>	Colección del laboratorio
DA1294	<i>leuS3(Ts) argR372::Tn10 mec-10</i>	Colección del laboratorio
DA1302	LT2 <i>his-6883::Tn10Δ16Δ17(Tet)</i>	Este trabajo
DA1303	LT2 <i>leu-1265::Tn10Δ16Δ17(Tet)</i>	Este trabajo
DA1346	DA529 <i>rpsL125</i>	Colección del laboratorio
DA1347	<i>argC95 mec-6</i>	Este trabajo
DA1352	DA996 <i>mre-13::Tn10Δ16Δ17(Tet)</i>	Este trabajo
DA1360	TS736/pBS47	Este trabajo
DA1361	TS736/pLG346	Este trabajo
DA1362	LT2/pBS47	LT2 x P22.DA1360 ^a
DA1363	LT2/pLG346	LT2 x P22.DA1361 ^a
DA1366	DA996 <i>mre-17::Tn10Δ16Δ17(Kan)^b</i>	Este trabajo
DA1367	DA996 <i>divD135::Tn10Δ16Δ17 (Kan)^b</i>	Este trabajo
DA1368	DA996 <i>rodA22::Tn10Δ16Δ17(Kan)^b</i>	Este trabajo
DA1369	<i>cya-961 zid-62::Tn10</i>	LT2 x P22.TT2104 ^a
DA1370	<i>cya-961</i>	Derivado Tet-S de DA1369 ^c
DA1371	<i>crp-773::Tn10</i>	LT2 x P22.PP1037 ^a
DA1372	<i>crp-801</i>	Derivado Tet-S de DA1371 ^c
DA1410	SA342/pBS47	SA342 x P22.DA1360 ^a
DA1411	SA342/pLG346	SA342 x P22.DA1361 ^a

Tabla III. (continuación)

Cepa o plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
DA1413	<i>cya</i> ⁺ <i>zid-62</i> ::Tn10	LT2 x P22.TT2104 ^a
DA1414	<i>crp-802 trpB223</i>	Derivado Tet-S de PP1037 ^c
DA1415	TT10427 pero Amp-S	Este trabajo ^d
DA1420	<i>gal-1922 ara-9</i>	Colección del laboratorio
DA1480	<i>alaS206(Ts) galE1922</i>	Colección del laboratorio
DA1484	<i>alaS206(Ts) srl-202</i> ::Tn10	DA1138 x P22.TT521 ^a
DA1490	<i>alaS206(Ts) zfi-2009</i> ::Tn10 <i>galE1922</i>	DA1480 x P22.KS180 ^a
DA1491	<i>alaS206(Ts) relA21</i> ::Tn10	DA1138 x P22.TT7542 ^a
DA1525	<i>gal-1922 ara-9 zfi-1623</i> ::Tn10dcam	DA1420 x P22.TN2700 ^a
DA1526	<i>alaS206(Ts) zfi-1623</i> ::Tn10dcam	DA1138 x P22.TN2700 ^a
DA1527	<i>gal-1922 ara-9 alaS206(Ts) srl-202</i> ::Tn10	DA1420 x P22.DA1484 ^a
DA1528	KS180 <i>nalB411</i>	Este trabajo
DA1540	TS736/pTAC875N	Este trabajo
DA1674	DA1372 <i>rpsL125</i>	DA1372 x P22.DA1346 ^a
DA1677	<i>mutS121</i> ::Tn10 <i>rpoS</i> ::Amp-R	GW1704 x P22.SF1005 ^a
DA1682	DA1674 <i>rpoS1061</i>	Este trabajo
DA1683	DA1682 <i>mutS121</i> ::Tn10	DA1682 x P22.GW1704 ^a
DA1684	DA1138 <i>rpoS1061 mutS121</i> ::Tn10	DA1138 x P22.DA1683 ^a
DA1685	<i>rpoS1062 mutS121</i> ::Tn10	<i>hisW1509</i> x P22.GW1704 ^a
DA1687	DA1138 <i>rpoS1062 mutS121</i> ::Tn10	DA1138 x P22.DA1685 ^a
DA1697	TS736/pMMkatF3	Este trabajo
DA1700	<i>cysI23 rpoS</i> ::Amp-R	<i>cysI23</i> x P22.SF1005 ^a
DA1713	<i>alaS206(Ts) leu-1265</i> ::Tn10Δ16Δ17	DA1138 x P22.DA1303 ^a
DA1714	<i>alaS206(Ts) his-6883</i> ::Tn10Δ16Δ17	DA1138 x P22.DA1302 ^a
<i>E. coli</i>		
HB101/pMMkatF3	<i>hsdS20</i> (<i>r</i> _B ⁻ , <i>m</i> _B ⁻) <i>recA13 rpsL20/</i> pMMkatF3	P. C. Loewen

Tabla III. (continuación)

Cepa o plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
Plásmidos		
pBS47	<i>pbpA</i> ⁺ Kan-R	Stoker y col. (1983)
pLG346	<i>rodA</i> ⁺ Kan-R	Stoker y col. (1983)
pMMkatF3	<i>rpoS</i> ⁺ Amp-R	Mulvey y col. (1988)
pTAC875N	<i>alaS</i> ⁺ Amp-R	P. Schimmel

Abreviaturas: Amp, ampicilina; Cam, cloranfenicol; Kan, kanamicina; Mec, mecilinam; Tet, tetraciclina; S, sensible; R, resistente.

^a En los cruzamientos y transducciones, la primera cepa nombrada es la receptora y la segunda es la dadora

^b Las mutaciones *mre-17::Tn10Δ16Δ17*, *divD135::Tn10Δ16Δ17* y *rodA22::Tn10Δ16Δ17* también se mencionan como *mre-17*, *divD135* y *rodA22*.

^c Derivados Tet-S obtenidos de acuerdo al protocolo de Bochner y col. (1980).

^d Derivado Amp-S de TT10427 obtenido por pérdida del plásmido pNK972.

En los casos necesarios, se adicionaron a los medios los siguientes antibióticos: tetraciclina (50 µg/ml, más MgCl₂ 5 mM) (Antón, 1987), ampicilina (30 µg/ml), kanamicina (20 µg/ml), mecilinam (1 µg/ml), cloranfenicol (10 µg/ml), estreptomina (200 µg/ml), ácido nalidíxico (5 µg/ml).

3. Procedimientos genéticos

3.1. Transducción

Las transducciones se llevaron a cabo mezclando alícuotas de un cultivo en fase estacionaria (3×10^9 células/ml) con una suspensión de bacteriófago (10^{10} partículas/ml) a una multiplicidad de infección de aproximadamente 10. La mezcla se preincubó 30 minutos a 37°C y se esparció sobre una caja de medio selectivo, que se incubó durante 24-48 hs a la temperatura adecuada. En algunos casos de selección para transductantes prototróficos, la mezcla se centrifugó y luego se resuspendió en medio mínimo, previamente a esparcirla en la caja de medio selectivo. Una vez aparecidos los transductantes, se sometieron a reaislamientos sucesivos para obtener bacterias libres de fago. Se probó su sensibilidad a bacteriófago H5 y lisogenia y sólo se utilizaron en experimentos aquellas cepas que resultaron sensibles y no lisógenas.

3.2. Conjugación

Los cruzamientos se llevaron a cabo mezclando 0,1 ml de un cultivo logarítmico de la cepa dadora y 0,2 ml de un cultivo estacionario de la receptora. La mezcla se incubó durante una hora y se plaquearon diluciones apropiadas de cada cruzamiento en el medio selectivo correspondiente. Los recombinantes se reaislaron luego en el mismo medio de selección.

3.3. Transformación

Para la obtención del plásmido pMMkatF3 se utilizó el kit WizardTM para minipreparación de plásmidos (Promega), basado en el protocolo de Sambrook y col. (1989). Para ello, se partió de un cultivo estacionario en medio completo con ampicilina de la cepa *E. coli* HB101 portadora del plásmido pMMkatF3; las células se lisaron con una solución de NaOH 0,2 M, SDS 1% y el ADN cromosómico se separó por neutralización con acetato de potasio 1,32 M, pH 7,8. El resto de la preparación se mezcló con una resina para purificación de ADN y se pasó por una minicolumna provista por el kit. La columna se lavó con una solución de lavado (NaCl 200 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 5 mM), y luego de secar la resina por centrifugación de la minicolumna, el plásmido fue eluido en buffer TE pH 7,4 (Maniatis y col., 1982).

En el caso de los plásmidos pLG346, pBS47 y pTAC875N, el ADN se recibió liofilizado, y se resuspendió en 50 μ l de buffer TE pH 7,4.

La transformación con ADN plasmídico se realizó según el protocolo de Mandel e Higa (1970). Las células competentes se obtuvieron a partir de un cultivo exponencial de la cepa TS736 (Tabla III) de aproximadamente 5×10^7 células/ml. El cultivo se dejó 10 minutos a 0°C y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en la mitad del volumen original de CaCl₂ 50 mM y se dejaron 20 minutos en hielo. Se centrifugó nuevamente, se resuspendió en 1/15 del volumen original de CaCl₂ 50 mM y las bacterias se dejaron durante toda la noche a 4°C.

La transformación se llevó a cabo mezclando 40 μ l de células competentes con 40 μ l de ADN plasmídico; la mezcla se dejó durante 20 minutos en hielo y luego 2 minutos a 42°C. Se agregaron 0,3 ml de medio completo y se incubó durante 150 minutos a 37°C. Finalmente, se plaqueó todo el volumen en una caja de medio completo con el antibiótico cuya resistencia era codificada por el plásmido y se

incubó durante 24-48 hs a 37°C. Los transformantes fueron reaislados una vez en el mismo medio.

3.4. Complementación

Para las pruebas de complementación, se obtuvieron lisados en los derivados de TS736 portadores de los diferentes plásmidos; éstos fueron transferidos a las cepas de interés por transducción y selección de la resistencia codificada por el plásmido.

3.5. Cura del transposón Tn10

El aislamiento de derivados sensibles a tetraciclina (Tet-S) a partir de cepas portadoras de Tn10, que codifica resistencia a tetraciclina, se realizó siguiendo el protocolo de Bochner y col. (1980).

4. Pruebas de sensibilidad a bacteriófago H5 y lisogenia

Para las pruebas de sensibilidad a fago H5 se preparó una suspensión de células en 0,5 ml de agar blando fundido empleando bacterias tomadas de medio sólido o cultivos. Se colocó una gota de esta mezcla sobre 0,01 ml de una suspensión del bacteriófago H5 previamente absorbida en caja de medio completo y se incubó durante 24 horas: la aparición de una zona de lisis en el lugar con el fago indicó sensibilidad al mismo.

Para las pruebas de lisogenia, la cepa a estudiar se sembró en caja de medio completo, y luego de 24 horas de incubación, se mataron las células por exposición a vapores de cloroformo durante 10 minutos. Posteriormente, se vertió sobre la cepa una suspensión en agar blando fundido de la cepa salvaje LT2 (sensible a fago P22). Las cajas se volvieron a incubar 24 horas, considerándose lisógena a la cepa cuando aparecieron placas de lisis en la indicadora.

5. Obtención y caracterización de mutantes

5.1. Aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a mecilinam

Dada la relación existente entre resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma celular, las cepas tolerantes utilizadas se obtuvieron por aislamiento de derivados resistentes al antibiótico (Mec-R).

Para ello se esparció una dilución al décimo de un cultivo estacionario de la cepa en medio completo adicionado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de mecilinam. Las colonias Mec-R, originadas espontáneamente, aparecieron a las 24-48 hs de incubación a 37°C, a una frecuencia de aproximadamente 3×10^{-6} , y fueron reaisladas en el mismo medio antes de probarse su resistencia al antibiótico.

El ensayo de respuesta a mecilinam se llevó a cabo en dos formas diferentes. Una de ellas consistió en la medición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de mecilinam, y se realizó colocando 0,01 ml de una dilución de un cultivo estacionario (aproximadamente 10^3 células por muestra) en cajas de medio completo sin antibiótico y con concentraciones crecientes del mismo (factor 2; rango: 0,005 a 40 $\mu\text{g/ml}$). Las cajas se incubaron a la temperatura correspondiente durante 48 hs. Se consideró como CIM la menor concentración con menos colonias que el 10% de las células plaqueadas y sólo se tomaron como significativas diferencias entre CIMs de al menos 4 veces.

El otro test se llevó a cabo midiendo la sobrevida de la cepa en medio completo con 1 $\mu\text{g/ml}$ de mecilinam respecto de la sobrevida en medio sin el antibiótico.

Para el aislamiento de mutantes con resistencia condicional a mecilinam se esparció 0,1 ml de un cultivo de la cepa salvaje LT2 sobre cajas de medio con mecilinam (1 $\mu\text{g/ml}$), y se incubó una serie de cajas a 30°C y otra a 41°C. Luego de 48 horas de incubación, se picaron al mismo medio colonias sobrevivientes de cada temperatura, y se las replicó, en cajas con y sin mecilinam, que se incubaron a 30°C o 41°C. Se conservaron las cepas que presentaban crecimiento normal a

las dos temperaturas en medio sin el antibiótico, pero en medio con mecilinam crecían en forma diferencial según la temperatura

5.2. Aislamiento e identificación genética de mutantes esféricos obtenidos por transposición

La obtención de mutantes de forma por transposición se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Gibson y col. (1987). Para ello se utilizaron dos miniderivados del transposón Tn10, Tn10 Δ 16 Δ 17(Tet) y Tn10 Δ 16 Δ 17(Kan), que confieren resistencia a tetraciclina y kanamicina, respectivamente (Way y col., 1984). Estos transposones poseen deleciones en sus extremos por lo que carecen de la enzima transposasa, de manera que requieren de una fuente externa de esta enzima para su inserción al azar.

Primeramente, se transfirió a las cepas en las cuales se deseaba obtener las inserciones el plásmido pNK972, que lleva el gen que codifica la enzima transposasa. La transferencia del plásmido pNK972 se realizó por transducción de esas cepas con un lisado obtenido en la cepa TT10427, seleccionando resistencia a ampicilina.

Los experimentos de transposición se realizaron mediante transducciones entre receptoras portadoras de pNK972 y lisados de las cepas TT10423 (portadora del minitransposón Tet-R en un plásmido de *E. coli*) o TN2500 (portadora del minitransposón Kan-R insertado en el cromosoma). Los transductantes Tet-R constituyeron un pool de inserciones al azar y de origen independiente de Tn10 Δ 16 Δ 17 en el cromosoma de *S. typhimurium*. En el caso de los transductantes Kan-R, un cierto porcentaje eran recombinantes homólogos y no inserciones al azar, dada la ubicación original de Tn10 Δ 16 Δ 17 en el cromosoma bacteriano.

Para identificar en esas colonias aquellas en las cuales la inserción del transposón había ocurrido en un gen de forma, las cajas se examinaron con microscopio estereoscópico bajo luz oblicua que permite diferenciar las colonias formadas por células esféricas de las que contienen bacilos por el brillo característico de las primeras (Antón, 1987). Esta asignación fue confirmada examinando las células con microscopio de contraste de fase.

Con el propósito de inmovilizar el transposón, las mutaciones obtenidas fueron removidas de los transductantes originales y transferidas a una cepa que carece de la enzima transposasa. Para ello, se obtuvieron lisados en las colonias originales portadoras de inserciones en genes de forma y las mutaciones se transfirieron a la cepa DA996 por selección de transductantes Tet-R o Kan-R. A partir de este paso, se emplearon siempre derivados de los mutantes en cepas sin transposasa.

La identificación de los genes afectados por el transposón Tn10 Δ 16 Δ 17 en los mutantes esféricos se realizó primeramente analizando la cotransducción con marcadores ligados (Figura 3). Se realizaron transducciones entre lisados obtenidos en los mutantes esféricos y cepas portadoras de marcadores de auxotrofia cercanos a genes de forma. La aparición de un cierto porcentaje de colonias compuestas por células esféricas al seleccionar transductantes prototróficos con una determinada receptora indicó el gen de forma alterado en la dadora.

Aunque los genes *mre* y *aroE* no son cotransducibles por fago P22 (Antón, 1978), la cepa DA529 permitió obtener colonias *mre* al seleccionar transductantes *aroE*⁺ en medio mínimo. Las mutaciones *divD* se identificaron por transducción del alelo *hisS*⁺ (Wyche y col., 1974) a la cepa receptora DA1228 sobre medio mínimo. Las mutaciones *rodA* y *pbpA* se identificaron por selección, sobre medio completo a 41°C, del marcador *leuS*⁺ (Antón y col., 1983) con la cepa DA1294; en algunas

de estas mutaciones se confirmó la identificación por cotransducción con el marcador *lip* (Antón y col., 1983), seleccionando *lip*⁺ en M9 succínico con la cepa SA342.

Dado que *rodA* y *pbpA* son genes adyacentes (Spratt y col., 1980; Tamaki y col., 1980), los ensayos de cotransducción no permiten conocer cual de ellos lleva la mutación. Las inserciones Tet-R y Kan-R que mostraron cotransducción con la región *lip-leuS* se sometieron a pruebas de complementación para determinar el gen afectado. Se utilizaron plásmidos portadores de los genes *rodA*⁺ (pLG346) y *pbpA*⁺ (pBS47) de *E. coli* (Stoker y col., 1983), enviados por B.G. Spratt. Se multiplicó fago en las cepas DA1362 y DA1363 para transducir ambos plásmidos a los mutantes esféricos Tet-R, seleccionando resistencia a kanamicina. La recuperación de la forma bacilar por adquisición de uno de los plásmidos, indicó el gen afectado. Los mutantes Kan-R fueron clasificados utilizando fago crecido en ellos y posterior transducción del marcador *lip*⁺ a las cepas DA1410 y DA1411, sobre M9 succínico. Los transductantes esféricos *lip*⁺ parecieron sólo cuando la receptora era portadora del plásmido que no llevaba el alelo salvaje del gen (*rodA* o *pbpA*) afectado por la inserción.

En un grupo de mutantes pertenecientes al grupo *rodA-pbpA* se analizó el patrón de PBPs con el propósito de confirmar la clasificación genética, utilizando el método descrito por Spratt y Pardee (1975).

5.3. Aislamiento de mutantes auxótrofos por transposición

Se realizó una transducción entre la cepa LT2 y un lisado obtenido en un pool de inserciones al azar de Tn10Δ16Δ17(Tet). Las colonias obtenidas fueron barridas y resuspendidas en medio E sin glucosa. Una parte se diluyó y sembró en cajas de medio E con glucosa enriquecido con 1,25% de caldo nutritivo; otra parte se sometió a enriquecimiento con penicilina (200 µg/ml) y, luego de incubar

24 hs a 37°C en medio mínimo con glucosa, se diluyó y plaqueó igual que la anterior. Las colonias pequeñas (posibles auxótrofos) se probaron en medios mínimo y completo. El requerimiento de aquellas que no crecieron en medio mínimo se determinó por réplica sobre cajas con diversas combinaciones de aminoácidos. Se utilizaron dos de los mutantes auxótrofos obtenidos, DA1302 y DA1303, para la construcción de las cepas DA1713 y DA1714 (Tabla III), empleadas en el mapeo de la mutación responsable de la resistencia condicional a mecilinam de la cepa DA1138.

5.4. Obtención de mutantes *nalB*

Con el propósito de utilizar este marcador en el mapeo de la mutación de resistencia a mecilinam de DA1138, se procedió a aislar un derivado *nalB*. Las mutaciones en este gen, ubicado en el minuto 60 en el mapa genético de *S. typhimurium* (Sanderson y Roth, 1988), dan resistencia a bajos niveles de ácido nalidíxico ($\leq 5 \mu\text{g/ml}$) (Hane y Wood, 1969). Se partió de un cultivo estacionario de la cepa KS180 mutagenizado con dietilsulfato y las células se plaquearon en cajas de medio BT suplementado con $5 \mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico (Hane y Wood, 1969) que se incubaron a 37°C. Una de las colonias obtenidas mostró resistencia a $4 \mu\text{g/ml}$ y sensibilidad a $6 \mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico y presentó cotransducción entre dicha resistencia y el marcador *zfi-2009::Tn10*, ubicado en el minuto 58 del mapa de *S. typhimurium* (Sanderson y Roth, 1988). En base a estos resultados, la mutación responsable de la resistencia a ácido nalidíxico en esa cepa (DA1528) se denominó *nalB411*.

5.5. Aislamiento y caracterización de mutaciones *rpoS*

Las cepas *rpoS* se identificaron por su incapacidad de producir burbujeo intenso al aplicar sobre las mismas (crecidas en medio completo 24-48 hs.) 10 μ l de H₂O₂ 30% (Lange y Hengge-Aronis, 1991).

El aislamiento de la mutación *rpoS1061* se realizó de acuerdo al trabajo de Zambrano y col. (1993). Para ello, se sembró la cepa DA1674 en 3 ml de medio completo y se incubó a 37°C, con agitación; al cabo de 10 días se plaquearon diluciones del cultivo en cajas de medio completo para obtener colonias aisladas, y se probó su capacidad de descomposición del H₂O₂ 30%. De 40 colonias probadas, 8 mostraron respuesta negativa. La colonia elegida para su estudio (DA1682), demostró ser portadora de una mutación en el gen *rpoS*, a la que se denominó *rpoS1061*. El aislamiento de la mutación *rpoS1062* se describe en la sección V de Resultados.

Los ensayos de sensibilidad al H₂O₂ (Lange y Hengge-Aronis, 1991; Fang y col., 1992) se llevaron cabo agregando a cultivos estacionarios de las cepas a probar H₂O₂ a una concentración final de 40 mM. Se consideró como índice de sensibilidad al H₂O₂ al porcentaje de células capaz de formar colonias luego de 60 minutos de exposición al H₂O₂ respecto de la viabilidad a tiempo 0.

Las pruebas de fermentación de trehalosa se realizaron en medio EMB con 1% de trehalosa.

6. Ensayos de tolerancia

La tolerancia a mutaciones letales de forma celular fue analizada por transducción de la cepa con fago crecido en la cepa DA1041. Esta cepa es portadora del marcador *argR372::Tn10* y la mutación letal *mre-9* (inicialmente llamada *envB9*), que son cotransducibles en un 20% (Antón, 1987). La aparición

de al menos un 5% de transductantes Tet-R (*argR372::Tn10*) constituídos por células esféricas (*mre-9*) indicó tolerancia en la cepa receptora.

La tolerancia se probó también con mutaciones de forma generadas por transposición de Tn10 Δ 16 Δ 17 mediante la transducción con fago crecido en los mutantes de inserción y selección de Tet-R o Kan-R según el transposón causante de la mutación.

7. Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento a 30°C y 41°C se llevaron a cabo a partir de un cultivo en medio completo que se incubó hasta fase estacionaria en baño a 41°C, con agitación continua. Ese cultivo se diluyó en medio precalentado hasta una DO a 650 nm de 0,100 y se incubó en las mismas condiciones durante 150 minutos para obtener un cultivo exponencial. En ese momento, se repitió la dilución hasta una DO=0,100 y se fraccionó en dos partes iguales (tiempo 0), que se incubaron a 30°C o 41°C en baños con agitación continua.

Se tomaron muestras de ambos cultivos a intervalos de 60 minutos para la medición de diferentes parámetros del crecimiento bacteriano: masa, división y viabilidad celular. La masa celular se midió como densidad óptica a 650 nm. La viabilidad celular se calculó a través del recuento de células capaces de formar colonias en medio completo a 41°C. La división celular fue estimada mediante el recuento del número total de células, realizado con un contador electrónico de partículas Coulter Modelo ZBI, equipado con una apertura de 30 μ m. La distribución del volumen celular en las muestras se analizó por medio de un Channelyzer Modelo C1000 incorporado al contador Coulter. Los recuentos con el contador Coulter se realizaron diluyendo los cultivos en forma apropiada en NaCl 0,9%, con formaldehído al 5% para fijar las células.

En las cinéticas de crecimiento en las que se estudió el efecto de distintos agentes, éstos fueron agregados en el tiempo 0 y a las siguientes concentraciones: acetato de sodio 100 mM, benzoato de sodio 25 mM, glutamato de sodio 40 mM y formiato de sodio 40 mM. En esos experimentos, el cultivo estacionario inicial se repicó dos veces desde una DO=0,100 hasta DO=0,400, con el propósito de obtener una población exponencial lo más homogénea posible (Schellhorn y col., 1992).

Todos los ensayos descritos se llevaron a cabo durante 360 minutos, abarcando toda la fase exponencial del cultivo a 41°C.

Para estudiar el comportamiento en fase estacionaria, se partió de un cultivo estacionario en medio completo, obtenido en baño a 41°C con agitación continua; éste fue diluído 1:2000 en el mismo medio e incubado toda la noche a 41°C sin agitación y en condiciones deficientes de aereación. Al día siguiente, el cultivo, que presentaba una DO aproximadamente de 0,300, se diluyó hasta DO=0,100 en el mismo medio, y se incubó durante 90 minutos en baño a 41°C con agitación óptima. Se diluyó, entonces, con el mismo medio hasta DO=0,050 y se fraccionó en dos partes iguales (tiempo 0), que se incubaron en baños a 30°C o 41°C con agitación, para iniciar cinéticas de crecimiento de 10 horas de duración.

El estudio del comportamiento de los mutantes esféricos por inserción del transposón Tn10 Δ 16 Δ 17(Kan) se realizó agregando al medio kanamicina (20 μ g/ml), a fin de evitar la proliferación de células bacilares Kan-S originadas por la escisión precisa del transposón.

8. Tinción con naranja de acridina

La tinción de las células con el colorante naranja de acridina como índice la viabilidad celular se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Meynell y Meynell (1970). Para ello, se tomaron muestras de cinéticas de fase exponencial

a 30°C y 41°C y se colocaron sobre un portaobjetos. Una vez secas, las células se fijaron con metanol durante cinco minutos, se lavaron con etanol absoluto y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se tiñeron durante cinco minutos con una solución de 10 ml de buffer fosfato-ácido cítrico (pH 4) más 0,1 ml de una solución acuosa de naranja de acridina 1% P/V y luego se lavaron con el mismo buffer. Las células fueron observadas con un microscopio de fluorescencia Axioplan Zeiss, utilizando un filtro 09 (filtro de excitación 450 a 490 nm, divisor cromático 510 nm, filtro supresor 520 nm), con un aumento de 1000x.

9. Medición de respiración celular

Los ensayos de respiración celular se realizaron utilizando un monitor biológico de oxígeno YSI Modelo 53. Se tomaron muestras de cinéticas de crecimiento a 30°C y 41°C, de fase exponencial, realizadas como se detalló previamente, y se midió la velocidad de consumo de oxígeno durante tres minutos. Cada medición fue realizada a la misma temperatura del cultivo del cual provenía la muestra. Durante los dos primeros muestreos (0 y 60 minutos) la medición del consumo de oxígeno se realizó en 3 ml de cultivo sin diluir. A partir de los 120 minutos, las muestras se diluyeron con el mismo medio, precalentado a la temperatura correspondiente, de manera de tener una DO=0,300 en un volumen final de 3 ml.

10. Ensayo de aminoacil-tARN sintetasas

Los ensayos de alanil y leucil-tARN sintetasa se realizaron siguiendo el protocolo de Böck (1969). Los extractos se obtuvieron a partir de cultivos estacionarios crecidos en medio completo a 30°C. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer (fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,5; mercaptoetanol 0,01 M; MgCl₂ 0,001 M). Luego de sonicar durante dos minutos,

se centrifugó durante 30 minutos a 30000 rpm y el sobrenadante se centrifugó nuevamente durante 2 horas a 40000 rpm. Todos los pasos se realizaron a 4°C.

Los extractos se mantuvieron a -20°C con 50% de glicerol durante no más de 48 horas y la concentración de proteínas en los mismos se determinó por el método de Lowry (1951).

Para la medición de la actividad de alanil-tARN sintetasa se trabajó con un volumen final de 125 μ l, mezclando: 50 μ moles de Tris-HCl pH 7,5, 5 μ moles de $MgCl_2$, 1 μ mol de glutation, 1 μ mol de ATP, 0,05 μ moles de ^{14}C -L-alanina (10 μ Ci/ μ mol), 500 μ g de tARN de *E. coli* y 100 μ g de seroalbúmina bovina. La mezcla se preincubó durante cinco minutos a 30°C ó 41°C y la reacción se inició con el agregado del extracto (0,01, 0,02 ó 0,04 mg de proteína), continuándose la incubación durante otros cinco minutos, a la temperatura correspondiente. La precipitación del tARN se realizó absorbiendo 100 μ l de la mezcla de reacción en un disco de papel Whatman 3MM que fue inmediatamente sumergido en ácido tricloroacético 5% a 0°C. Luego de sucesivos lavados, los discos se secaron y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb Modelo 4530. La radiactividad medida indicó la cantidad de ^{14}C -L-alanina unida a tARN por actividad de alanil-tARN sintetasa. La medición de la actividad de leucil-tARN sintetasa se realizó en forma similar pero utilizando 2,5 μ moles de ^{14}C -L-leucina (10 μ Ci/ μ mol). Las actividades específicas de la ^{14}C -L-alanina y ^{14}C -L-leucina utilizadas fueron 168,85 mCi/mmol y 300 mCi/mmol respectivamente y ambas se obtuvieron de New England Nuclear.

11. Detección de guanosina tetrafosfato (ppGpp)

La detección de este nucleótido se realizó siguiendo la técnica de marcación con fósforo-32 de Cashel (1969), empleando cepas cultivadas de acuerdo al protocolo de Bochner y Ames (1982).

Se partió de un cultivo estacionario en medio MOPS adicionado con 0,04% de glucosa y 0,2 mM de fosfato de potasio (Bochner y Ames, 1982) crecido a 30°C, sin agitación. Ese cultivo se diluyó al 20% con medio MOPS fresco, más 0,4% de glucosa y 0,2 mM de fosfato, y se incubó a 30°C durante 3,5 hs. Las células se centrifugaron y resuspendieron en el mismo medio a DO=1,8. Se tomaron 0,2 ml de esta suspensión y se agregó 1 ml de MOPS con 0,4% de glucosa, 0,2 mM de fosfato y 30 $\mu\text{Ci/ml}$ de fósforo-32 (ácido ortofosfórico con una actividad específica de 2 mCi/ml obtenido de New England Nuclear). La mezcla se incubó a la temperatura correspondiente (30°C o 41°C) durante 30 minutos, para permitir la síntesis de compuestos de fósforo-32. A 0,2 ml de la mezcla se agregaron 20 μl de ácido fórmico 11N y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. El extracto ácido se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se sembró en placa de polietileniminocelulosa utilizando fosfato de potasio 1,5 M, pH 3,4 como buffer de corrida. Finalizada la cromatografía, la placa se secó y expuso durante 24 hs a una placa radiográfica, que se reveló en la forma convencional.

Las manchas obtenidas, correspondientes a diferentes compuestos con fósforo-32, fueron identificadas y se las cuantificó utilizando un densitómetro Metrolab Modelo 3000. La mancha correspondiente a ppGpp se localizó corriendo simultáneamente controles de la cepa *argC95* incubada con fósforo-32 en presencia y ausencia de arginina (la ausencia de arginina en esa cepa incrementa fuertemente la síntesis de ppGpp por inducción de la respuesta estricta). La mancha correspondiente a GTP, que se utilizó como referencia ya que permaneció invariable en todas las cepas analizadas a pesar del cambio de temperatura, fue ubicada en la placa de acuerdo al trabajo de Bochner y Ames (1982).

Resultados

I. Obtención y caracterización de mutaciones de forma celular por transposición

1. Obtención de Inserciones en genes de forma

La obtención de mutaciones de forma celular por inserción presenta dos importantes ventajas: a) permite obtener mutaciones absolutas, que inactivan totalmente la función los genes afectados, y, b) las mutaciones por inserción resultan fácilmente seleccionables por la resistencia a antibióticos codificada por el transposón. El procedimiento se llevó a cabo utilizando los miniderivados del transposón Tn10, Tn10 Δ 16 Δ 17(Tet) y Tn10 Δ 16 Δ 17(Kan) (Way y col., 1984), que codifican resistencia a tetraciclina y kanamicina respectivamente (Materiales y Métodos).

La introducción de Tn10 Δ 16 Δ 17(Tet) en la cepa TT10427, portadora del plásmido que codifica la transposasa de Tn10 (pNK972), mediante transducción con un lisado obtenido en la cepa TT10423, permitió obtener aproximadamente 143000 transductantes Tet-R (Tabla IV). Estas colonias correspondían a inserciones al azar en el cromosoma bacteriano ya que el transposón se encuentra en un plásmido de *E. coli*; sin embargo, entre esas inserciones, no se halló ninguna colonia compuesta por células esféricas (Tabla IV).

Se ha demostrado anteriormente que ciertas mutaciones *mre* y *pbpA* sólo son aceptadas por bacterias denominadas tolerantes, aisladas por resistencia al antibiótico β -lactámico mecilinam (Mec-R) (Antón, 1987; Ogura y col., 1989). Por lo tanto, se repitió el experimento empleando cepas resistentes a esa β -lactama. Para ello se transfirió el plásmido pNK972 a la cepa DA996, que es Mec-R y tolerante a la mutación letal *mre-9* (Antón, 1987), y a DA1347, que es un derivado Mec-R de la cepa *argC95*, también tolerante a esa mutación. El propósito de

Tabla IV. Aislamiento de mutantes esféricos por transposición de Tn10Δ16Δ17

Cepa receptora (pNK972)	Transposón Tn10Δ16Δ17	Nº de inserciones analizadas	Nº de mutantes esféricos (%)	Tipos genéticos			
				rodA Nº (%)	mre Nº (%)	divD Nº (%)	pbpA Nº (%)
TT10427	Tet	143000	0 ($\leq 7 \times 10^{-4}$)	—	—	—	—
DA996	Tet	75000	17 (0,02)	14 (79)	3 (21)	—	—
DA1347	Tet	44000	9 (0,02)	6 (67)	3 (33)	—	—
DA996	Kan	86000 ^a	7	5 (72)	1 (14)	1 (14)	—
Total			33	25 (76)	7 (21)	1 (3)	—

Los experimentos de transposición se realizaron por transducción entre receptoras portadoras de pNK972 (que codifica la enzima transposasa) y lisados de las cepas TT10423 (Tn10Δ16Δ17-Tet) y TN2500 (Tn10Δ16Δ17-Kan). De las inserciones al azar Tet-R o Kan-R, se conservaron aquellas colonias en las que la inserción de Tn10 afectaba a un gen de forma celular (colonia brillante, compuesta por células esféricas).

^a Según se explicó en Resultados, una parte indeterminada de los transductantes Kan-R eran recombinantes homólogos zae-1613::Tn10Δ16Δ17(Kan) en lugar de inserciones al azar; por esta razón, no se calculó el porcentaje de mutantes esféricos.

utilizar dos cepas receptoras diferentes fue analizar si el genotipo influye en los tipos de mutaciones obtenidas.

Destacando la importancia de la tolerancia a mutaciones de forma celular para el aislamiento de inserciones en este tipo de genes, se obtuvieron 17 mutantes esféricos en la cepa DA996 y 9 en la cepa DA1347 (Tabla IV).

Una vez obtenidas las inserciones Tet-R en genes de forma, se llevó a cabo un experimento similar con la cepa DA996(pNK972) como receptora, pero utilizando como dadora a la cepa TN2500, portadora del transposón Tn10 Δ 16 Δ 17(Kan) en el cromosoma. En este caso, una gran parte de los 86000 transductantes Kan-R eran recombinantes homólogos, y no inserciones al azar, ya que el transposón provenía del cromosoma de *S. typhimurium* y no de un plásmido de *E. coli*. Sin embargo, se pudieron obtener otras 7 inserciones en genes de forma celular (Tabla IV).

Al igual que en el caso de las inserciones Tet-R, las inserciones Kan-R fueron transferidas a la cepa DA996 original (sin el plásmido pNK972), a fin de evitar la inestabilidad causada en esas mutaciones por los altos niveles de enzima transposasa.

2. identificación genética de los mutantes de forma por Inserción

Una vez obtenidos los 33 mutantes en genes de forma celular (Tabla IV), se procedió a identificar por métodos genéticos el gen de forma en el que había ocurrido la inserción del Tn10 Δ 16 Δ 17 en cada uno de esos mutantes.

La identificación se basó, en un principio, en la cotransducción entre las mutaciones de forma, detectadas por el brillo característico de las colonias formadas por células esféricas, con marcadores cercanos seleccionables. En la

Figura 3 se observa la localización en el mapa genético de *S. typhimurium* de los genes de forma y marcadores cercanos empleados.

El procedimiento utilizado fue descrito en Materiales y Métodos. Para ello, se obtuvieron lisados de todas las cepas portadoras de inserciones, y, utilizando como receptoras a las cepas DA529, DA1228, SA342 y DA1294, se seleccionaron transductantes *aroE*⁺, *hisS*⁺, *lip*⁺, y *leuS*⁺, respectivamente, y se analizó en ellos la cotransducción del fenotipo esférico.

Los resultados que permitieron identificar a los 33 mutantes, se encuentran resumidos en la Tabla V.

2.1. Mutantes *rodA*/*pbpA*

La mayoría de las mutaciones mostraron un promedio de cotransducción del 17,6% con el marcador *leuS*⁺ y 23,5% con *lip*⁺ (Tabla V) que demuestra su localización en el grupo *rodA*/*pbpA* (Figura 3), formado por dos genes adyacentes que no pueden diferenciarse por cotransducción (Spratt y col., 1980; Tamaki y col., 1980).

La clasificación de esos mutantes como *rodA* o *pbpA*, se llevó a cabo por complementación con los plásmidos pBS47 y pLG346, portadores de los alelos *pbpA*⁺ y *rodA*⁺, respectivamente y codificadores de resistencia a kanamicina. Las 20 cepas Tet-R de este grupo recuperaron la forma bacilar cuando se les transdujo el plásmido pLG346(*rodA*⁺) y retuvieron la forma esférica cuando les fue introducido el plásmido pBS47(*pbpA*⁺). Estos resultados demostraron que todas las inserciones Tet-R ocurridas en la zona del minuto 14 afectaban al gen *rodA*.

En el caso de las 5 inserciones Kan-R fue necesario recurrir a una estrategia diferente (Materiales y Métodos) ya que al ser las cepas resistentes a kanamicina no era posible usar ese mismo carácter para seleccionar transductantes portadores de los plásmidos pBS47 y pLG346. La transducción del marcador *lip*⁺ a

los derivados DA1410 y DA1411 (Tabla III) con lisados crecidos en esas inserciones arrojó los siguientes resultados: se obtuvo un promedio de 9% de transductantes esféricos cuando la receptora llevaba el plásmido pBS47(*pbpA*⁺) y sólo transductantes bacilares cuando la receptora era portadora del plásmido pLG346(*rodA*⁺). Esos datos demostraron que las 5 inserciones Kan-R ubicadas en esa zona eran también mutaciones en el gen *rodA*.

Para verificar la caracterización genética, se escogieron al azar seis mutantes *rodA* identificados por complementación y se sometieron a un ensayo de PBPs para constatar la presencia de PBP 2 (Materiales y Métodos). En los seis mutantes se observó la banda correspondiente a esta proteína, demostrando la presencia de un gen *pbpA* funcional (datos no mostrados). Estos resultados confirmaron la validez de la identificación genética, que permitió concluir que las 25 inserciones del grupo *rodA/pbpA* afectaban al gen *rodA*, no habiendo ocurrido ninguna inserción en el gen *pbpA*.

2.2. Mutantes *mre* y *divD*

Entre los 33 mutantes de forma, 7 presentaron cotransducción con el marcador *aroE*⁺ (17,6%), demostrando pertenecer al grupo *mre* (Figura 3, Tabla V). Resultados obtenidos por Wachi y col. (1989) han indicado la presencia en la región *mre* de tres genes involucrados en el control de la forma celular: *mreB*, *mreC* y *mreD*. La carencia de plásmidos portadores de estos genes impidieron la individualización del gen afectado por las inserciones, y por ello se las denomina *mre*.

Finalmente, la inserción restante fue identificada como *divD*::Tn10, al mostrar una cotransducción del 100% con el marcador *hisS*⁺ (Tabla III).

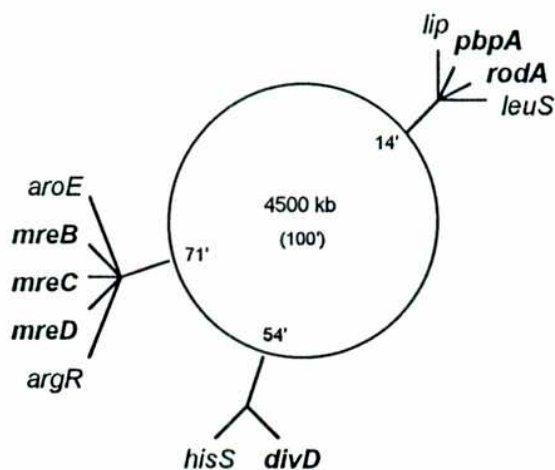
Figura 3. Genes de forma y marcadores cercanos en *S. typhimurium*

Tabla V. Identificación genética de las inserciones que afectan forma celular

Cepa receptora (marcador pertinente)	Nº de dadoras esféricas	Marcador seleccionado	Cotransducción media de las mutaciones de forma (%)	Gen afectado
DA529 (<i>aroE</i> 32)	7	<i>aroE</i> ⁺	17,6	<i>mre</i>
DA1228 (<i>hisS</i> 6331)	1	<i>hisS</i> ⁺	100	<i>divD</i>
DA1294 (<i>leuS</i> 3)	25	<i>leuS</i> ⁺	17,6	<i>rodA</i> o <i>pbpA</i>
SA342 (<i>lip</i> -2)	14 ^a	<i>lip</i> ⁺	23,5	<i>rodA</i> o <i>pbpA</i>

La identificación de los genes afectados por inserción de Tn10Δ16Δ17 se realizó por transducción entre cepas portadoras de marcadores cercanos a los genes de forma y lisados obtenidos en los mutantes esféricos. La aparición de colonias compuestas por células esféricas con una determinada receptora indicó cual era el gen de forma afectado en la dadora.

^a Sólo en 14 de las 25 mutaciones ligadas al gen *leuS* se probó cotransducción con el gen *lip*.

3. Características de las mutaciones de forma por inserción

Las mutaciones obtenidas fueron estudiadas para determinar su efecto sobre la respuesta a mecilinam y analizar su viabilidad en cepas tolerantes o no a mutaciones letales de forma.

3.1. Efecto de mecilinam

Se estudió la respuesta a mecilinam de mutantes de forma representativos de cada tipo. Los resultados presentados en la Tabla VI mostraron que las inserciones en genes *rodA* y *mre* ocasionan un fuerte incremento de la resistencia a mecilinam de DA996, mientras que la inserción *divD* modificó sólo levemente la respuesta de dicha cepa al antibiótico.

La pérdida de pNK972 en la cepa TT10427 (originando la cepa DA1415) eliminó su resistencia a mecilinam, lo que indica que la misma se debía a la β -lactamasa codificada por el plásmido. La falta de tolerancia a la mutación letal *mre-9* en TT10427 demuestra que la resistencia a mecilinam mediada por β -lactamasa no confiere tolerancia a mutaciones letales de forma (Tabla VI).

Hace ya muchos años, Aono y col. (1979) describieron la elevada resistencia a mecilinam presentada por los mutantes afectados en la síntesis (*cya*) o función (*crp*) del AMP cíclico en *E. coli* K-12. Además, se ha demostrado la tolerancia de una cepa *cya* de *E. coli* K-12 a una mutación letal *pbpA* (Ogura y col., 1989). Por esas razones, se estudió el efecto de mecilinam en mutantes *cya* y *crp* de *S. typhimurium*, así como la tolerancia de los mismos a la mutación letal *mre-9*.

Como se muestra en la Tabla VI, las mutaciones *cya* y *crp* no modificaron significativamente la respuesta a mecilinam del tipo salvaje. Sólo la cepa PP1037, portadora del alelo *crp-773* mostró una CIM más elevada, causada probablemente por alguna otra mutación, ya que cuando el marcador *crp-773* se transdujo a LT2 (DA1371), la CIM no sufrió modificación. Por otra parte, a pesar de su sensibilidad

a mecilnam, las cepas *cya* y *crp* actuaron como buenas receptoras para la mutación letal *mre-9* (Tabla VI).

3.2. Tolerancia a mutaciones de forma por inserción

Los ensayos de tolerancia a las mutaciones de inserción se llevaron a cabo mediante la transducción de las mismas a cepas sensibles y sus correspondientes derivadas resistentes a mecilnam (Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos con cepas *rodA*, *mre* y *divD::Tn10Δ16Δ17*(Kan) como dadoras y las cepas *argC95* y su derivada Mec-R DA1347 como receptoras, se muestran en la Figura 4. La transducción de las inserciones *rodA* y *mre* a la cepa Mec-S (CIM 0.08 µg/ml, Tabla VI) produjo muy pocas colonias Kan-R, mientras que la selección para el marcador control *argC*⁺ permitió obtener un gran número de transductantes. Cuando se utilizó como receptora a la derivada Mec-R, que presenta una CIM de mecilnam de 20 µg/ml (Tabla VI), tanto los transductantes Kan-R como *argC*⁺ aparecieron en alta frecuencia. Estos resultados indican que las mutaciones *rodA::Tn10Δ16Δ17* y *mre::Tn10Δ16Δ17* son letales en genotipos salvajes y que para su tolerancia se requieren mutaciones de resistencia al antibiótico mecilnam.

Los pocos transductantes obtenidos con la cepa Mec-S como receptora estaban compuestos por células esféricas, la mayoría muy grandes, con vacuolas y signos de lisis. Por otro lado, las colonias correspondientes a la receptora Mec-R presentaron poblaciones homogéneas de células esféricas y pequeñas.

La única inserción *divD::Tn10Δ16Δ17* obtenida presentó un comportamiento diferente al de las inserciones *mre* y *rodA*, ya que pudo ser transducida normalmente a las receptoras sensible y resistente a mecilnam. Estos resultados indican que las inserciones *divD* no son letales en cepas Mec-S; la falta de

aparición de estas mutaciones al utilizar en la obtención a la receptora TT10427 podría deberse a baja frecuencia de inserción de Tn10 en el gen *divD*.

Se realizó el mismo tipo de ensayo utilizando como receptoras a una cepa portadora de la mutación *cya-961* (DA1369) y a su derivada *cya*⁺ (DA1413) (Tabla III). La cepa *cya-961* mostró tolerancia a las inserciones *rodA*, *mre*, y *divD::Tn10Δ16Δ17* a pesar de su sensibilidad a mecilinam (Tabla VI), mientras que el derivado isogénico *cya*⁺ sólo fue tolerante a la inserción *divD* (datos no mostrados). De acuerdo a estos resultados, los mutantes *cya* y *crp* de *S. typhimurium* presentan tolerancia a mutaciones letales *rodA* y *mre* a pesar de no mostrar resistencia a mecilinam.

Tabla VI. CIM de mecilinam y tolerancia a la mutación letal *mre9* de las cepas utilizadas

Cepa	Características relevantes	CIM de mecilinam (µg/ml)	Tolerancia	
			Nº de col. Tet-R	%col. <i>mre-9</i>
LT2	Mec-S	0,04	1000	0 (≤ 0,1%)
DA773	Mec-S	0,08	443	0 (≤ 0,2%)
DA996	DA773 pero Mec-R	2,5	1057	18
<i>argC95</i>	Mec-S	0,08	2850	0 (≤ 0,04%)
DA1347	<i>argC95</i> pero Mec-R	20	1910	13
TT10427	pNK972 (Amp-R)	5	329	0 (≤ 0,3%)
DA1415	TT10427 pero Amp-S	0,04	287	0 (≤ 0,3%)
DA1366 ^a	<i>mre-17::Tn10Δ16Δ17</i>	20		
DA1367 ^a	<i>divD135::Tn10Δ16Δ17</i>	5		
DA1368 ^a	<i>rodA22::Tn10Δ16Δ17</i>	20		
DA1369 ^b	<i>cya-961 zid62::Tn10</i>	0,08		
DA1413 ^b	<i>cya⁺ zid62::Tn10</i>	0,08		
DA1370 ^c	<i>cya-961 Tet-S</i>	0,08	668	7
PP1037	<i>crp-773::Tn10</i>	5		
DA1414 ^e	<i>crp-802 Tet-S</i>	2,5	267	9
DA1371 ^d	<i>crp-773::Tn10</i>	0,08		
DA1372 ^e	<i>crp-801 Tet-S</i>	0,08	145	10

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se midió como se detalla en Materiales y Métodos. La tolerancia a la mutación letal *mre-9* fue calculada mediante transducción de las distintas receptoras con un lisado de la cepa DA1041, portadora de los marcadores cercanos *argR372::Tn10* y *mre-9*. Al seleccionar resistencia a tetraciclina, se consideró a la receptora como tolerante cuando entre los transductantes Tet-R aparecieron al menos 5% de colonias *mre-9* (colonias brillantes constituidas por células esféricas).

^a Inserciones en DA996.

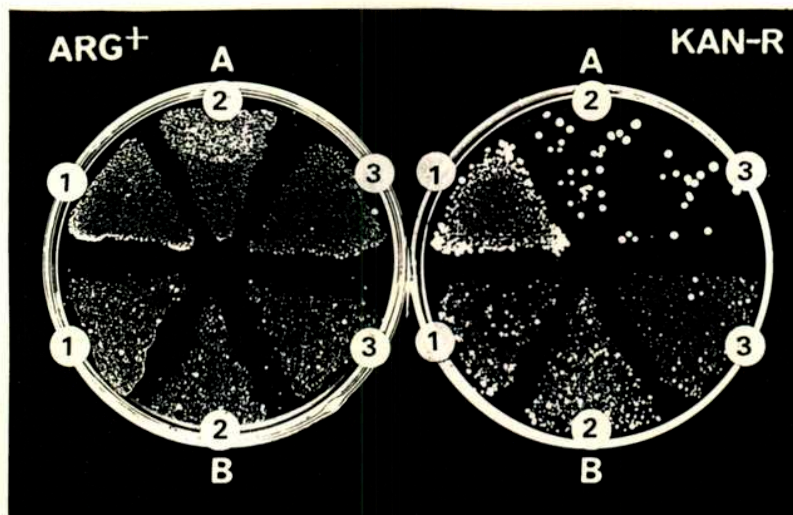
^b Derivados isogénicos *cya-961* y *cya⁺* a partir de LT2xP22.TT2104 y selección de Tet-R.

^c Derivado Tet-S de DA1369 obtenido por el método de Bochner y col. (1980).

^d Derivado *crp-773* a partir de LT2xP22.PP1037 y selección de Tet-R.

^e DA1414 y DA1372 son derivados Tet-S de PP1037 y DA1371, respectivamente, obtenidos por el método de Bochner y col. (1980).

Figura 4. Transducción de inserciones en genes de forma a receptoras tolerantes y no tolerantes.



Las cepas dadoras DA1367, DA1366, y DA1368 son portadoras, respectivamente, de las mutaciones *divD* (1), *mre* (2), y *rodA* (3), producidas por inserción de Tn10 Δ 16 Δ 17 (Kan). Las receptoras utilizadas fueron: la cepa Mec-S *argC95* (A) y su derivada Mec-R DA1347 (B). Se esparcieron volúmenes iguales de las mezclas de transducción en medio completo con kanamicina para la selección de transductantes esféricos Kan-R, y en medio mínimo para seleccionar transductantes *argC*⁺, como control de la eficiencia de transducción.

II. Caracterización de una cepa tolerante condicional a mutaciones letales de forma celular

1. Resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma de la cepa DA1138

Para el estudio de las alteraciones producidas por mutaciones letales de forma celular en ausencia de tolerancia se utilizó una cepa con tolerancia condicionada por temperatura.

Dada la relación entre tolerancia a mutaciones de forma celular y resistencia a mecilinam (Antón, 1987; Ogura y col., 1989), la cepa tolerante condicional se obtuvo por aislamiento de derivados con resistencia termosensible a dicho antibiótico, empleando el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Para este trabajo se eligió la cepa DA1138, aislada por P. Levy Yeyati (1987), por su mayor estabilidad y por presentar como rasgo fenotípico característico, colonias muy pequeñas y lisas a 41°C, que recuperan el aspecto normal típico de la cepa salvaje original a 30°C, facilitando así el control del comportamiento.

En la Tabla VII puede verse el efecto de la temperatura sobre la respuesta a mecilinam de la cepa, medida ésta como sobrevivencia a 30°C y 41°C en medio con 1 µg/ml del antibiótico, y también por determinación de la CIM de mecilinam a esas dos temperaturas. La comparación de los valores obtenidos para la cepa salvaje LT2 y su derivada DA1138 confirma la ya descrita resistencia condicional de esta última al antibiótico (Levy Yeyati, 1987).

También se verificó la termosensibilidad de la tolerancia a mutaciones letales *mre*, mediante transducciones con la cepa DA1138 como receptora y como dadoras las cepas DA1041 y DA1352, portadoras de las mutaciones letales *mre-9* y *mre-13::Tn10Δ16Δ17*, respectivamente (Tabla III). Al seleccionar

resistencia a tetraciclina, según se muestra en la Tabla VIII, sólo se recuperaron transductantes brillantes (compuestos por células esféricas) a 41°C, lo cual confirma el carácter termosensible de la tolerancia de la cepa DA1138.

Tabla VII. Efecto de la temperatura sobre la respuesta a mecilinam de la cepa DA1138

Cepa	Sobrevida en medio con mecilinam (1µg/ml)		CIM de mecilinam (µg/ml)	
	30°C	41°C	30°C	41°C
LT2	$8,4 \times 10^{-6}$	$7,4 \times 10^{-5}$	0,08	0,08
DA1138	$1,8 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-1}$	0,08	20

Tabla VIII. Efecto de la temperatura sobre la tolerancia a mutaciones *mre* en DA1138

Cepa donante	Nº de transductantes Tet-R: brillantes ^a /totales (%)	
	30°C	41°C
DA1041 (<i>mre-9 argR372::Tn10</i>)	0/500 ($\leq 0,02\%$)	15/140 (10%)
DA1352 (<i>mre-13::Tn10Δ16Δ17</i>)	---	150/150 (100%)

La cepa DA1138 fue transducida con lisados obtenidos en las cepas DA1041 y DA1352, seleccionando resistencia a tetraciclina a 30°C y 41°C. En el caso de la mutación *mre-9*, la no-tolerancia está dada por la ausencia de colonias brillantes (*mre-9*) entre los transductantes Tet-R (*argR372::Tn10*) seleccionados a 30°C; en el caso de la mutación *mre-13::Tn10Δ16Δ17*(Tet), lo que se selecciona es directamente la mutación de forma, por lo que la falta de tolerancia a 30°C se manifiesta como ausencia de transductantes a esa temperatura.

^a Colonias compuestas por células esféricas *mre-9* o *mre-13::Tn10Δ16Δ17*

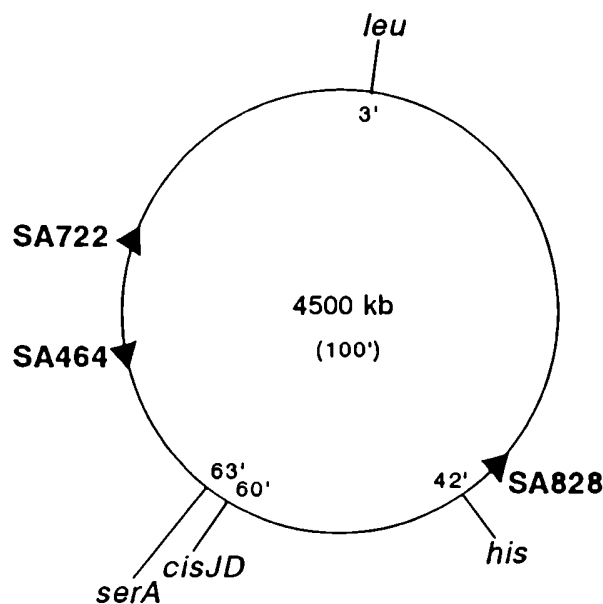
2. Identificación genética de la mutación responsable de la resistencia a mecilina y tolerancia condicional de la cepa DA1138

2.1. Mapeo preliminar por conjugación

Dada la relación directa entre la resistencia a mecilina y tolerancia a mutaciones de forma celular en la cepa DA1138, ambas propiedades fueron asignadas a una única mutación, que se denominó *mec-4*.

Los primeros intentos de mapeo de la mutación *mec-4* fueron realizados mediante conjugación (Tabla IX), utilizando distintas cepas Hfr como dadoras (Sanderson y col., 1972). En la Figura 5 se muestran los crígenes de transferencia de las Hfr utilizadas, así como los marcadores empleados en el mapeo. Como receptoras se utilizaron la cepa SB1294 y dos derivados auxótrofos de DA1138, DA1713 y DA1714 (Tabla III), cuya obtención se describió en Materiales y Métodos.

Figura 5. Cepas Hfr y marcadores empleados en el mapeo de *mec-4*



Se indican los orígenes y sentido de transferencia de las cepas Hfr usadas (Sanderson y col., 1972), y la posición de los marcadores empleados (Sanderson y Roth, 1988).

Tabla IX. Mapeo preliminar de *mec-4* por conjugación

N°	Cruzamiento		Recombinante seleccionado	Marcador no seleccionado	N° de recombinantes con el marcador no seleccionado/ N° total de recombinantes (%)
	Dadora	Receptora			
1.	SA828 (<i>serA</i>)	x DA1713 (<i>leu^a mec-4</i>)	<i>leu⁺ serA⁺</i>	Mec-S	19/20 (95%)
2.	SA828 (<i>serA</i>)	x DA1714 (<i>his^b mec-4</i>)	<i>his⁺ serA⁺</i>	Mec-S	1/20 (5%)
3.	SA464 (<i>serA</i>)	x DA1713 (<i>leu^a mec-4</i>)	<i>leu⁺ serA⁺</i>	Mec-S	0/19 (0%)
4.	DA79 (<i>pur mec-4</i>)	x SB1294 (<i>cysJ cysD</i>)	<i>cis⁺ pur⁺</i>	Mec-R	23/46 (50%)

Se realizaron cruzamientos entre dadoras Hfr o F⁺ y receptoras portadoras de distintos marcadores. Se analizó la respuesta a mecilinam de los recombinantes seleccionados por réplica en medio completo con 1µg/ml de antibiótico, a 30°C y 41°C.

^a Corresponde a la mutación *leu-1265::Tn10Δ16Δ17(Tet)*.

^b Corresponde a la mutación *his-6883::Tn10Δ16Δ17(Tet)*.

Los resultados obtenidos en los cruzamientos (Tabla IX) permitieron llegar a las siguientes conclusiones acerca de la ubicación de *mec-4*:

-Cruzamiento N°1: la alta frecuencia de recombinantes sensibles a mecilinam indica que *mec-4* se encuentra entre el origen de SA828 y el marcador *leu*.

-Cruzamiento N°2: la baja frecuencia de recombinantes sensibles a mecilinam permite descartar la zona entre el origen de SA828 y el marcador *his*.

-Cruzamiento N°3: la baja frecuencia de recombinantes sensibles a mecilinam descarta la zona entre el origen de SA464 y el marcador *leu*, quedando como región más probable el segmento entre el marcador *his* y el final de SA464.

-Cruzamiento N°4: la alta frecuencia de recombinantes resistentes a mecilinam indica que *mec-4* se encuentra en las proximidades de los marcadores *cisJ* *cisD*.

2.2. Mapeo de *mec-4* por cotransducción con marcadores cercanos

Una vez localizada la mutación *mec-4* alrededor del minuto 60, se investigó su posible cotransducción con marcadores cercanos. Para ello, se utilizaron las inserciones *zfi-2009::Tn10*, *zfi-1623::Tn10dcam*, y *srl-202::Tn10*, cuya ubicación en la zona es conocida (Sanderson y Roth, 1988), y se aisló la mutación *nalB411* como se describió en Materiales y Métodos.

Las transducciones detalladas en la Tabla X demostraron la existencia de cotransducción entre la mutación *mec-4* y los marcadores *srl*, *zfi-2009::Tn10* y *zfi-1623::Tn10dcam*, confirmando el mapeo preliminar. Se llevaron a cabo, además, pruebas de tres puntos (Tabla XI) para establecer el orden de los marcadores analizados. El conjunto de resultados obtenidos permitió construir el mapa de la Figura 6, que incluye a *mec-4* en la región correspondiente a los minutos 58-59 del cromosoma de *S. typhimurium*.

Tabla X. Mapeo de *mec-4* por cotransducción con marcadores cercanos

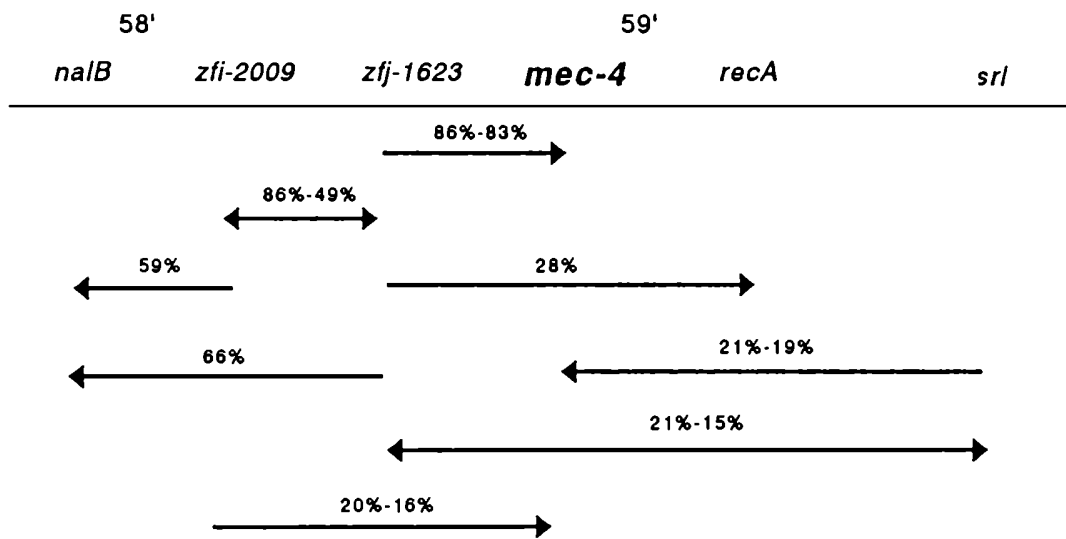
Transducción	Marcador		N° de transductantes con el marcador no selecc./ N° total de transductantes (%)
	Selecc.	No selecc.	
LT2 x fago DA1490	<i>zfi-2009::Tn10</i>	<i>mec-4</i>	83/415 (20%)
DA1138 x fago KS180	<i>zfi-2009::Tn10</i>	<i>mec*</i>	16/100 (16%)
KS180 x fago DA1526	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>mec-4</i>	65/76 (86%)
DA1527 x fago TN2700	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>mec*</i>	66/80 (83%)
DA1525 x fago DA1484	<i>srf-202::Tn10</i>	<i>mec-4</i>	58/270 (21%)
DA1138 x fago DA1048	<i>srf-202::Tn10</i>	<i>mec*</i>	13/67 (19%)
DA1528 x fago DA1525	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>zfi* (Tet-S)</i>	168/196 (86%)
DA1525 x fago DA1528	<i>zfi-2009::Tn10</i>	<i>zfi* (Cam-S)</i>	93/191 (49%)
DA1528 x fago DA1525	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>nalB*</i>	53/80 (66%)
DA1525 x fago DA1528	<i>zfi-2009::Tn10</i>	<i>nalB411</i>	65/111 (59%)
DA1527 x fago DA1525	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>srf*</i>	36/238 (15%)
DA1525 X fago DA1484	<i>srf-202::Tn10</i>	<i>zfi* (Tet-S)</i>	59/277 (21%)
DA1048 x fago TN2700	<i>zfi-1623::Tn10dcam</i>	<i>recA</i>	45/159 (28%)

Tabla XI. Pruebas de tres puntos entre marcadores de la región 58'-59' del cromosoma de *S. typhimurium*

Transducción	Marcador		Clase minoritaria	Orden de los marcadores en la región 58'-59'
	Selec.	No selecc.		
DA1048 x fago DA1526	<i>zjf-1623::Tn10dcam</i>	<i>mec-4 srf</i>	<i>mec⁺ srf</i>	<i>zjf - mec-4 - srf</i>
DA1525 x fago DA1527	<i>srf-202::Tn10</i>	<i>mec-4 zjf</i>	<i>mec⁺ zjf</i>	<i>zjf - mec-4 - srf</i>
DA1484 x fago DA1525	<i>zjf-1623::Tn10dcam</i>	<i>mec⁺ srf</i>	<i>mec-4 srf</i>	<i>zjf - mec-4 - srf</i>
DA1528 x fago DA1525	<i>zjf-1623::Tn10dcam</i>	<i>nalB⁺ zjf</i>	<i>nalB⁺ zfi-2009::Tn10</i>	<i>nalB - zfi - zjf</i>
DA1048 x fago TN2700	<i>zjf-1623::Tn10dcam</i>	<i>recA srf</i>	<i>recA⁺ srf</i>	<i>zjf - recA - srf</i>

Para las pruebas de tres puntos se realizaron transducciones seleccionando un marcador y analizando en los transductantes dos marcadores no seleccionados. El genotipo de la clase minoritaria (originada por cuatro cross-overs) indicó el orden entre los tres marcadores involucrados.

Figura 6. Mapa genético de *S. typhimurium* en la región correspondiente a los minutos 58-59



Los valores consignados corresponden a las frecuencias de cotransducción mostradas en la Tabla X. La cabeza de la flecha indica el marcador no seleccionado.

2.3. Identificación por complementación del gen afectado por *mec-4*

La ubicación de *mec-4* y sus propiedades, junto con resultados de Vinella y col. (1992) demostrando que ciertas mutaciones en genes que codifican aminoacil-tARN sintetasas confieren resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma, sugirieron que *mec-4* podía afectar al gen *alaS*, codificador de la alanil-tARN sintetasa, que pese a no haber sido descrito aún en *S. typhimurium*, se sabe que mapea en esa zona en *E. coli* (Bachmann, 1990). Para investigar esa posibilidad, se transfirió a la cepa DA1138 el plásmido pTAC875N, portador del gen *alaS* salvaje de *E. coli*. Esto fue realizado mediante transducción entre DA1138 y un lisado de DA1540, seleccionando resistencia a ampicilina. Luego, se midió en el derivado DA1138 pTAC875N la tolerancia a la mutación letal *mre-9*. Los datos presentados en la Tabla XII demuestran que la presencia del plásmido en la cepa DA1138 anula la tolerancia a la mutación *mre-9* a 41°C.

Tabla XII. Tolerancia a la mutación *mre-9* de un derivado DA1138 pTAC875N

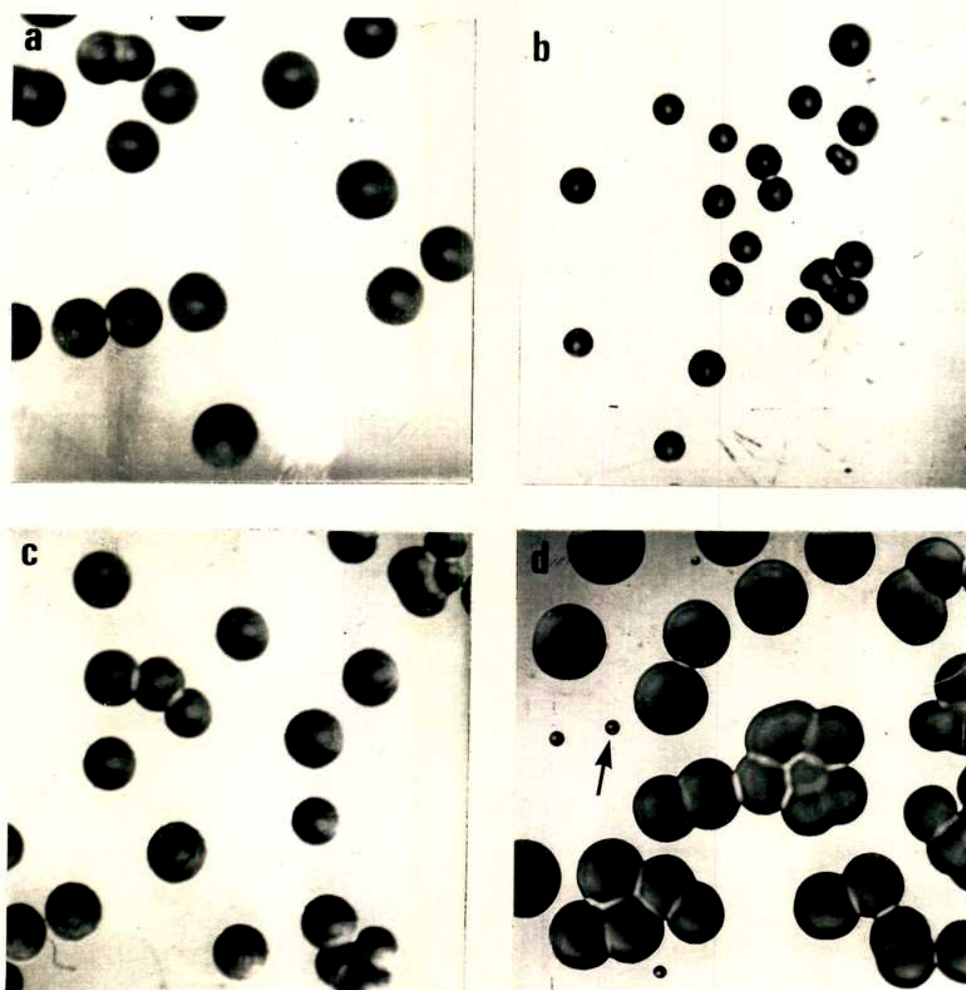
Cepa receptora	N° de transductantes Tet-R: brillantes (<i>mre-9</i>)/totales (%)	
	30°C	41°C
DA1138 (<i>mec-4</i>)	0/2280 ($\leq 0,04\%$)	43/570 (7,5%)
DA1138 pTAC875N (<i>mec-4/alaS'</i>)	0/715 ($\leq 0,13\%$)	0/125 ($\leq 0,8\%$)

La tolerancia a la mutación letal *mre-9* fue probada por transducción de las receptoras con fago DA1041 (*argR372::Tn10 mre-9*), y selección de transductantes Tet-R a 30°C y 41°C. La aparición de menos del 5% de colonias brillantes *mre-9* indicó ausencia de tolerancia en la receptora.

No pudo probarse la resistencia a mecilinam del derivado DA1138 pTAC875N porque la β -lactamasa codificada por el plásmido confiere resistencia a dicho antibiótico, pero se investigó el efecto del plásmido sobre la formación de las colonias pequeñas y lisas que caracteriza a la cepa DA1138 crecida a 41 °C. Como puede observarse en la Figura 7, la introducción de pTAC875N en la cepa DA1138 determinó la recuperación del tamaño y aspecto normal a 41°C.

Los datos presentados demuestran que el plásmido pTAC875N, portador del alelo salvaje del gen *alaS*, es capaz de complementar a la mutación *mec-4*, indicando que la misma afecta al gen codificador de la alanil-tARN sintetasa. Por ello, la mutación *mec-4* pasó a denominarse *alaS206* (Ts).

Figura 7. Morfología de colonia de la cepa DA1138 y del derivado DA1138 pTAC875N



- a) DA1138, 30°C.
 b) DA1138, 41°C.
 c) DA1138 pTAC875N, 30°C.
 d) DA1138 pTAC875N, 41°C; →: colonia segregante Amp-S

Se diluyeron cultivos estacionarios de las cepas DA1138 y su derivada pTAC875N y se plaquearon en medio completo a 30°C y 41°C. La cepa DA1138 presenta a 30°C colonias medianas y rugosas, de aspecto normal (a); éstas son pequeñas y lisas a 41°C (b). La introducción de pTAC875N (Amp-R) no alteró el aspecto ni el tamaño de colonia a 30°C (c), pero restauró la morfología normal a 41°C (d). La pérdida de pTAC875N por segregación (colonia Amp-S) permite obtener nuevamente colonias pequeñas y lisas a 41°C (d).

2.4. Actividad de alanil-tARN sintetasa en DA1138

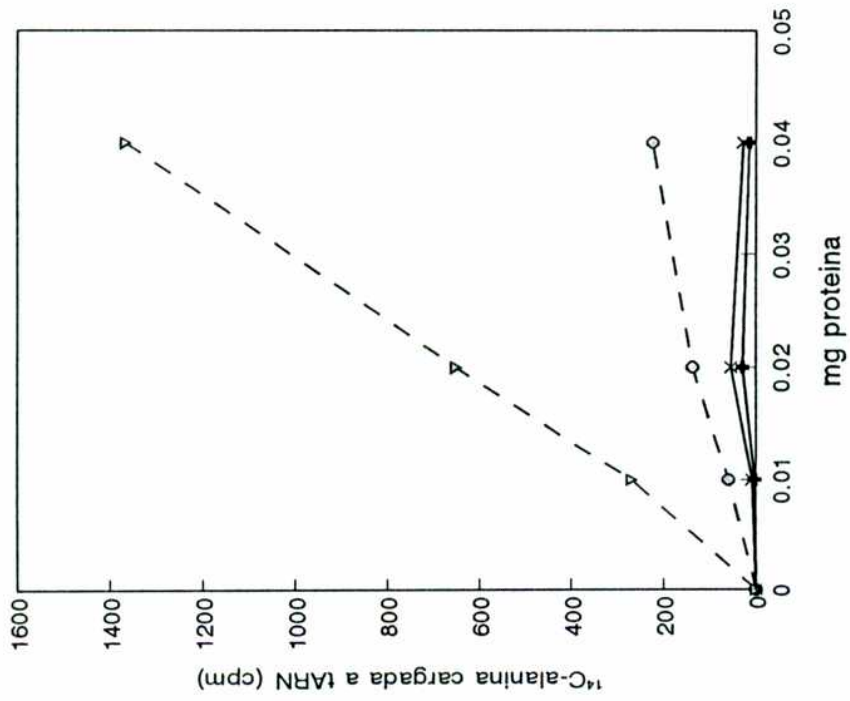
La identificación de *mec-4* como mutación del gen *alaS* fue corroborada en forma directa valorando la actividad de alanil-tARN sintetasa de la cepa DA1138 a 41°C y a 30°C. Para ello, se utilizó el procedimiento descrito por Böck (1969), detallado en Materiales y Métodos, midiéndose además la actividad de leucil-tARN sintetasa como control.

En la Figura 8 se muestran las actividades de alanil-tARN sintetasa en las cepas LT2 (control salvaje) y DA1138, a 30°C y 41°C. En el caso de LT2 se observó que la actividad de alanil-tARN sintetasa era alta a 30°C pero aparecía seriamente disminuída al incrementarse la temperatura, lo que indica que la enzima es intrínsecamente termolábil. Por su parte, la cepa DA1138 no mostró actividad ni a 41°C ni a 30°C. Dado que la enzima es esencial para la viabilidad bacteriana, y la cepa crece normalmente a ambas temperaturas, es evidente que la falta de actividad a 30°C está reflejando la labilidad de la enzima mutante *in vitro*, y que *in vivo* la enzima retiene suficiente actividad como para sustentar el comportamiento normal de la cepa a esa temperatura. A 41°C, la termolabilidad natural de la enzima sumada al efecto de la mutación, resultan también en aparente falta de actividad *in vitro*, pero a esa temperatura, la actividad *in vivo*, aunque suficiente para permitir el crecimiento, no alcanza a evitar que la cepa muestre fenotipo mutante.

La actividad de leucil-tARN sintetasa (Figura 9) fue normal y similar en ambas cepas, a ambas temperaturas.

Los resultados obtenidos demuestran que la mutación *mec-4* (*alaS206*) afecta drásticamente la actividad de alanil-tARN sintetasa en la cepa DA1138 y confirman la asignación lograda por métodos genéticos.

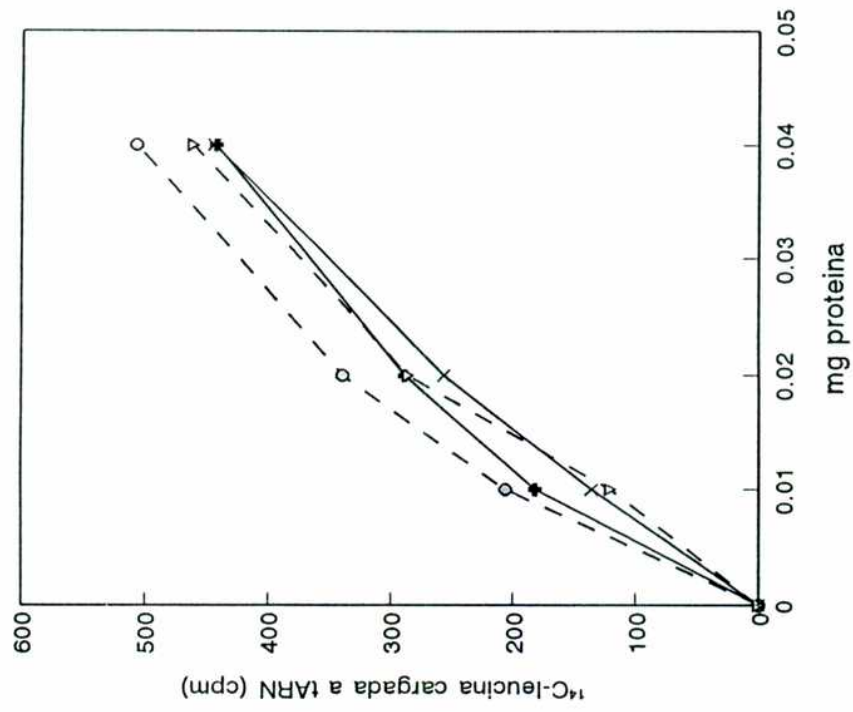
Figura 8. Actividad de alanil-tARN sintetasa



Referencias:

▴ LT2 30°C * DA1138 30°C ○ LT2 41°C + DA1138 41°C

Figura 9. Actividad de leucil-tARN sintetasa



Referencias:

▴ LT2 30°C * DA1138 30°C ○ LT2 41°C + DA1138 41°C

3. Relación de ppGpp con la resistencia a mecilinam en DA1138

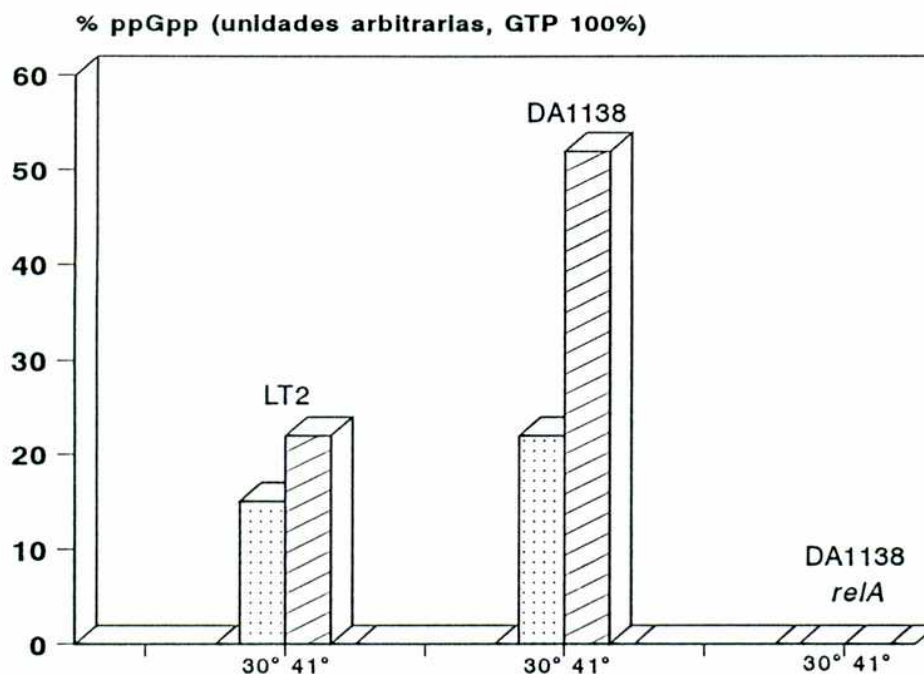
3.1. Nivel de ppGpp en DA1138

La resistencia a mecilinam de mutantes termoestables con alteraciones en aminoacil-tARN sintetasas ha sido atribuída al alto nivel de ppGpp presente en esas cepas (Vinella y col., 1992). Es bien conocido que toda anomalía celular que resulta en un defecto de carga de un tARN, ya sea debido a ausencia del aminoácido o a inactivación de la aminoacil-tARN sintetasa correspondiente, desencadena el mecanismo global conocido como "respuesta estricta". Este fenómeno, que resulta en la rápida detención de la síntesis de ARN estable, es mediado por un efector principal, guanosina tetrafosfato (ppGpp), que es sintetizado por el producto del gen *relA* tan pronto como la asociación de mARN-tARN no cargado-ribosoma da la señal requerida (Cashel y Rudd, 1987).

Para determinar si la mutación termosensible identificada en el gen *alaS* de la cepa DA1138 también causa variaciones termodependientes en el nivel de ppGpp de la célula, se dosó este compuesto a 30°C y a 41°C en las cepas LT2, DA1138 y en una derivada *relA21* de DA1138 (cepa DA1491, Tabla III).

El nivel de ppGpp se midió como se indicó en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos (Figura 10) demuestran que en la cepa DA1138 el nivel de ppGpp se incrementó 2,4 veces, al elevar la temperatura de 30°C a 41°C. En el caso de la cepa LT2, el aumento de temperatura de 30°C a 41°C elevó el nivel de ppGpp 1,4 veces, permitiéndole alcanzar el que posee DA1138 a 30°C, que es insuficiente para conferir resistencia a mecilinam (Tabla VII). Se muestra también en la Figura 10 la ausencia de ppGpp en la derivada DA1138 *relA21::Tn10*.

Figura 10. Nivel de ppGpp en DA1138



Los valores de ppGpp están expresados, para cada cepa y cada temperatura, con referencia al valor presentado por la mancha correspondiente a GTP tomada como 100%.

3.2. Efecto de una mutación *re/A* en la resistencia a mecilinam de DA1138

Si la acumulación de ppGpp a 41°C en DA1138 es causante de la resistencia a mecilinam de la cepa, una mutación *re/A* que inactiva el gen codificador de la principal enzima (ppGpp sintetasa I) responsable de la síntesis de ppGpp (Cashel y Rudd, 1987) e impide, por lo tanto, la síntesis del compuesto, debería modificar notablemente la respuesta a mecilinam de DA1138.

Para investigar esa posibilidad se midió la sobrevida en medio completo con mecilinam (1µg/ml) a 30°C y 41°C de la cepa DA1138 y su derivada *re/A21::Tn10* (DA1491), y se utilizó LT2 y LT2 *re/A21::Tn10* como controles. Además, se determinó la CIM de mecilinam a ambas temperaturas para las cuatro cepas.

Los resultados presentados en la Tabla XIII muestran claramente que la introducción de una mutación *relA*, que reduce drásticamente el nivel de ppGpp (Figura 10), eliminó la resistencia a mecilinam que presenta la cepa DA1138, lo que demuestra que la resistencia se debe a la acumulación de ppGpp causada por la mutación *alaS206(Ts)* en esas condiciones.

Tabla XIII. Respuesta a mecilinam en un derivado *relA* de DA1138

Cepa	Sobrevida en medio con mecilinam (1 µg/ml)		CIM de mecilinam (µg/ml)	
	30°C	41°C	30°C	41°C
LT2	$1,9 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	0,04	0,02
LT2 <i>relA21::Tn10</i>	$4,9 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$	0,04	0,02
DA1138	$1,9 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-1}$	0,04	10
DA1138 <i>relA21::Tn10</i>	$3,8 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$	0,04	0,02

III. Efecto de la temperatura sobre derivados esféricos de DA1138 en fase logarítmica

Se investigaron las alteraciones del crecimiento bacteriano ocasionadas por la inactivación de genes de forma celular, en ausencia de tolerancia a esas mutaciones. Para ello, se construyeron derivados de la cepa tolerante condicional DA1138 portadores de mutaciones en distintos genes de forma. Como ya se demostró, esa cepa presenta resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma a 41°C, pero permanece sensible y no tolerante a 30°C. El estudio del comportamiento de esos derivados en condiciones en las que la cepa no es tolerante (30°C) permitió estudiar de que manera se ve afectado el crecimiento bacteriano por la ausencia de los productos de diferentes genes de forma y tratar así de determinar la función de éstos en el ciclo celular.

A fin de trabajar con mutaciones capaces de anular completamente la función génica, se construyeron derivados de la cepa DA1138 portadores de las mutaciones *rodA22::Tn10Δ16Δ17(Kan)*, *mre-17::Tn10Δ16Δ17(Kan)* y *divD135::Tn10Δ16Δ17(Kan)*, cuya obtención, por inserción del transposón Tn10Δ16Δ17 que confiere resistencia a kanamicina, ya fue descrita. Estas inserciones también serán mencionadas como *rodA22*, *mre-17* o *divD135*.

Los derivados se prepararon mediante transducciones con la cepa DA1138 como receptora y las cepas DA1368, DA1366 y DA1367 como dadoras (Tabla III). La selección directa de las inserciones en los genes de forma se realizó en medio completo con kanamicina a la temperatura en que se manifiesta la tolerancia (41°), obteniéndose los derivados DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17*, DA1138 *mre-17::Tn10Δ16Δ17*, y DA1138 *divD135::Tn10Δ16Δ17*.

Se estudió el comportamiento de los derivados esféricos de DA1138 mediante cinéticas de crecimiento a 30°C (condición restrictiva) y 41°C

(condición permisiva) durante la fase logarítmica. Se midieron tres parámetros del crecimiento bacteriano: masa (densidad óptica a 650 nm), división (número total de células) y viabilidad celular (número de células capaces de formar colonia), en la forma descrita en Materiales y Métodos. De la relación densidad óptica/ número total de células se calculó la "masa" celular promedio (Begg y Donachie, 1978) y por medición con el contador Coulter se determinó la distribución de tamaños en las células incubadas a 30°C y 41°C.

1. Cinéticas de crecimiento de los derivados esféricos de DA1138

El crecimiento de la cepa silvestre LT2 (Figura 11) fue completamente normal a las dos temperaturas, y sólo se observó un corto retraso en la curva de densidad óptica al pasar el cultivo de 41°C a 30°C. El aumento de células totales y viables fue menos rápido a 30°C que a 41°C, pero en ambos casos aumentó exponencialmente y mostró gran coincidencia entre ambos tipos de mediciones. La adquisición de la mutación *alaS206* por la cepa LT2 (cepa DA1138) no produjo cambios importantes (Figura 12) excepto por una atenuación de la diferencia entre las curvas de 30°C y 41°C, probablemente debida a que la ventaja proporcionada por la temperatura alta (41°C) en el caso de LT2, es contrarrestada en DA1138 por la expresión a 41°C de la mutación *alaS206* que al elevar el nivel de ppGpp, deprime la tasa de crecimiento (Cashel y Rudd, 1987). También en este caso los títulos de células totales y formadoras de colonias mantuvieron estrecha coincidencia.

En contraste con lo observado con las cepas anteriores, la derivada *rodA22::Tn10Δ16Δ17* de DA1138 (Figura 13) mostró diferencias tanto a 30°C como a 41°C. Si bien la curva de densidad óptica fue similar a las dos temperaturas, pero con evidencias de una más temprana entrada en fase estacionaria a 30°C, la curva representativa del número total de células mostró

una pendiente mucho menor a 30°C que a 41°, y la correspondiente al número de células formadoras de colonias no mostró aumento pese al mantenimiento de un cierto nivel de división y a diferencia con el cultivo de 41°C que presentó un aumento de casi 100 veces en el mismo parámetro. Como consecuencia de estas alteraciones se produjo en el cultivo de 30°C un considerable desfase entre el número total de células y el de células viables que indica que gran parte de aquellas son incapaces de producir colonias.

El comportamiento de la derivada *mre-17::Tn10Δ16Δ17* (Figura 14) fue muy similar al de la cepa *rodA22*, ya que como ésta, presentó una drástica reducción en la tasa de división (número total de células) y detención en el aumento de las células formadoras de colonias a 30°C, que en este experimento mostraron una transitoria disminución observada sólo en algunos casos. También las características de las curvas de densidad óptica fueron similares a las de la cepa *rodA22*, observándose claramente la más temprana detención del cultivo de 30°C.

Por otra parte, pudo observarse en los cultivos logarítmicos a 41°C de los derivados *rodA22* y *mre-17* (Figuras 13 y 14) que una cierta proporción de las células presentes, variable de experimento en experimento, tampoco formaba colonia. Esa anomalía se fue atenuando con el tiempo (el aumento de células viables mostró mayor pendiente que la del número total de células) y desapareció al llegar el cultivo de 41°C a la fase estacionaria.

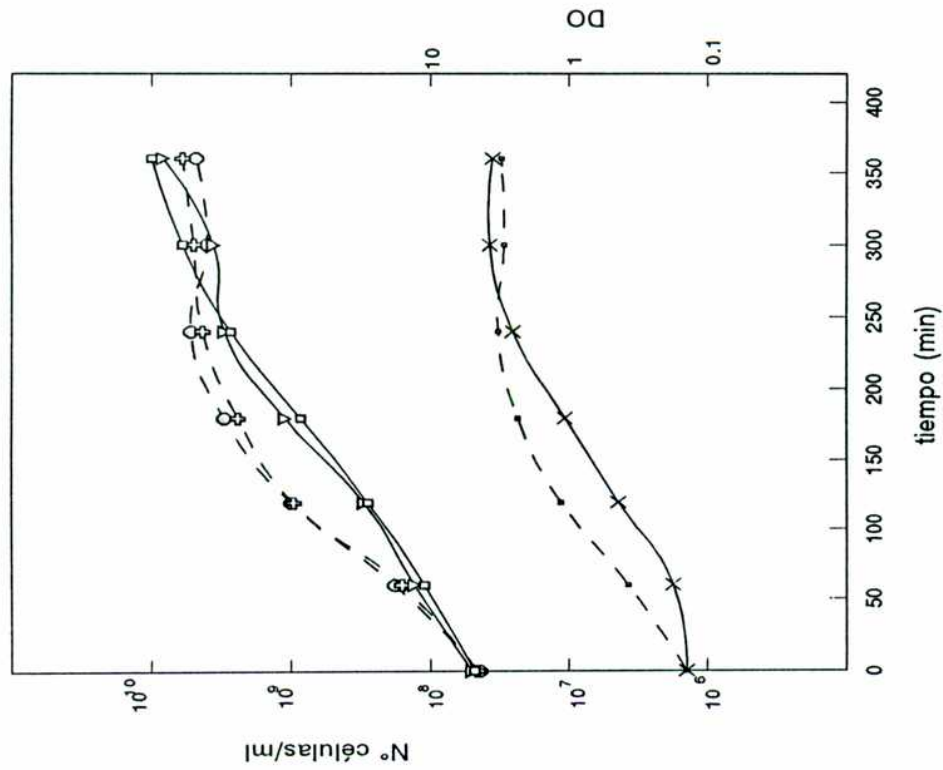
A diferencia de las cepas con inserciones en *rodA* y *mre*, el derivado *divD135::Tn10Δ16Δ17* mostró a 30°C un comportamiento normal (Figura 15) y muy semejante, hasta los 120 minutos, al de la cepa DA1138 a la misma temperatura (Figura 12). Posteriormente, el aumento en el número total de células y número de células viables fue algo menor que en la cepa control DA1138. Con la cepa *divD135* no se advirtieron las anomalías observadas en las otras mutantes esféricas en la relación entre bacterias totales y

formadoras de colonias. A 41°C, este derivado presentó un aumento en el número total de células y número de células viables superior al observado con los derivados *rodA22* y *mre-17*.

Los experimentos presentados demuestran que la división celular y la formación de colonias son las funciones más seriamente afectadas por las mutaciones letales *rodA22::Tn10Δ16Δ17* y *mre-17::Tn10Δ16Δ17* en ausencia de tolerancia a las mismas. Por otra parte, los resultados confirman que la función del gen *divD* es necesaria para el control de la forma celular pero no es requerida para la supervivencia de la bacteria.

El análisis de la "masa" celular promedio en los experimentos descritos demostró que las bacterias de los derivados *rodA22* y *mre-17* aumentaban notablemente de tamaño durante la incubación a 30°C, superando el volumen de las células mantenidas a 41°C (datos no mostrados). Este aumento fue también evidente en estudios de distribución de tamaños realizados con el contador Coulter, que además indicaron que las células de los cultivos a 30°C mostraban una mayor heterogeneidad en el tamaño celular que los cultivos a 41°C (datos no mostrados). Este comportamiento no parece deberse a la forma esférica de las bacterias, ya que las células de la cepa *divD135* presentaron volúmenes similares a 30°C y 41°C, lo que sugiere que está causado por la falta de los productos génicos inactivados por las mutaciones *rodA* y *mre*.

Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa LT2

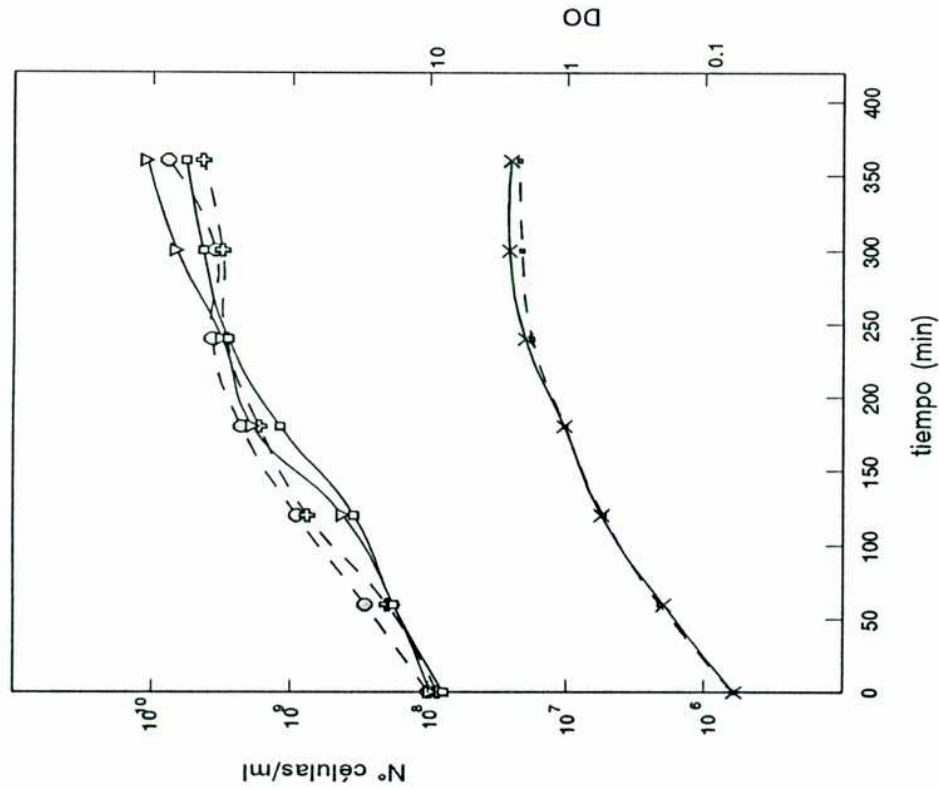


Referencias:

- Total 30°C ▽ Viable 30°C * DO 30°C
- ◇ Total 41°C ◊ Viable 41°C → DO 41°C

Se partió de un cultivo logarítmico de cada cepa a 41°C, que fue diluido hasta DO=0,100. El cultivo se dividió en dos partes (tiempo 0): una fue incubada a 30°C y la otra a 41°C. Se tomaron muestras cada 60 minutos de ambos cultivos para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

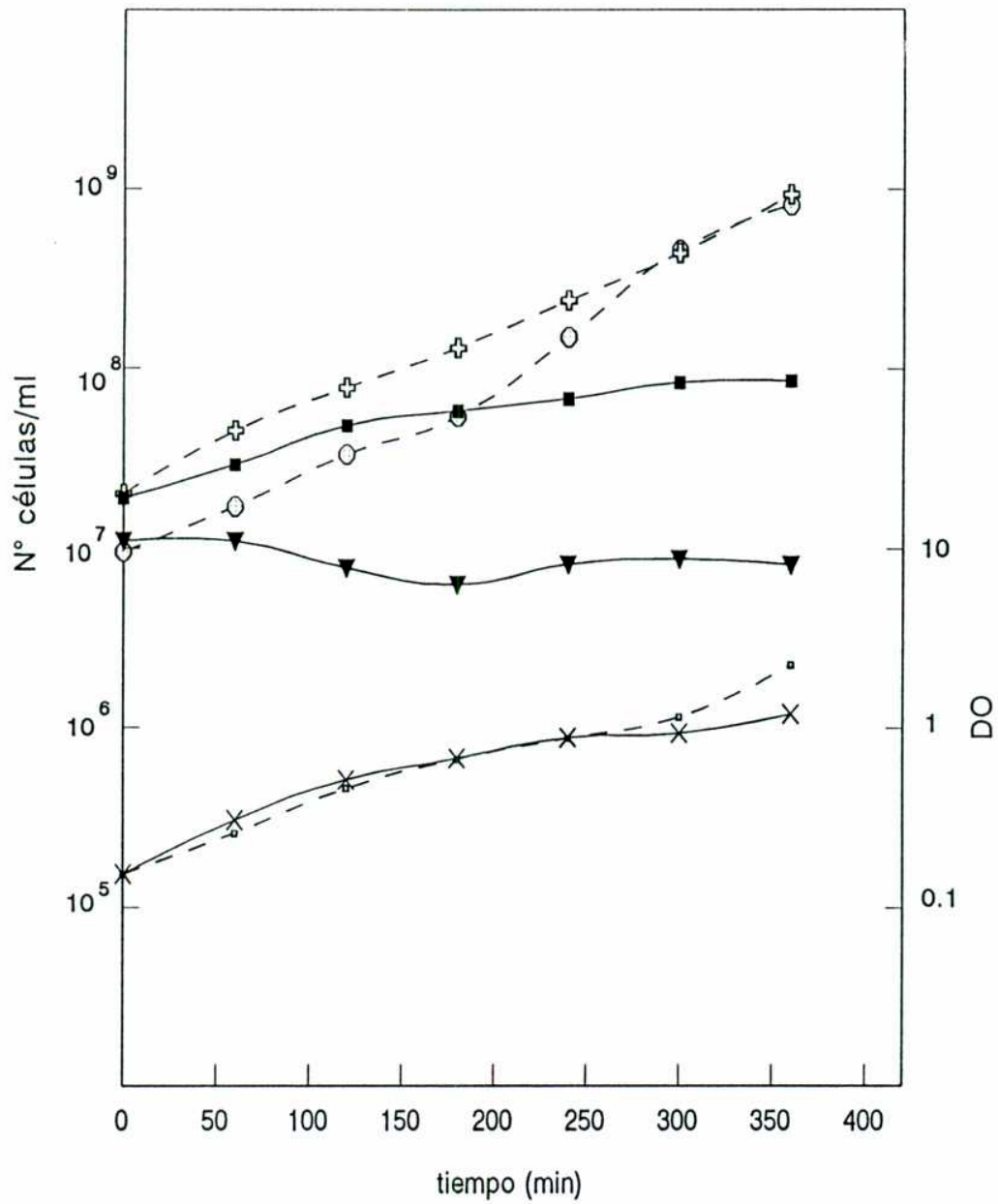
Figura 12. Cinética de crecimiento de la cepa DA1138



Referencias:

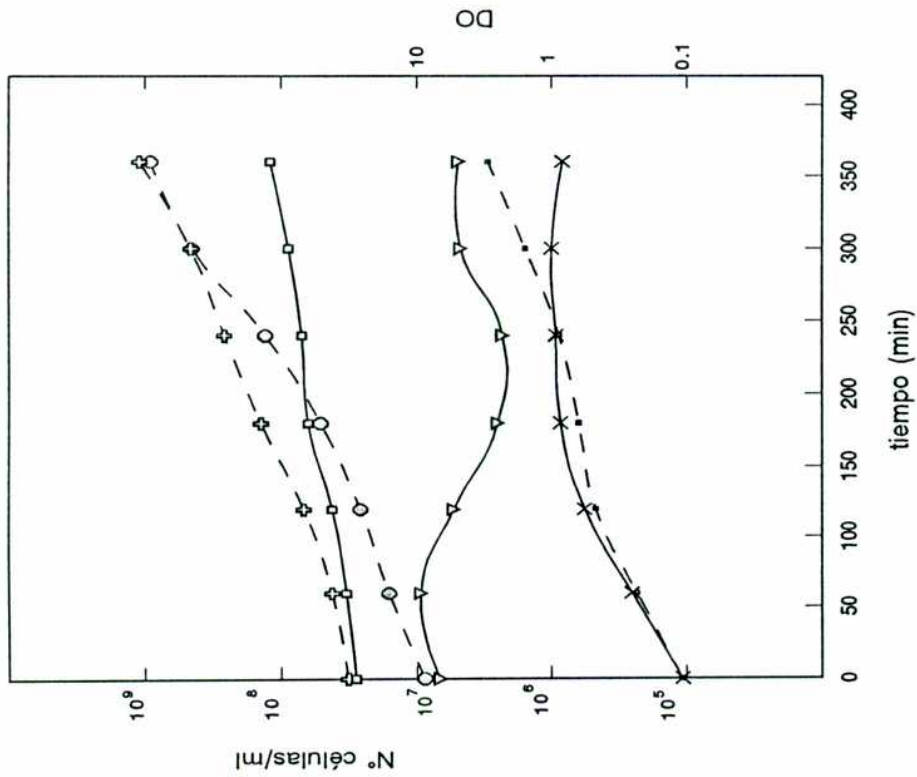
- Total 30°C ▽ Viable 30°C * DO 30°C
- ◇ Total 41°C ◊ Viable 41°C → DO 41°C

Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa DA1138 *rodA22*



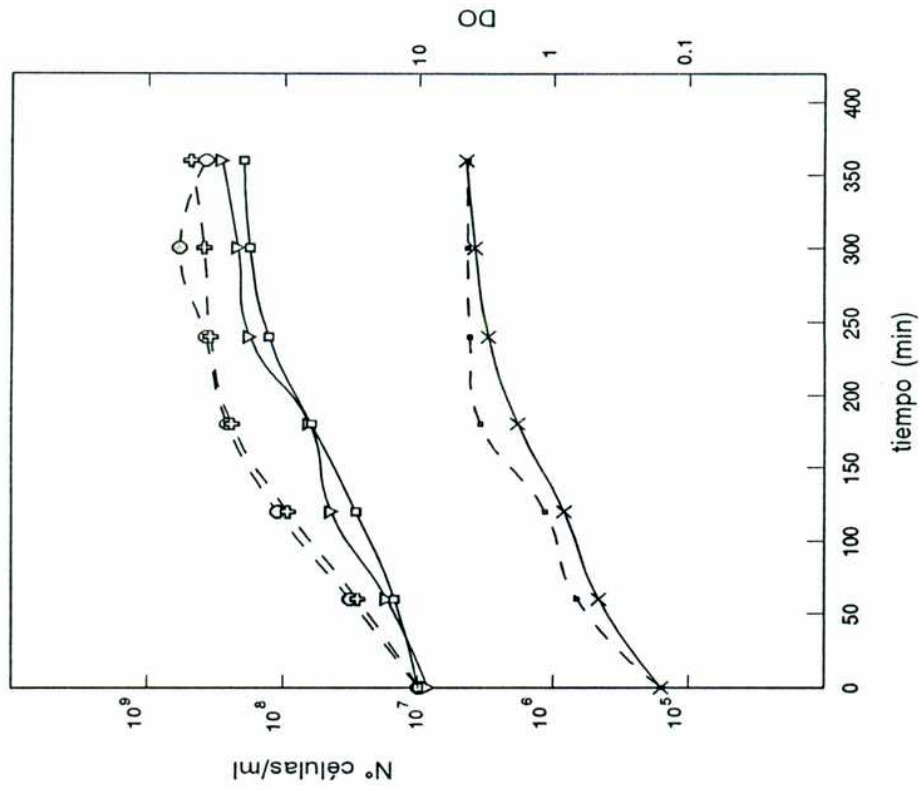
El experimento se realizó como se indicó en las Figuras 11 y 12.

Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa DA1138 *mre-17*



Referencias:
 □ Total 30°C ▽ Viable 30°C ✱ DO 30°C
 ◇ Total 41°C ◊ Viable 41°C ✱ DO 41°C

Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa DA1138 *divD135*



Referencias:
 □ Total 30°C ▽ Viable 30°C ✱ DO 30°C
 ◇ Total 41°C ◊ Viable 41°C ✱ DO 41°C

Los experimentos se realizaron como se indicó en las Figuras 11 y 12.

2. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular

Las evidencias de que gran parte de las células *rodA22* y *mre-17* en los cultivos de 30°C no eran capaces de formar colonias sobre medio completo a la temperatura permisiva (41°C) planteó la duda de si esa inactivación se producía durante la incubación a 30°C o, posteriormente, ya a 41°C sobre medio sólido. Para aclarar este punto se procuró determinar la viabilidad de las células por un método que diera una respuesta inmediata y no implicara la prolongada incubación hasta la aparición de la colonia. Para ello se empleó el método de fluorescencia con naranja de acridina (Materiales y Métodos), aplicado recientemente por Zambrano y col. (1993), que permite diferenciar células vivas de muertas por la fluorescencia naranja que presentan las primeras al ser teñidas por ese colorante en contraste con el color verdoso que toman las segundas (Strugger, 1948; Korgaonkar y Ranade, 1966). El colorante naranja de acridina se intercala entre los planos de las bases de los ácidos nucleicos, y, a pH 4, fluoresce con color naranja cuando está unido a ARN y verde cuando está unido a ADN. El fundamento del uso de este colorante como indicador de viabilidad celular se basa en que las células vivas contienen una elevada cantidad de ARN ribosomal en relación a su ADN, por lo que fluorescen naranja. En ausencia de ARN ribosomal (la especie más abundante de ARN), la bacteria fluoresce color verde por la unión del colorante al ADN, y, dado que la pérdida de los ribosomas impide el crecimiento, puede considerársela muerta (Siegele y col., 1993).

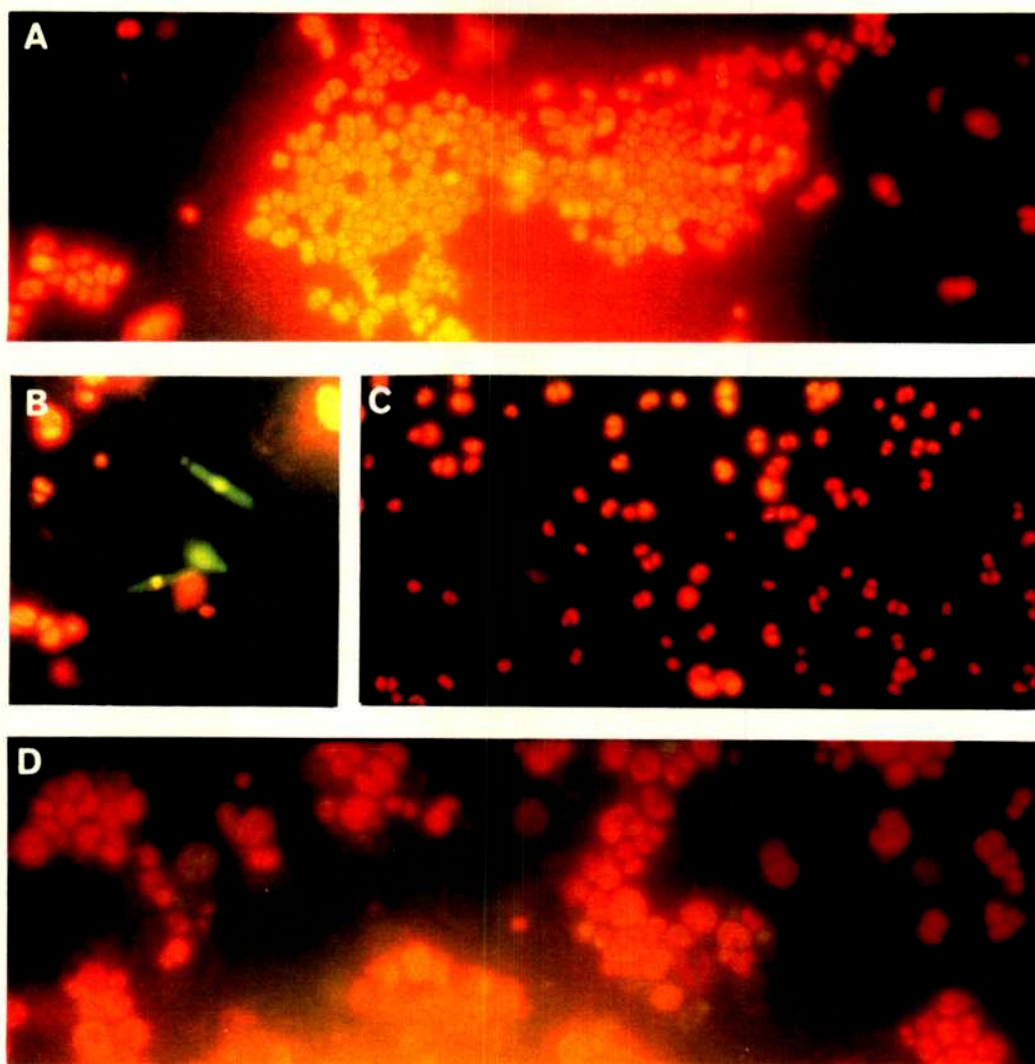
En un experimento similar al descrito en las Figuras 11 y 12 utilizando la derivada DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17(Kan)*, se trataron con el colorante muestras tomadas de los cultivos de 30°C y 41°C a diferentes tiempos y se observaron con microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos, que aparecen en la Figura 16, demostraron que al iniciar el experimento, las células mantenidas a 41°C eran esféricas, homogéneas en cuanto a su tamaño, y

todas presentaban color naranja, indicando un 100% de viabilidad (Figura 16A). Por el contrario, puede observarse en la Figura 16B que los bacilos sensibles a kanamicina (Kan-S), generados por escisión precisa del transposón tanto a 30°C como a 41°C, mostraban color verde debido al efecto bactericida de la kanamicina presente en el medio. La llegada a fase estacionaria del cultivo de 41°C se manifestó con una disminución del tamaño celular, como ocurre normalmente en esas condiciones (Kjeldgaard y col., 1958), y un evidente mantenimiento de la viabilidad demostrada por el color naranja de las células (Figura 16C).

En la condición restrictiva (30°C), a los 300 minutos de producido el pasaje a esa temperatura, cuando tan sólo el 10% de las bacterias eran capaces de formar colonia, la mayoría de las células seguían mostrando fluorescencia naranja a pesar de que en algunas comenzaban a advertirse zonas verdosas (Figura 16D). También resultó notable, en esas condiciones, el gran volumen y heterogeneidad de tamaño de las células en relación con el cultivo equivalente a 41°C (Figuras 16C y 16D).

Los resultados obtenidos indican que la inhibición del aumento de la viabilidad ocurre con posterioridad a la incubación en la condición no permisiva, ya que las bacterias incubadas en esa condición están vivas. Por lo tanto, la pérdida de viabilidad a la que se hace referencia en este trabajo corresponde a uno de los métodos utilizados para caracterizar el crecimiento bacteriano (formación de colonias), y no a un fenómeno irreversible de muerte celular.

Figura 16. Ensayo de viabilidad con naranja de acridina



Tinción con naranja de acridina de células DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17(Kan)* cultivadas a 30°C o 41°C en un experimento similar al detallado en las Figuras 11 y 12. Las bacterias que fluorescen naranja mantienen su viabilidad, mientras que las células que aparecen con color verde son aquellas no viables.

A. Cultivo al iniciar el experimento (incubado a 41°C). Se observa una población uniforme de células esféricas teñidas de color naranja.

B. Bacilos segregantes (Kan-S) en un cultivo a 41°C, 240', muertos por la acción de la kanamicina presente en el medio. La figura muestra el efecto del naranja de acridina sobre células no viables (verde) y la diferencia con las células esféricas viables (naranja) cercanas a los bacilos.

C. Cultivo a los 300', 41°C. Puede observarse que las células esféricas presentan color naranja y que han disminuído de volumen al acercarse a la fase estacionaria.

D. Cultivo a los 300', 30°C. Las células son de mayor tamaño que las de 41°C (C), presentando también mayor heterogeneidad en el volumen celular. Si bien la mayoría son color naranja, puede observarse que en algunas células comienzan a aparecer zonas verdosas.

3. Medición de la respiración celular

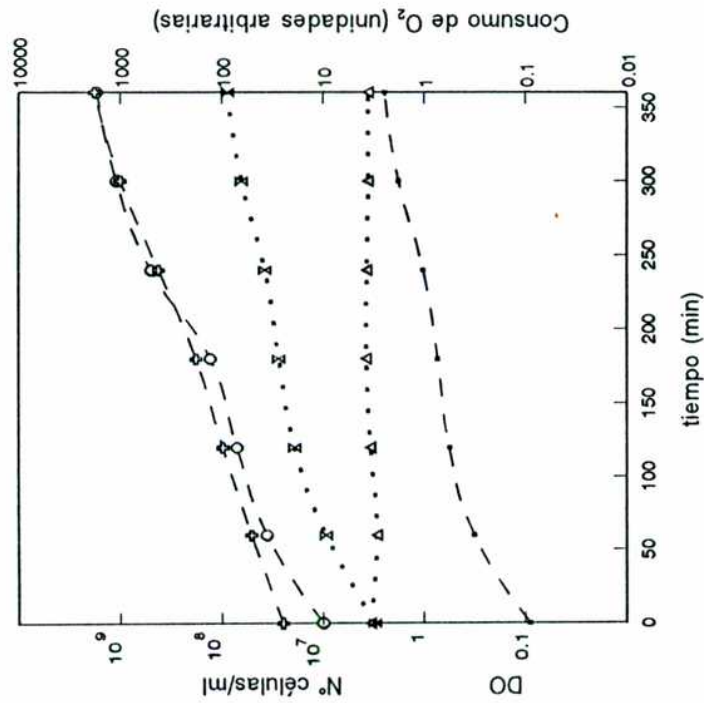
Para tratar de confirmar el resultado obtenido por tratamiento con naranja de acridina, se estudió la velocidad de consumo de oxígeno de células de DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17* en muestras proveniente de cultivos de 30°C y 41°C.

Los resultados presentados en la Figura 17 muestran que la velocidad de consumo de oxígeno y la masa celular (densidad óptica) aumentaron de la misma manera a ambas temperaturas, ya que su relación se mantuvo constante. La relación entre la velocidad de respiración y densidad óptica en condiciones restrictivas (30°C, Figura 19b) fue levemente menor respecto de lo observado en la condición permisiva (41°C, Figura 19a), posiblemente debido a la influencia de la temperatura en la tasa de consumo de oxígeno.

Estos datos demuestran que, a pesar de las profundas alteraciones causadas por la temperatura no permisiva en la formación de colonias y la división celular, la cepa DA1138 *rodA22* continúa respirando normalmente en esas condiciones.

Figura 17. Consumo de O₂ de células de DA1138 *rodA22* a 41°C y 30°C

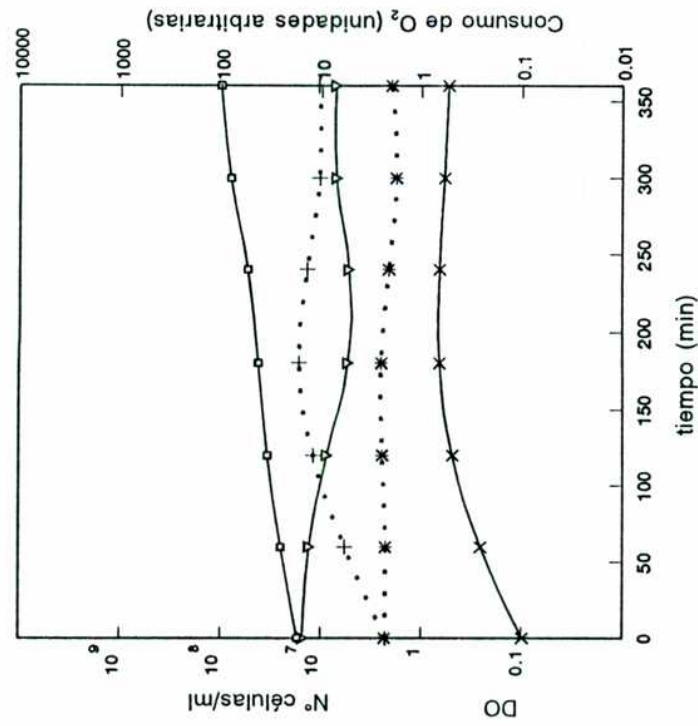
a. Cultivo a 41°C



Referencias:

- DO
- N° de células viables*
- △ (Consumo de O₂/DO)/10
- N° total de células
- × Consumo de O₂

b. Cultivo a 30°C



Referencias:

- × DO
- ▽ N° de células viables*
- × (Consumo de O₂/DO)/10
- N° total de células
- + Consumo de O₂

Se utilizó el mismo procedimiento que en los experimentos de las Figuras 11 y 12, midiéndose además la velocidad de consumo de oxígeno de muestras tomadas a diferentes tiempos.

*Corresponde al N° de células formadoras de colonias.

IV. Comportamiento de la cepa DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17* en fase estacionaria

1. Recuperación de la viabilidad celular en condiciones de no-tolerancia en fase estacionaria

Los estudios del crecimiento de los derivados esféricos de DA1138 hasta aquí analizados se realizaron a lo largo de seis horas que abarcaban la fase logarítmica de crecimiento bacteriano. En forma rutinaria, se tomaron, también, muestras de los cultivos mantenidos durante toda la noche a 30°C y 41°C, para medir densidad óptica, viabilidad y número total de células en la fase estacionaria.

Curiosamente, se observó que los cultivos de las cepas DA1138 *rodA22* y DA1138 *mre-17* que en fase logarítmica a 30°C mostraban una drástica inhibición en el aumento de células formadoras de colonias, al cabo de 20 horas de incubación a la temperatura no permisiva presentaban un título de células viables similar al del cultivo mantenido a 41°C. Estos resultados indicaron que en algún momento posterior a las seis primeras horas, a 30°C, se revertía el efecto de la falta de tolerancia y las células recuperaban la capacidad de formar colonias en las condiciones restrictivas.

Para estudiar este fenómeno y observar cómo y en qué momento ocurría la recuperación, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de 10 horas de duración con la cepa DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17*, a 30°C y 41°C. Para realizar estos experimentos se varió el procedimiento habitual en la forma detallada en Materiales y Métodos.

La Figura 18 muestra los resultados obtenidos. En la condición permisiva (41°C) se observó un aumento exponencial del número total de células y células viables, llegando el cultivo a la fase estacionaria a las 6 horas de iniciado el ensayo. A diferencia con la curva de densidad óptica a 41°C, que aumentó hasta

llegar a su valor máximo, la densidad óptica del cultivo en condiciones de no-tolerancia (30°C) mostró una meseta, con un nuevo aumento posterior hasta detenerse en forma definitiva. Confirmando lo observado en los experimentos de corta duración, el número total de células aumentó a 30°C en forma constante, aunque a una velocidad mucho menor que en la condición permisiva. El número de células capaces de formar colonias a 30°C no se modificó durante cierto período (tres horas en este caso, pero variable entre diferentes experimentos) y luego, coincidiendo con el cese de aumento de masa celular, comenzó a incrementarse rápidamente, a una velocidad aún mayor que la tasa de división celular a la misma temperatura. Estos resultados indican que la incapacidad de las células para formar colonias en condiciones de no-tolerancia puede revertirse por un fenómeno, de naturaleza desconocida, que se produce cuando el cultivo llega a fase estacionaria.

2. Recuperación de la viabilidad celular por aclón de acetato o benzoato

La coincidencia entre la llegada a fase estacionaria y la recuperación de la viabilidad celular en el cultivo a 30°C sugiere que este hecho podría estar relacionado con los fenómenos que caracterizan esa fase de crecimiento.

Estudios recientes han demostrado que la entrada en fase estacionaria pone en marcha un complejo programa regulatorio que resulta en la síntesis de una variedad de proteínas que caracterizan a esta etapa del crecimiento (Groat y col., 1986; Spector y col., 1986). Se ha observado, además, que los promotores de muchas de ellas están bajo el control del producto del gen *rpoS* (también conocido como *katF*) (Lange y Hengge-Aronis, 1991). La proteína codificada por el gen *rpoS* corresponde a un factor sigma (Mulvey y Loewen, 1989; Tanaka y col.,

1993), denominado σ^S , cuya estructura es altamente similar a la de σ^{70} , el principal factor sigma celular. La síntesis de esta importante proteína reguladora se incrementa en fase logarítmica tardía y alcanza su nivel máximo en fase estacionaria (Lange y Hengge-Aronis, 1994). No se conocen aún los factores responsables de la inducción de σ^S , aunque se han postulado varias señales entre las cuales están ppGpp (Gentry y col., 1993) y la homolactona serina (Huisman y Kolter, 1994). Schellhorn y col. (1992) demostraron que el acetato, producto acumulado en fase estacionaria durante el crecimiento en medio completo, es capaz de inducir, en fase exponencial, la producción de β -galactosidasa en una fusión transcripcional del operon lactosa al gen *rpoS* y el mismo fenómeno se observó con benzoato (Mulvey y col., 1990).

Se aprovechó la característica de acetato y benzoato de inducir *rpoS* para investigar la posibilidad de provocar artificialmente, en fase logarítmica, la restauración de la viabilidad celular que se produce naturalmente en fase estacionaria. Para ello, se agregó acetato de sodio (100 mM) al medio de cultivo en cinéticas de crecimiento a 30°C y 41°C con la cepa DA1138 *rodA22::Tn10 Δ 16 Δ 17*.

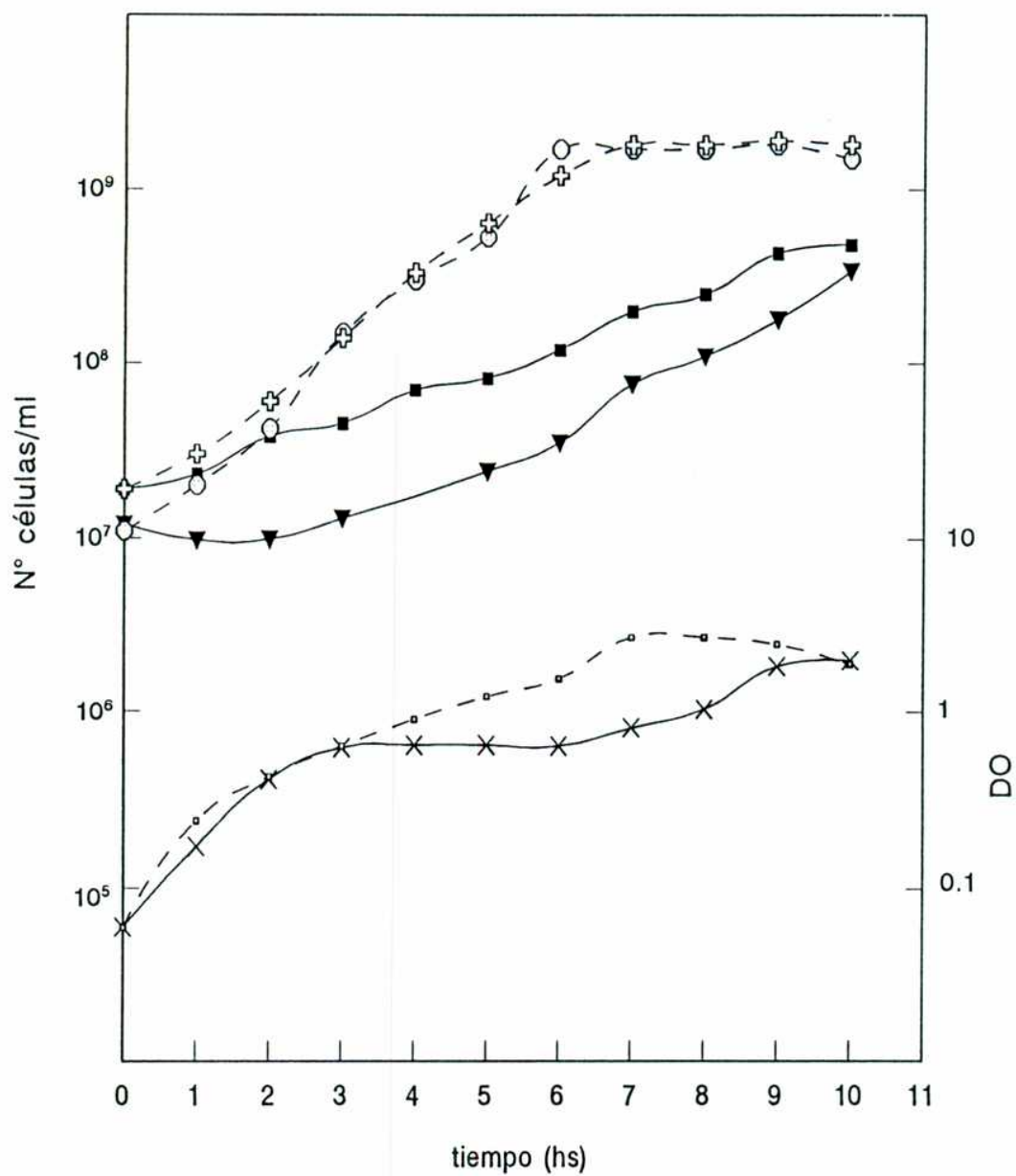
El agregado de acetato de sodio a 30°C (Figura 19) produjo una rápida restauración de la capacidad de formación de colonias, marcadamente inhibida en el control sin el compuesto, así como también un cierto aumento en la división celular. A 41°C, el acetato causó una ligera depresión en la tasa de división y afectó levemente la viabilidad celular del cultivo (datos no mostrados), destacando aún más la positiva acción ejercida a 30°C. Debe resaltarse el notable efecto del acetato sobre la densidad óptica, ya que provocó una severa inhibición en la tasa de aumento de masa a 30°C (y también a 41°C, datos no mostrados) con disminución del volumen celular (datos no mostrados).

Un experimento similar al realizado con acetato de sodio se llevó a cabo con benzoato de sodio, otro posible inductor del gen *rpoS*. El benzoato de sodio (25 mM), al igual que el acetato, también permitió la recuperación de la viabilidad celular en condiciones restrictivas (30°C), así como un cierto incremento de la división celular; a 41° casi no tuvo efecto en estos parámetros. Sin embargo, a diferencia de acetato, el benzoato afectó levemente el incremento de masa celular a 30° aunque sí lo deprimió a 41°C (datos no mostrados).

También se ensayó el efecto de compuestos que mostraron no ser inductores de fusiones con el gen *rpoS*, como formiato de sodio (Schellhorn y col., 1992) o con el gen *katE* (uno de los genes cuya transcripción depende de *rpoS*), como glutamato de sodio (Mulvey y col., 1990). En la Figura 20 se demuestra que el glutamato 40 mM no tuvo efecto significativo sobre las curvas de crecimiento a 30°C y 41°C respecto de los controles sin el compuesto e idéntico resultado se observó con formiato de sodio 40 mM (datos no mostrados).

La notable recuperación de la viabilidad celular causada por acetato y benzoato, posibles inductores del gen *rpoS*, durante la fase exponencial en condiciones restrictivas, sugiere que este gen podría estar involucrado en la restauración observada en fase estacionaria.

Figura 18. Cinética de la cepa DA1138 *rodA22* hasta fase estacionaria

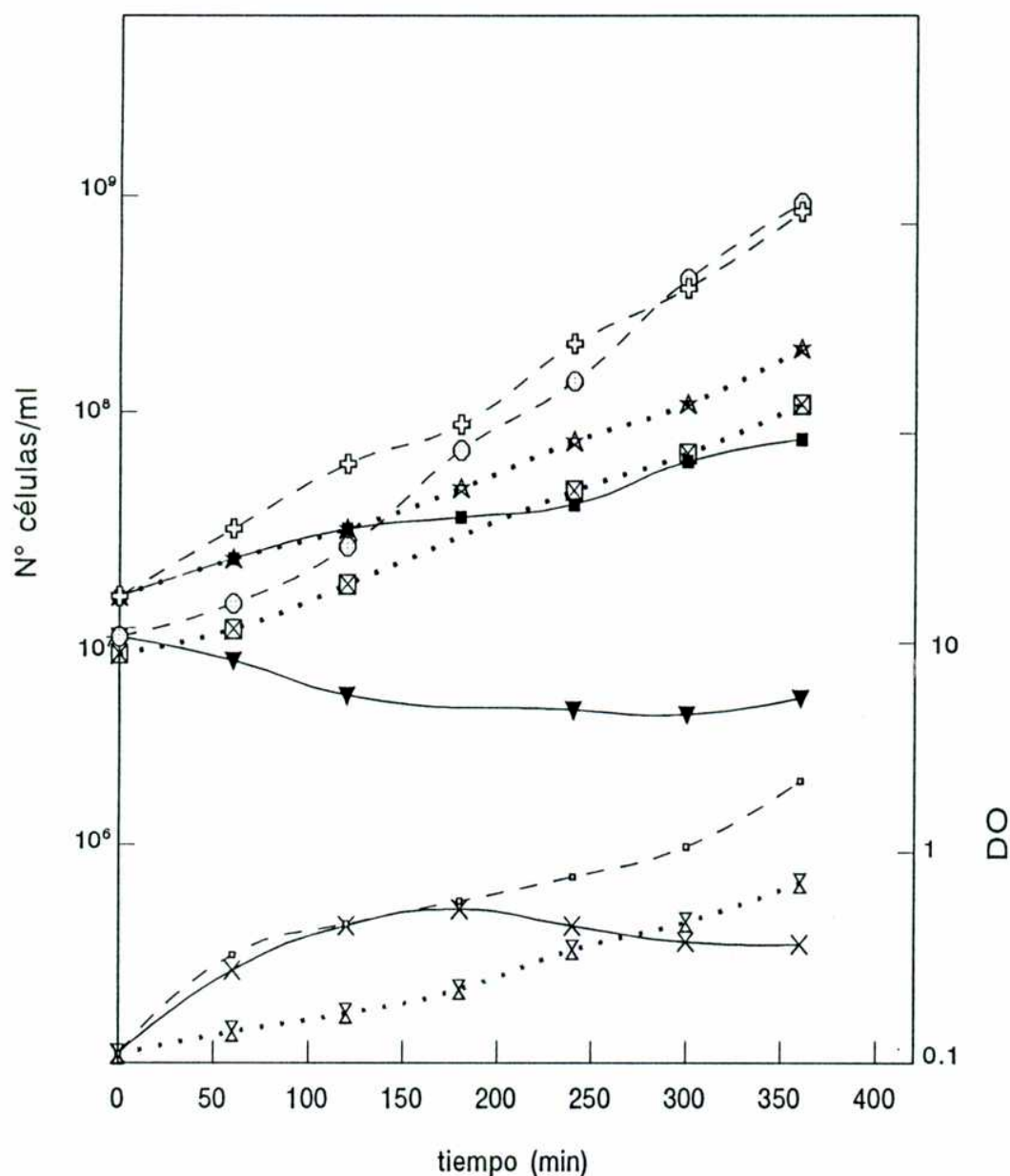


Referencias:

- DO 41°C + Total 41°C ○ Viable 41°C
 × DO 30°C ■ Total 30°C ▼ Viable 30°C

Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C. Este fue diluido hasta DO=0,050 y dividido en dos partes (tiempo 0): una se incubó a 30°C y la otra a 41°C. Se tomaron muestras de ambos cultivos para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

Figura 19. Efecto del acetato en el crecimiento de la cepa DA1138 *rodA22*



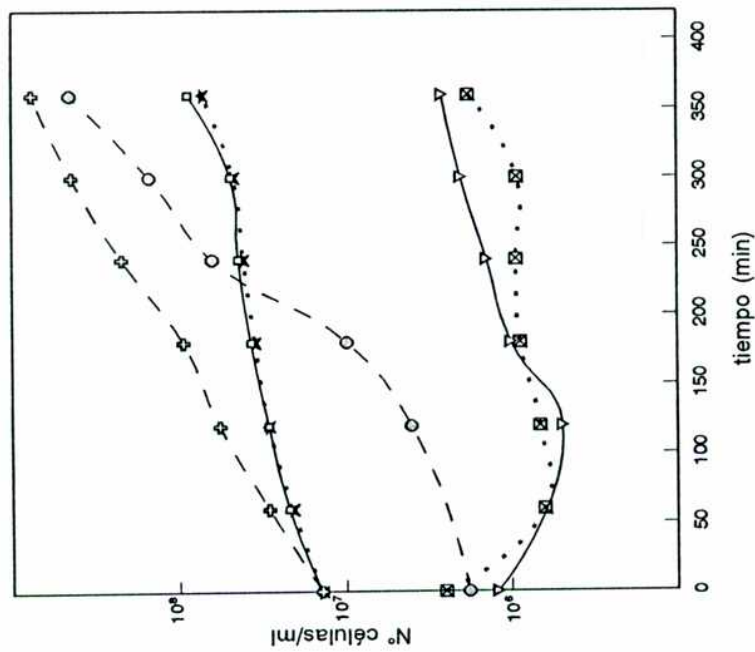
Referencias:

- | | | |
|------------------|---------------------|----------------------|
| —□— DO 41°C | —+— Total 41°C | —○— Viable 41°C |
| —×— DO 30°C | —■— Total 30°C | —▼— Viable 30°C |
| —⊗— DO 30°C+AcNa | —☆— Total 30°C+AcNa | —⊠— Viable 30°C+AcNa |

Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C. Este fue diluído hasta DO=0,100 y dividido en 4 subcultivos (tiempo 0), que fueron incubados en las siguientes condiciones: 30°C, 30°C+AcNa 100mM, 41°C y 41°C+AcNa 100mM (para esta última condición no se muestran los datos obtenidos). Se tomaron muestras para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

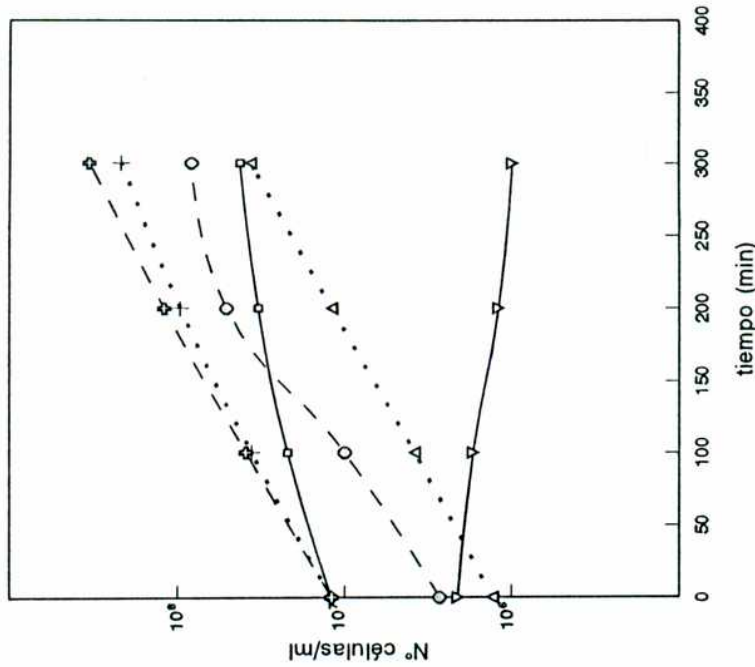
Figura 20. Efecto del glutamato en el crecimiento de la cepa DA1138 *rodA22*

a. Efecto del glutamato a 30°C



Referencias:
 ◆ Total 30°C ★ Total 30°C+glut
 ◇ Viable 30°C ▣ Viable 30°C+glut

b. Efecto del glutamato a 41°C



Referencias:
 ◆ Total 41°C ★ Total 41°C+glut
 ◇ Viable 41°C ▣ Viable 41°C+glut

Se partió en ambos experimentos de cultivos logarítmicos a 41°C, que se diluyeron hasta $DO=0,100$. En ese momento (tiempo 0), se los dividió en subcultivos que se incubaron en las siguientes condiciones: 30°C, 41°C y 30°C+glutamato 40mM (Figura 22a) ó 30°C, 41°C y 41°C+glutamato 40mM (Figura 22b). Se tomaron muestras para medir: N° total de células (Total) y N° de células capaces de formar colonias (Viable).

V. Efecto de mutaciones *rpoS* en el comportamiento de la cepa DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17*

Los resultados presentados demuestran que uno de los principales efectos de la mutación *rodA22*, en fase exponencial y en condiciones de no-tolerancia, es la inhibición de la viabilidad celular. Pero dado que la entrada en fase estacionaria, etapa caracterizada por un aumento de la actividad del factor σ^s , codificado por el gen *rpoS*, coincidió con la rápida reversión de esa inhibición y el agregado en fase exponencial de posibles inductores de *rpoS* (acetato o benzoato de sodio) también resultó en una efectiva recuperación del número de células capaces de formar colonias, se consideró la hipótesis de que *rpoS* fuera responsable de la restauración de la viabilidad celular observada en fase estacionaria y condiciones restrictivas. Para analizar esta posibilidad, se estudió el efecto de tres mutaciones *rpoS* sobre el comportamiento de DA1138 *rodA22*.

1. Obtención y caracterización de mutaciones *rpoS*

1.1. Obtención de mutaciones *rpoS*

Se emplearon tres mutaciones del gen *rpoS*. Una de ellas, construida por Fang y col. (1992), es una mutación que inactiva totalmente al gen *rpoS* y fue obtenida por inserción en ese gen de un plásmido suicida que confiere resistencia a ampicilina. Esta mutación ha sido denominada *rpoS::Amp-R* (O'Neal y col., 1994) y se recibió del Salmonella Genetic Stock Centre, en la cepa SF1005 (Fang y col., 1992).

Las mutaciones *rpoS* restantes fueron obtenidas en este laboratorio. La característica utilizada para la búsqueda de posibles mutantes *rpoS* fue la

incapacidad de descomponer rápidamente el agua oxigenada al aplicar sobre la cepa (crecida en caja de medio completo durante 24-48 hs) 10 μ l de H₂O₂ al 30% (Lange y Hengge-Aronis, 1991). En esas condiciones, el fenotipo salvaje es un burbujeo intenso debido a la liberación de O₂ causada por la descomposición del H₂O₂ por acción de la catalasa de fase estacionaria HPII. Esta enzima está codificada por el gen *katE* (Loewen, 1984), cuya transcripción depende del factor σ^s (Loewen y Triggs, 1984; Mulvey y col, 1988; Schellhorn y Hassan, 1988); por lo tanto, los mutantes *rpoS* muestran una muy reducida capacidad de descomposición del agua oxigenada y presentan una respuesta negativa en la prueba de burbujeo en esas condiciones.

Para obtener mutantes *rpoS* se utilizaron dos procedimientos basados en informaciones obtenidas de la literatura sobre el tema. En un trabajo de Zambrano y col. (1993) se demostró que ciertas mutaciones *rpoS* se acumulan en condiciones de estrés como las existentes, por ejemplo, en prolongadas incubaciones en fase estacionaria. Haciendo uso de esta información se diseñó el procedimiento detallado en Materiales y Métodos que permitió obtener una colonia derivada de la cepa DA1674, a la que se denominó DA1682 (Tabla III), incapaz de producir burbujeo con agua oxigenada.

Por otra parte, se ha documentado la identificación de cepas portadoras de mutaciones *rpoS* en colecciones de laboratorio de *E. coli* (Touati y col., 1986) y se ha supuesto que esas mutaciones, de origen espontáneo, serían positivamente seleccionadas en las condiciones de almacenaje de los cultivos (Kolter y col., 1993). Se investigó la posible presencia de tales mutaciones *rpoS* en la colección de cepas de *S. typhimurium* de este laboratorio, empleando la prueba del burbujeo. Entre 120 cepas probadas, hubo 6 negativas, y entre ellas se eligió la denominada *hisW1509* (Roth y col., 1966), obtenida originalmente de P. E. Hartman, por su clara incapacidad para descomponer el H₂O₂. Esta última cepa y

la descrita en el párrafo anterior fueron sometidas a distintas pruebas para identificar las mutaciones responsables de su fenotipo.

1.2. Caracterización genética de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062*

a) Mapeo por cotransducción con marcadores cercanos

Si bien se ha notificado la localización cromosómica aproximada del gen *rpoS* en *S. typhimurium* entre los minutos 57 y 60 del mapa genético (Fang y col., 1992), no se han publicado datos acerca del mapeo fino de *rpoS* en dicha especie. En *E. coli* se encontró que este gen presenta aproximadamente un 40% de cotransducción con el gen *cysC* (Touati y col., 1986; Lange y Hengge-Aronis, 1991; Kaasen y col., 1992) y un 60% de cotransducción con *mutS* (Kaasen y col., 1992), en transducciones mediadas por el fago P1. Esos datos permitieron ubicar al gen *rpoS* en el minuto 59 del mapa genético de esa especie (Bachmann, 1990).

Dada la gran homología existente ente *E. coli* y *S. typhimurium* y con el propósito de analizar si las cepas DA1682 e *hisW1509* eran realmente portadoras de mutaciones *rpoS*, se procedió a analizar la cotransducción entre marcadores de la zona del minuto 60 del mapa genético de *S. typhimurium* y la incapacidad de burbujeo de ambas cepas. Los marcadores utilizados fueron la inserción *mutS121::Tn10* y la mutación *cysI23* ubicada en el grupo *cysJIHDC* del minuto 60 (Sanderson y Roth, 1988).

En la Tabla XIV pueden observarse los resultados obtenidos. Las mutaciones responsables de la falta del burbujeo de las cepas DA1682 e *hisW1509* (denominadas *rpoS1061* y *rpoS1062*, respectivamente) mostraron aproximadamente un 2% de cotransducción con los marcadores *cysI* y *mutS*, que no cotransducen entre sí. En base a estos datos se localizó el gen mutado en esas dos cepas entre los marcadores *cysI* y *mutS*, en una ubicación correspondiente a la del gen *rpoS* en *E. coli*.

Tabla XIV. Mapeo de las mutaciones *rpoS* por cotransducción con marcadores cercanos

Transducción	Marcador		N° de transductantes con el marcador no selecc. ^a /N° total de transductantes (%)
	Selecc.	No selecc.	
a. Cotransducción con <i>cysI</i> <i>cysI</i> 23 x fago DA1682 <i>cysI</i> 23 x fago <i>hisW</i> 1509	<i>cysI</i> ^r	<i>rpoS</i> 1061	3/99 (3%)
	<i>cysI</i> ^r	<i>rpoS</i> 1062	2/100 (2%)
b. Cotransducción con <i>mutS</i> DA1682 x fago GW1704 DA1138 x fago DA1683 LT2 x fago DA1683	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> ^r	9/375 (2,4%)
	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> 1061	3/156 (2%)
	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> 1061	2/156 (1,3%)
<i>hisW</i> 1509 x fago GW1704 DA1138 x fago DA1685 LT2 x fago DA1685	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> ^r	24/881 (2,7%)
	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> 1062	2/148 (1,3%)
	Tet-R ^b	<i>rpoS</i> 1062	2/156 (1,3%)
c. Cotransducción entre <i>cysI</i> y <i>mutS</i> DA1700 x fagos <i>mutS</i> 121::Tn10 ^r <i>cysI</i> 23 x fago DA1677 <i>cysI</i> 23 x fago DA1677	<i>cysI</i> ^r	Tet-R ^b	0/280 (≤ 0,36%)
	<i>cysI</i> ^r	Tet-R ^b	0/120 (≤ 0,83%)
	Tet-R ^b	<i>cysI</i> ^r	0/120 (≤ 0,83%)

^a La presencia del marcador no seleccionado en a y b se realizó probando en las colonias *cysI*^r o *mutS*121::Tn10 (Tet-R) la capacidad para descomponer H₂O₂ al 30%.

^b Corresponde al marcador *mutS*121::Tn10, seleccionado por resistencia a tetraciclina (Tet-R).

^c Se utilizaron distintos fagos portadores de la mutación *mutS*121::Tn10.

b) Identificación por complementación génica

La confirmación de las cepas DA1682 e *hisW1509* como mutantes *rpoS* se realizó por complementación génica, utilizando el plásmido pMMkatF3 portador del alelo *rpoS*⁺ de *E. coli*, recibido de P. C. Loewen (Mulvey y col., 1988). Para ello, se transdujo a los derivados DA1684 (*rpoS1061*) y DA1687 (*rpoS1062*) con un lisado obtenido en la cepa DA1697, portadora del plásmido pMMkatF3, seleccionando los transductantes portadores del plásmido por la resistencia a ampicilina que éste confiere.

La entrada de pMMkatF3 determinó la recuperación por ambas cepas de la capacidad de descomponer H₂O₂ con burbujeo intenso y de fermentar trehalosa; esta última, es otra característica dependiente de *rpoS* (ver más abajo) alterada en esas cepas. Por otra parte, la pérdida del plásmido por segregación, con la consiguiente recuperación de la sensibilidad a ampicilina, determinó la reaparición del fenotipo negativo en la prueba del burbujeo y la incapacidad de fermentar trehalosa. Estos resultados confirman que las mutaciones obtenidas, *rpoS1061* y *rpoS1062*, afectan al gen *rpoS* de *S. typhimurium*.

1.3. Caracterización fenotípica de las mutaciones *rpoS*

Se estudiaron dos características fenotípicas controladas por el gen *rpoS* en cepas isogénicas portadoras de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062* y de la inserción *rpoS*::Amp-R.

Se ha descrito tanto en *S. typhimurium* como en *E. coli* que las cepas portadoras de mutaciones *rpoS* pierden fácilmente viabilidad cuando son expuestas al H₂O₂ 15 mM (Lange y Hengge-Aronis, 1991; Fang y col., 1992) debido a su incapacidad para descomponer peróxidos. En nuestras condiciones de trabajo, esa característica se observó con H₂O₂ 40 mM (Materiales y Métodos): los derivados *rpoS* se comportaron como muy sensibles mientras que las cepas

rpoS⁺ mantuvieron la viabilidad inicial (Tabla XV). En la misma tabla se muestra en forma cualitativa la producción de burbujeo con H₂O₂ 30% de cada derivado.

También se ha demostrado, a través del uso de fusiones génicas, el papel del factor σ^s en la transcripción de genes relacionados con la utilización y síntesis de trehalosa (Hengge-Aronis y col., 1991; Kaasen y col., 1992). Por ello se estudió la capacidad de las cepas para fermentar ese azúcar en medio indicador EMB con trehalosa (Materiales y Métodos). Se pudo observar que mientras las cepas *rpoS*⁺ eran capaces de fermentar normalmente la trehalosa, los derivados *rpoS* no contaban con la capacidad para hacerlo (Tabla XV).

Tabla XV. Caracterización fenotípica de mutaciones *rpoS*

Cepa	Burbujeo con H ₂ O ₂ 30% ^d	Viabilidad en H ₂ O ₂ 40 mM	Fermentación de trehalosa ^e
LT2 (tipo salvaje)	+	100%	F
LT2 <i>rpoS</i> ⁺ <i>mutS121::Tn10</i> ^a	+	92%	F
LT2 <i>rpoS1061 mutS121::Tn10</i> ^b		3,7%	NF
LT2 <i>rpoS1062 mutS121::Tn10</i> ^b	-	0,09%	NF
LT2 <i>rpoS::Amp-R</i> ^c	-	12%	NF

^a Cepa obtenida por transducción entre LT2 y fago DA1685 (*mutS121::Tn10 rpoS1062*). Se seleccionó el marcador *mutS121::Tn10* (2% cotransducible con *rpoS*) por resistencia a tetraciclina y se conservó un derivado capaz de burbujear intensamente con H₂O₂ (*rpoS*⁺).

^b Cepas obtenidas por transducción de LT2 con fagos DA1683 (*mutS121::Tn10 rpoS1061*) ó DA1685 (*mutS121::Tn10 rpoS1062*). Se seleccionó resistencia a tetraciclina y se conservó un derivado incapaz de burbujear con H₂O₂.

^c Cepa obtenida por transducción entre LT2 y fago SF1005, por selección de resistencia a ampicilina.

^d +: burbujeo intenso, -: no burbujeo.

^e F: fermentación (colonias verde metálico), NF: no fermentación (colonias rosadas).

2. Comportamiento de derivados *rpoS* de la cepa DA1138 *rodA22::Tn10Δ16Δ17*

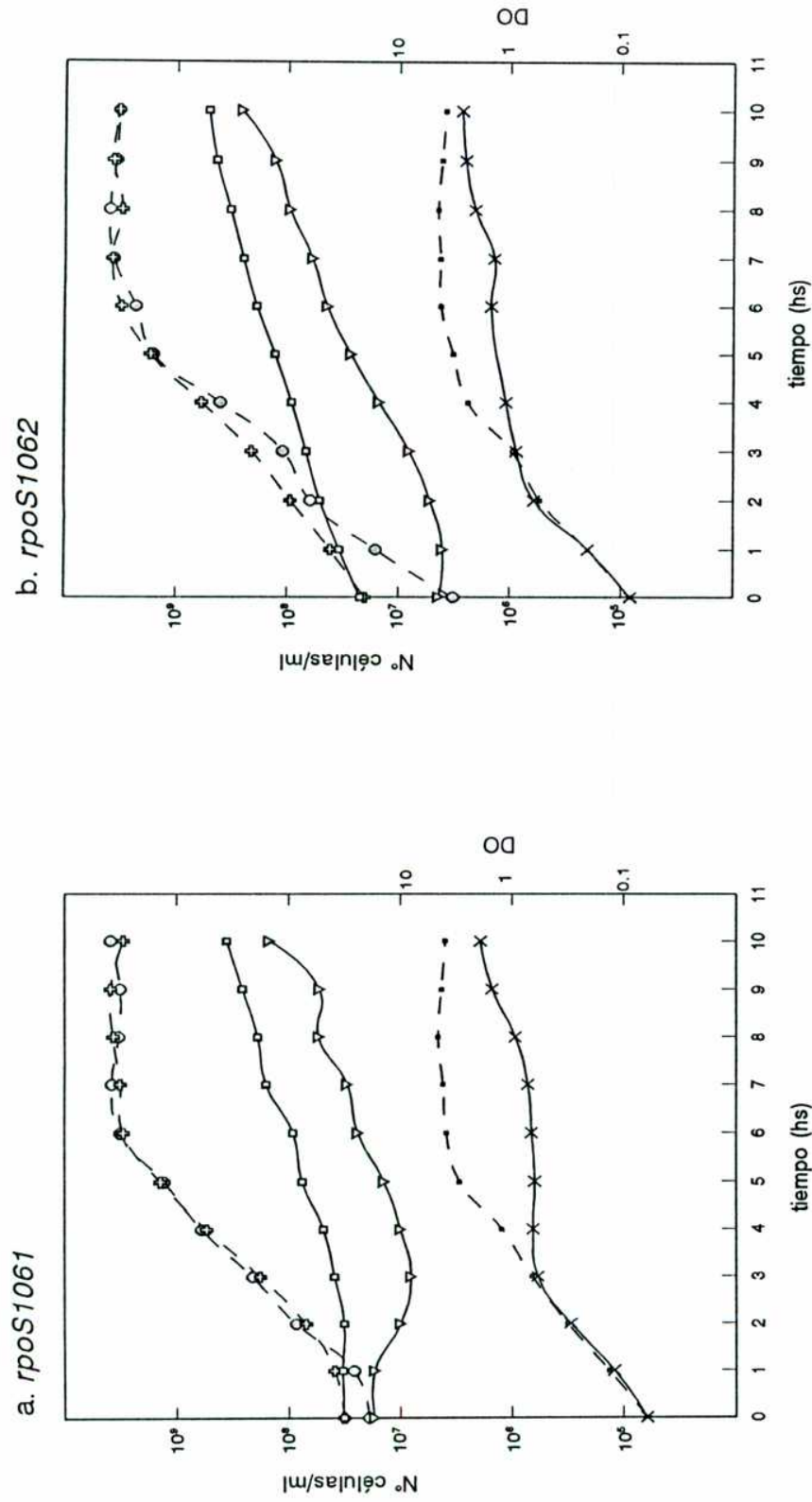
2.1. Derivados DA1138 *rodA22 rpoS1061* y *rpoS1062*

Para la obtención de estas cepas se construyeron derivados de DA1138 portadores de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062*. Para ello, se realizaron transducciones entre DA1138 y lisados de DA1683 y DA1685 (Tabla III), y se seleccionó el marcador *mutS121::Tn10* (2% cotransducible con *rpoS*) por resistencia a tetraciclina. Se conservaron derivados de DA1138 incapaces de producir burbujeo con H₂O₂, portadores de las mutaciones *rpoS1061* (DA1684) o *rpoS1062* (DA1687). Finalmente, se introdujo la mutación *rodA22::Tn10Δ16Δ17* en esas dos cepas mediante transducción con un lisado obtenido en DA1368 y selección de resistencia a kanamicina a 41°C.

Con el propósito de observar el comportamiento de las cepas DA1138 *rodA22 rpoS1061* y *rpoS1062* en fase estacionaria se realizaron cinéticas de crecimiento de 10 horas de duración (Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 21. La presencia de las mutaciones *rpoS1061* o *rpoS1062* no modificó significativamente el comportamiento a 41°C ni a 30°C. Al igual que con la cepa *rpoS*⁺ (Figura 18), el pasaje a condiciones de no-tolerancia (30°C) produjo la característica disminución en la tasa de división y viabilidad celular, y también, como en ese caso, la entrada en fase estacionaria, medida por la variación de densidad óptica del cultivo a 30°C, coincidió con una marcada recuperación de la capacidad de formación de colonias (Figura 21).

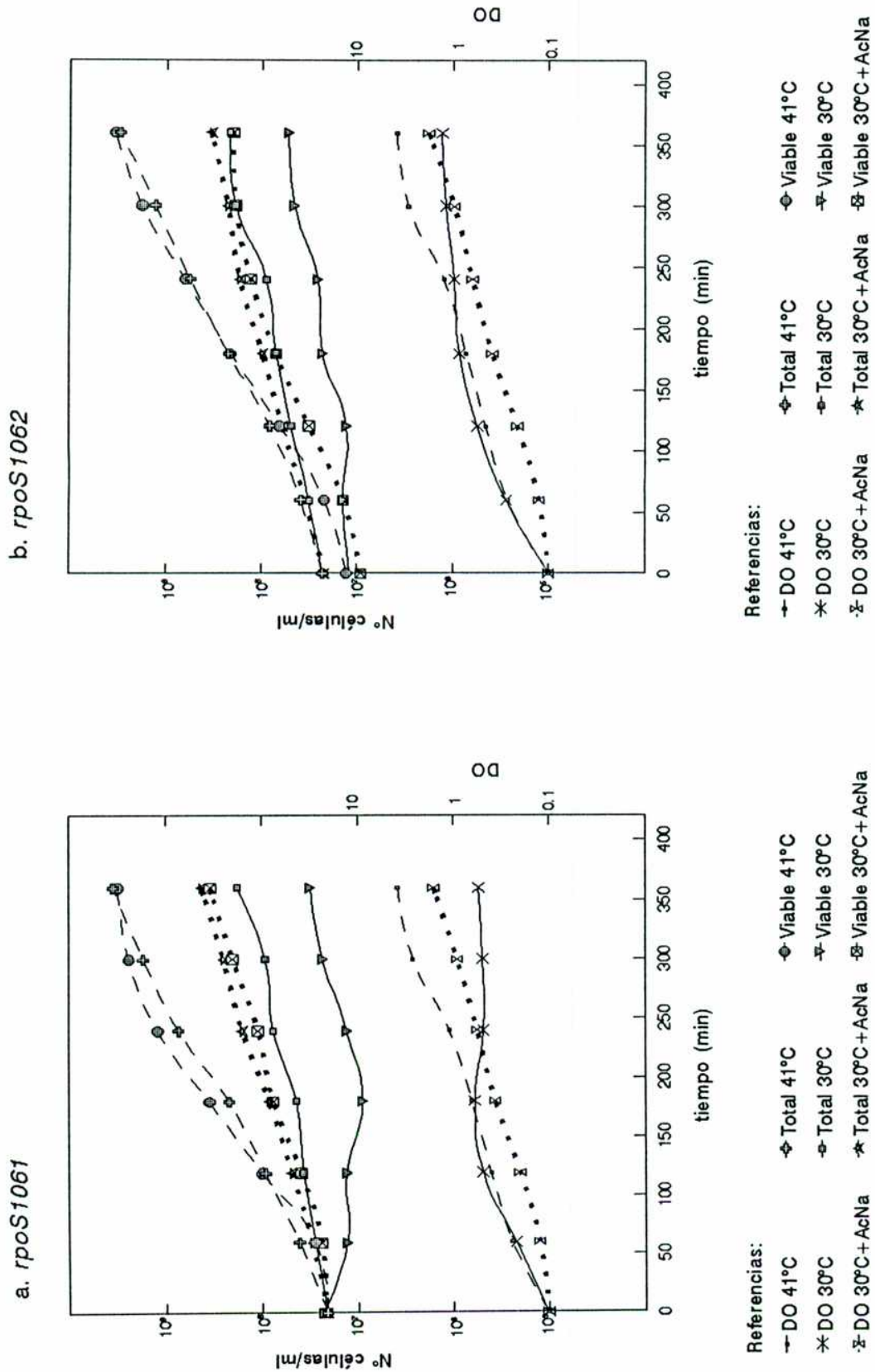
Se probó también en los derivados *rpoS* el efecto del acetato a 30°C durante la fase logarítmica. No se apreciaron diferencias importantes en la acción del acetato sobre las derivadas *rpoS* (Figura 22) en relación con la observada con la cepa *rpoS*⁺ (Figura 19). De la misma manera que con ésta, el acetato causó una

Figura 21. Cinéticas de derivados *rpoS* de DA1138 *rodA22* hasta fase estacionaria



Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C de cada derivado, que fue diluido hasta DO=0,050 y dividido en dos partes (tiempo 0): una se incubó a 30°C y la otra a 41°C. Se tomaron muestras de los subcultivos para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

Figura 22. Efecto del acetato en el crecimiento de derivados *rpoS* de la cepa DA1138 *rodA22*



Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C de cada derivado. Dichos cultivos fueron diluidos hasta DO=0,100 y divididos en 3 subcultivos (tiempo 0), que se incubaron en las siguientes condiciones: 30°C, 30°C+AcNa 100mM y 41°C. Se tomaron muestras de los mismos para medir: densidad óptica (DO), Nº total de células (Total) y Nº de células formadoras de colonias (Viable).

evidente normalización del título de células viables que rápidamente alcanzó los valores del total de células, y produjo, también, un modesto estímulo en la tasa de división celular y una drástica disminución en la densidad óptica.

Los resultados presentados indican que las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062* no afectan la acción del acetato en fase logarítmica ni la recuperación de la viabilidad en fase estacionaria y sugieren que estos fenómenos no se producen por inducción del gen *rpoS*. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre el tipo de alteración causante de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062* no permite descartar la posibilidad de que las cepas portadoras de esos alelos mantengan un cierto nivel de actividad génica, y, por lo tanto, que el comportamiento observado no sea representativo de la ausencia del factor σ^s .

2.2. Derivado DA1138 *rodA22 rpoS::Amp-R*

Dado que los resultados obtenidos con los derivados *rpoS1061* y *rpoS1062* no permiten asegurar que el gen *rpoS* no es responsable de la recuperación de la viabilidad celular en condiciones restrictivas, se utilizó la mutación *rpoS::Amp-R* que inactiva completamente a dicho gen.

Para la construcción de un derivado DA1138 *rodA22* portador de esta mutación, se construyó primero la cepa DA1138 *rpoS::Amp-R*, por transducción entre DA1138 y un lisado de SF1005, seleccionando la inserción en *rpoS* por resistencia a ampicilina. Luego, se transfirió a esa cepa la mutación *rodA22::Tn10 Δ 16 Δ 17*, por transducción con fago obtenido en DA1368 y selección de resistencia a kanamicina a 41°C.

De la misma manera que con los derivados *rpoS1061* y *rpoS1062*, se analizó en este derivado la recuperación de la viabilidad en fase estacionaria en condiciones restrictivas (30°C) y el efecto del acetato en las mismas condiciones durante la fase exponencial.

Las cinéticas de fase estacionaria arrojaron un resultado inesperado: la mutación *rpoS::Amp-R* anuló el efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular (Figura 23), a diferencia de lo observado con la cepa original DA1138 *rodA22* (Figura 18) y los derivados *rpoS1061* y *rpoS1062* (Figura 21). Asimismo, la tasa de división celular a 30°C (tiempo de duplicación o t_d de 70 minutos, Figura 23), aunque menor que a 41°C, fue superior a la observada con la cepa *rpoS** (t_d de 123 de minutos, Figura 18) y, a diferencia de ésta última, se notó claramente la entrada en fase estacionaria de ese parámetro. También se observaron diferencias en cuanto al aumento de masa celular a 30°C en el derivado *rpoS::Amp-R*, ya que la densidad óptica no presentó la detención transitoria característica de las cepas *rpoS**, *rpoS1061* y *rpoS1062*, sino que aumentó siempre hasta alcanzar la fase estacionaria. A 41°C, la cepa mostró un cierto incremento en la tasa de división celular (t_d de 39 minutos) respecto del derivado *rpoS** (t_d de 56 minutos), mientras que la densidad óptica no sufrió alteraciones de importancia (Figura 23).

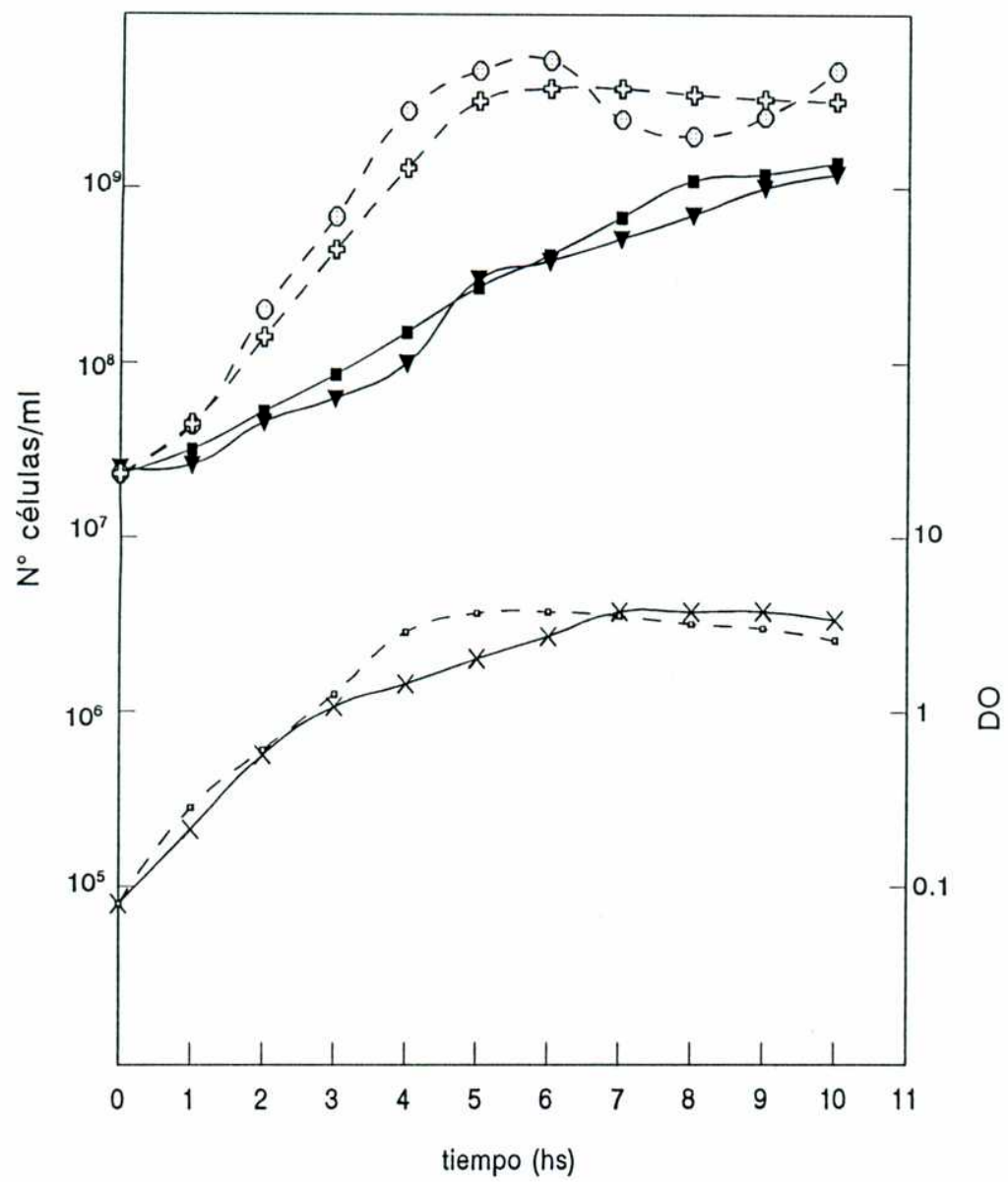
Se estudió también el efecto del acetato en condiciones restrictivas. Como puede verse en la Figura 24, salvo por la característica disminución en la densidad óptica producida por el acetato, no hubo efecto de ese agente sobre la normalización de la viabilidad a 30°C causada por la mutación *rpoS::Amp-R* ni sobre la tasa de división celular del cultivo en esas condiciones.

Si bien el derivado *rodA22 rpoS::Amp-R* de la cepa DA1138 siguió mostrando crecimiento termosensible (Figura 23), el aumento observado en la tasa de división y la normalización de la viabilidad en condiciones de no-tolerancia (30°C) con respecto a la cepa original *rpoS**, planteó la posibilidad de que la mutación *rpoS::Amp-R* estuviese actuando, a 30°C, como una mutación de tolerancia a mutaciones letales de forma. Utilizando los ensayos detallados en Materiales y Métodos, se midió la tolerancia a la mutación letal *mre-9* y la resistencia a

mecilinam de derivados *rpoS::Amp-R* de la cepa salvaje LT2 y de la cepa DA1138. Ambas cepas mostraron una CIM de mecilinam de 0,63 µg/ml a 37°C, debido, seguramente, a la β-lactamasa codificada por la inserción. Por otra parte, ninguna de las dos cepas mostró capacidad para recibir la mutación *mre-9* a 37°C (la frecuencia de contransducción entre *argR372::Tn10* y *mre-9* para LT2 *rpoS::Amp-R* fue ≤ 0,2% y para DA1138 *rpoS::Amp-R* fue ≤ 0,25%), lo que demuestra que la mutación *rpoS::Amp-R* no confiere tolerancia a mutaciones letales de forma.

Estos resultados demuestran que el efecto de las mutaciones letales de forma sobre la viabilidad celular, en ausencia de tolerancia, puede ser anulado por la falta del factor sigma específico de fase estacionaria, aún en fase logarítmica.

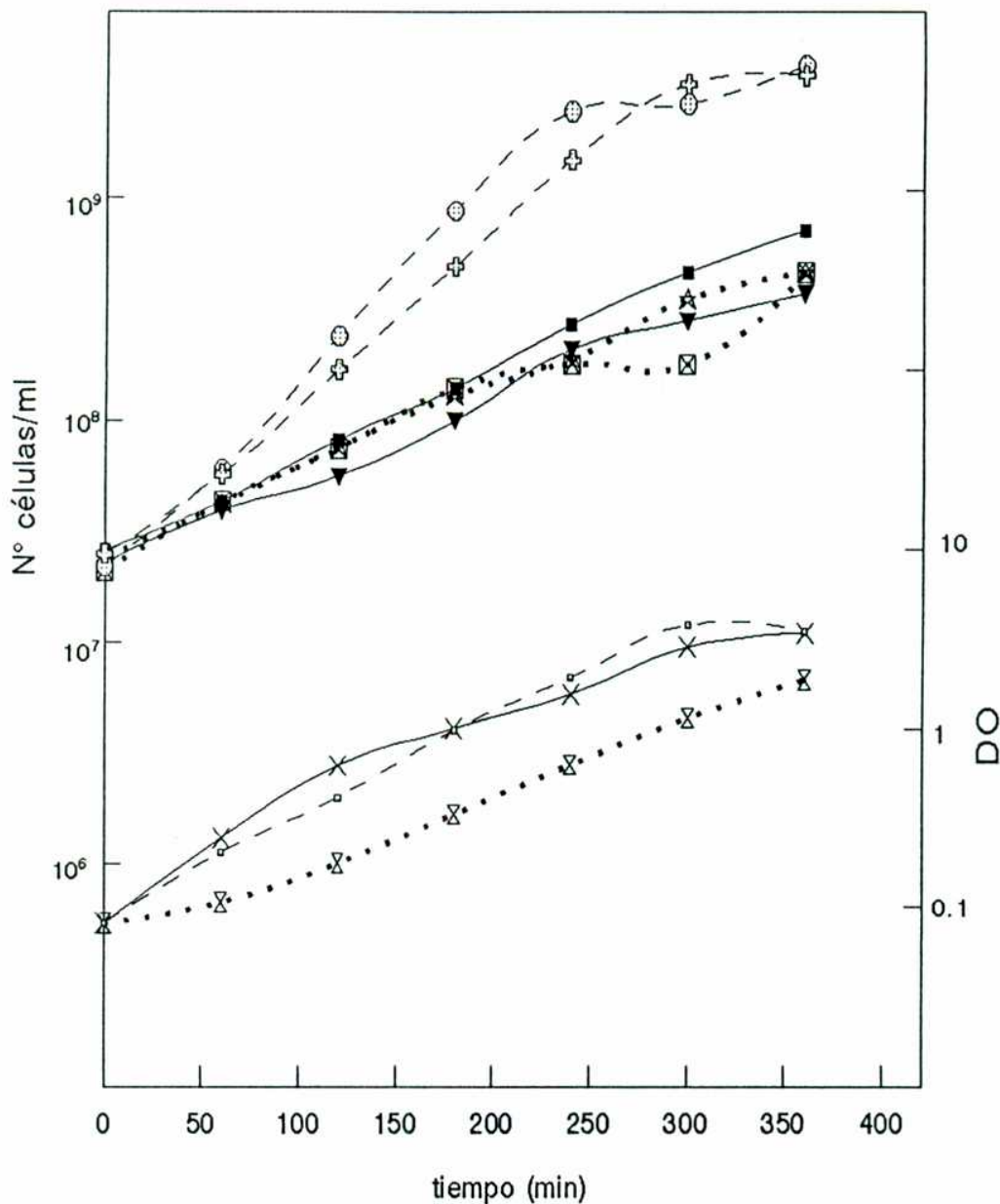
Figura 23. Cinética de la cepa DA1138 *rodA22* *rpoS::Amp-R* hasta fase estacionaria



Referencias:
-□- DO 41°C + Total 41°C ○ Viable 41°C
× DO 30°C ■ Total 30°C ▼ Viable 30°C

Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C. Este fue diluído hasta DO=0,050 y dividido en dos partes (tiempo 0): una se incubó a 30°C y la otra a 41°C. Se tomaron muestras de ambos cultivos para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

Figura 24. Efecto del acetato en el crecimiento de la cepa DA1138 *rodA22 rpoS::Amp-R*



Referencias:

- | | | |
|----------------|-------------------|--------------------|
| — DO 41°C | ⊕ Total 41°C | ⊙ Viable 41°C |
| × DO 30°C | ■ Total 30°C | ▼ Viable 30°C |
| ⊗ DO 30°C+AcNa | ★ Total 30°C+AcNa | ⊠ Viable 30°C+AcNa |

Se partió de un cultivo logarítmico a 41°C, que fue diluido hasta DO=0,100 y dividido en 3 subcultivos (tiempo 0), que se incubaron en las siguientes condiciones: 30°C, 30°C+AcNa 100mM y 41°C. Se tomaron muestras para medir: densidad óptica (DO), N° total de células (Total) y N° de células formadoras de colonias (Viable).

Discusión y Conclusiones

I. Discusión

1. Mutaciones de forma celular obtenidas por transposición

Los estudios del control genético de la forma celular en enterobacterias se han llevado a cabo básicamente empleando mutantes esféricos seleccionados por resistencia al antibiótico β -lactámico mecilinam. En este trabajo, se ha descrito el aislamiento de 33 mutantes de forma celular obtenidos por inserción del transposón Tn10 Δ 16 Δ 17, evitando así el uso de mecilinam como agente selectivo.

Confirmando informaciones previas acerca de la letalidad de ciertas mutaciones de forma celular en cepas salvajes y de la necesidad de mutaciones de resistencia a mecilinam para suprimir ese efecto (Antón, 1987; Ogura y col., 1989), la obtención de los mutantes en genes de forma sólo fue posible cuando se utilizaron como receptoras cepas resistentes a dicho antibiótico.

Aunque se conocen cuatro tipos de mutantes esféricos en *S. typhimurium*, sólo se encontraron tres de ellos entre las inserciones obtenidas, y a muy diferentes frecuencias. Mientras el 75% de las inserciones afectaron al gen *rodA*, y casi 25% ocurrieron en la región *mre*, los mutantes *divD* aparecieron raramente y no se obtuvieron inserciones en *pbpA*.

El mutante *divD* encontrado aquí es el primero que aparece en una cepa que muestra control normal del operon histidina, pues los tres mutantes *divD* conocidos hasta ahora, todos ellos de *S. typhimurium*, se aislaron en cepas desreprimidas para el operon histidina y en condiciones en las que la inhibición de la división celular causada por la elevada síntesis de las enzimas HisF e HisH (Murray y Hartman, 1972) llevaba a la formación de filamentos (Wyche y col., 1974; Antón, 1979; Antón y col., 1983). Se ha demostrado que los mutantes *divD* no son seleccionados positivamente por mecilinam (Antón y col., 1983), lo que explicaría la ausencia de este tipo de mutantes en *E. coli* ya que la gran mayoría

de los mutantes de forma conocidos en esta especie han sido aislados por su resistencia a ese antibiótico. Puede, por lo tanto, suponerse, que el procedimiento utilizado en este trabajo posibilitaría el aislamiento de cepas *divD* en *E. coli*.

La ausencia de inserciones *pbpA* es inesperada, ya que este tipo de mutantes aparece frecuentemente cuando se emplean otros procedimientos. Como su falta no puede atribuirse a fallas en la detección, dado que las cepas *pbpA* poseen el típico aspecto de colonia brillante utilizado para identificar inserciones en genes de forma, al menos dos posibilidades podrían explicar la carencia de inserciones *pbpA*: que la anulación total de la función de PBP 2 no sea compensable por mutaciones de resistencia a mecilinam o que en ese gen no haya sitios que permitan la inserción de Tn10.

Ogura y col. (1989) han construido en *E. coli* una mutación *pbpA* por reemplazo *in vitro* de un fragmento interno del gen por un cassette que otorga resistencia a kanamicina y esa mutación resultó ser letal en cepas salvajes, pero fue tolerada por cepas *cya* y *lov*, ambas resistentes a mecilinam (Aono y col., 1979; Bouloc y col., 1988). Por lo tanto, la inactivación completa de la proteína PBP 2 puede ser perfectamente compensada por mutaciones que otorgan resistencia a mecilinam.

La causa más probable de la no obtención de mutaciones *pbpA::Tn10* parece ser la falta de sitios apropiados para la inserción de Tn10 en el gen *pbpA*. Las secuencias publicadas de los genes *pbpA* (Asoh y col., 1986), *mreB* (Doi y col., 1988) y *rodA* (Matsuzawa y col., 1989) no contienen la secuencia descrita por Halling y Kleckner (1982) como preferencial para la inserción de Tn10. Sin embargo, dado que pese a ello Tn10 logra insertarse en *rodA* y *mre*, la ausencia de mutantes *pbpA::Tn10* sugiere que este gen carece además de sitios alternativos para la inserción del transposón.

En este estudio se encontró una llamativa diferencia entre especies tan relacionadas como *E. coli* y *S. typhimurium*. Mientras que las mutaciones *cya* y *crp*

de *E. coli* confieren elevada resistencia a mecilinam (Aono y col., 1979) y representan los tipos más frecuentes de mutantes aislados por resistencia al antibiótico (Jaffé y col., 1983), las mutaciones *cya* y *crp* de *S. typhimurium* no confieren resistencia a mecilinam. Recientemente, Antón (1995) ha encontrado que las mutaciones *cya* o *crp* de *S. typhimurium* sí presentan resistencia a mecilinam cuando están acompañadas de mutaciones que afectan al lipopolisacárido (*galE*, *rfa*, *rfb*, *rfc*) o la degradación de ppGpp (*spoT*). El aislamiento de mutantes resistentes a mecilinam en *E. coli* se ha realizado utilizando la cepa K-12, que presenta naturalmente un lipopolisacárido incompleto (Liu y Reeves, 1994). Se ha propuesto, entonces, en el trabajo mencionado, que la elevada resistencia a mecilinam de cepas *cya* o *crp* de *E. coli* K-12 se debe a un efecto cooperativo entre esas mutaciones y la que altera al lipopolisacárido, mientras que la sensibilidad de cepas *cya/crp* de *S. typhimurium* se debería a la presencia de un lipopolisacárido completo (Antón, 1995). Debe destacarse que los mutantes *cya* y *crp* de *S. typhimurium* muestran tolerancia a mutaciones letales de forma, lo que indica que a pesar de su aparente sensibilidad a mecilinam comparten esa propiedad con los correspondientes derivados de *E. coli* K-12.

En este trabajo se han confirmado observaciones previas sobre la letalidad de las mutaciones *mre* en cepas salvajes (Antón, 1987) y se demuestra por primera vez que las mutaciones de inserción en el gen *rodA* manifiestan el mismo comportamiento. La letalidad de las mutaciones *rodA* no había sido advertida hasta ahora, probablemente, porque al igual que con el gen *pbpA* (Ogura y col., 1989), sólo aquellas mutaciones que producen total inactivación del producto génico provocan inviabilidad celular. Contrariamente a las mutaciones *mre* y *rodA* obtenidas en este trabajo, y la obtenida por Ogura y col. (1989) en el gen *pbpA*, la única inserción *divD* no parece afectar la viabilidad de cepas salvajes.

Las evidencias indican que en las células salvajes los productos de los genes *mre*, *rodA* y *pbpA* cumplen funciones esenciales que pueden ser compensadas por mutaciones de resistencia a mecilinam.

A pesar de que la resistencia a mecilinam compensa la falta de los productos Mre, RodA y PBP 2, no normaliza la forma celular de los correspondientes mutantes, lo que indica que el papel de esos genes en la determinación de la forma bacteriana puede separarse de las funciones esenciales que cumplen. Por el contrario, el gen *divD* actuaría sólo o principalmente en el mantenimiento de la forma bacilar, ya que las inserciones en *divD* no causan letalidad.

2. Naturaleza de la mutación condicional de resistencia a mecilinam y tolerancia a mutaciones de forma de la cepa DA1138

Los resultados genéticos y bioquímicos presentados demuestran que la mutación condicional de la cepa DA1138 afecta al gen *alaS*, que codifica la alanil-tARN sintetasa. Las aminoacil-tARN sintetetas son enzimas esenciales para el crecimiento bacteriano ya que son responsables de la carga de cada aminoácido a su tARN correspondiente; por esta razón la mayoría de las cepas portadoras de mutaciones en estas enzimas son mutantes condicionales de crecimiento. A pesar de los bajísimos niveles de alanil-tRNA sintetasa mostrados en ensayos *in vitro* por la cepa DA1138 a 30°C y a 41°C, la cepa crece normalmente a las dos temperaturas, lo que indica que, *in vivo*, aún a 41°C, la mutación *alaS206* permite suficiente actividad enzimática como para mantener el crecimiento. Es sin embargo evidente que la mutación, sumada a la termolabilidad propia de la enzima verificada con la cepa salvaje LT2, son responsables de que al elevar la temperatura de 30°C a 41°C la cepa exprese un fenotipo alterado (resistencia a mecilinam, tamaño de colonia pequeño). Vinella y col. (1992) han aislado en *E. coli* K-12, por resistencia a mecilinam, cepas portadoras de mutaciones en los

genes que codifican la arginil-tARN sintetasa (*lov-1*) y alanil-tARN sintetasa (*lovB*) y observaron que ambas cepas muestran, además, tolerancia a una delección del gen *pbpA* que resulta letal en el tipo salvaje. Los mismos autores demostraron que cepas portadoras de mutaciones en genes de otras sintetasa (*glnS*, *pheS*, *leuS*, *thrS*), que no habían sido aisladas por resistencia a mecilinam, también mostraban resistencia a este antibiótico.

La carga defectiva de un aminoácido a su tARN por mutación de la aminoacil-tARN sintetasa correspondiente, resulta en la activación de la respuesta estricta al actuar como una señal que eleva el nivel celular de sus efectores, los nucleótidos ppGpp y pppGpp. Este aumento de nivel se produce tanto por incremento de la síntesis, debida principalmente a la actividad de la ppGpp sintetasa I, codificada por el gen *relA*, como a una disminución en la degradación, que depende del producto del gen *spoT*. La acción de (p)ppGpp como efector negativo de la ARN polimerasa inhibe la síntesis de rARN y tARN y lleva a la detención del crecimiento, habiéndose demostrado que hay una relación inversa entre la concentración de ppGpp y la tasa de crecimiento celular (Cashel y Rudd, 1987).

Vinella y col. (1992) han demostrado que la acumulación de ppGpp producida por inducción de la respuesta estricta o por expresión de un plásmido *relA*, causa resistencia a mecilinam, y estudios muy recientes sugieren que la resistencia aparece cuando el nivel de ppGpp en la célula sobrepasa un umbral mínimo de 140 pmoles/ A_{600} (Joseleau-Petit y col., 1994), que corresponde aproximadamente a la duplicación del nivel basal de ppGpp en medio mínimo. La eliminación de la resistencia a mecilinam en una derivada *relA* de DA1138 indica que la resistencia de esta cepa también es causada por la acumulación de ppGpp. El aumento de temperatura de 30°C a 41°C eleva el nivel de ppGpp tanto en la cepa DA1138 (2,5 veces) como en la cepa salvaje LT2 (1,4 veces). Sin embargo sólo se observa

resistencia a mecilinam en la cepa DA1138 a 41°C, condición que coincide con el mayor nivel de ppGpp. Puede suponerse entonces que sólo en esta situación el nivel de ppGpp alcanza el umbral mínimo que resulta en resistencia a mecilinam.

No hay indicios aún acerca de cual es el mecanismo que relaciona a ppGpp con la resistencia a mecilinam. Ese efector tiene múltiples actividades regulatorias y es capaz de actuar como activador en transcripción, entre otros, de los operones histidina (Stephens y col., 1975), arginina (Zidwick y col., 1984) y glutamina (Sales y col., 1982), y del gen *rpoS* (Gentry y col., 1993), que codifica el factor σ^s de fase estacionaria. Además, actúa como inhibidor en la transcripción de rARN y tARN, controlando así la tasa de crecimiento (Cashel y Rudd, 1987; Tedin y Bremer, 1992).

El efecto de ppGpp no parece ejercerse a través de los mecanismos más comunes de resistencia a antibióticos (alteración de la permeabilidad, destrucción del antibiótico o modificación del blanco) ya que, tanto a 30°C como a 41°C, las células de la cepa DA1138 adquieren forma esférica en presencia de mecilinam, lo que demuestra que el antibiótico es capaz de alcanzar su blanco. La PBP 2, e inactivarla, al menos, en cuanto a su función en el control de la forma celular.

La abundante información existente acerca del papel de ppGpp como regulador transcripcional en numerosos sistemas sugiere que también en este caso podría actuar como efector, positivo o negativo, de alguno/s genes relacionados con el proceso de división celular, ya sea habilitando caminos alternativos o modulando la expresión del mecanismo habitual (Vinella y col., 1993), o quizás interfiriendo con alguno de los pasos que resultan en letalidad por inactivación de PBP 2.

3. Efecto de mutaciones de forma durante la fase exponencial en condiciones de no-tolerancia

El comportamiento mostrado en cinéticas de crecimiento por derivados esféricos de la cepa DA1138 permite diferenciar dos tipos: el de los mutantes *mre-17::Tn10Δ16Δ17* y *rodA22::Tn10Δ16Δ17*, que son seriamente afectados por la falta de tolerancia, y el del derivado *divD135::Tn10Δ16Δ17*, que se comporta en forma similar al control bacilar DA1138, sin requerir tolerancia para su desarrollo.

Los efectos de la falta de los productos RodA y Mre son muy similares y se ponen en evidencia rápidamente al pasar de la condición permisiva (41°C) a la restrictiva (30°C). La coincidencia entre estos resultados y las pruebas de tolerancia por transducción presentadas en la Figura 4 sugiere que las alteraciones mostradas por las cepas portadoras de las mutaciones *rodA22* y *mre-17* en las cinéticas de crecimiento a 30°C pueden ser las causantes de la ausencia de transductantes observada con receptoras no tolerantes.

Dos son las funciones que manifiestan las alteraciones más graves: la división celular, cuya velocidad se reduce drásticamente, aunque sin detenerse totalmente, y la capacidad de formar colonias (a 41°C, la temperatura permisiva) que tras el pasaje a 30°C no solo no aumenta sino que hasta muestra una transitoria disminución en algunos experimentos. Por ello, durante la fase exponencial a 30°C, la relación entre el número total de células y el número de células formadoras de colonias se incrementa en forma constante ya que una parte creciente de la población parece ser incapaz de producir colonias en medio sólido. Aunque las células son incapaces de formar colonias, y por lo tanto, según el criterio de "viabilidad" corrientemente empleado, son "no viables", la tinción con naranja de acridina, usada como indicador instantáneo de viabilidad celular (Strugger, 1948; Korgaonkar y Ranade, 1966), y las mediciones de consumo de oxígeno, indican que las bacterias se mantienen vivas y respirando normalmente.

Asimismo, estudios preliminares de incorporación de precursores marcados en ADN, ARN y proteína realizados con los derivados *rodA22* y *mre-17* muestran que el cambio de temperatura no detiene la síntesis de esas macromoléculas (datos no mostrados).

La información obtenida indica que el pasaje a 30°C desencadena un proceso que no parece afectar funciones esenciales, tales como la respiración o el mantenimiento de la masa ribosomal, pero que impide la formación de colonias por parte de la población. No se sabe si la fracción de la población incapaz de dar colonias corresponde a las nuevas células formadas en condiciones no permisivas o también las células preexistentes son afectadas por el fenómeno. El proceso se establece muy rápidamente luego del cambio de temperatura, y sus efectos son permanentes pues aún con incubaciones cortas en líquido a 30°C, el posterior retorno a la temperatura permisiva (41°C), durante la incubación en medio sólido, no revierte la alteración. Aunque podría suponerse que la no formación de colonias está relacionada con la inhibición de la división celular mostrada por las células a 30°C, el hecho de que es posible anular o atenuar considerablemente los efectos sobre la viabilidad sin que por ello se restaure la división celular (ver próxima sección), indican que no hay relación directa entre las dos alteraciones.

Existe amplia información acerca células en situaciones especiales de estrés que pueden metabolizar nutrientes normalmente y son consideradas viables por métodos que no requieren crecimiento, pero que no son capaces de formar colonias en medio sólido en las condiciones habituales de plaqueo (Roszak y Colwell, 1987; Oliver, 1993; Siegele y col., 1993). Se están realizando exhaustivos estudios para determinar el origen de este comportamiento que crea graves problemas de índole sanitaria y ecológica, ya que la cuantificación rutinaria, mediante la formación de colonias, de microorganismos que se encuentran en esa

situación subestima el número real de células vivas en un determinado ambiente. Este fenómeno, denominado VBNC (por "viable but non culturable"), ha sido observado en *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas putida*, y otras especies (Oliver, 1993), y es especialmente importante en los casos de bacterias coliformes indicadoras de contaminación y en microorganismos patógenos. Si bien es posible que en diferentes microorganismos y condiciones el estado VBNC tenga diferentes causas, es probable que en el caso de las mutaciones letales de forma esa condición sea inherente al defecto morfológico y que la tolerancia mediada por ppGpp atenúe sólo parcialmente esa alteración. Esta apreciación se sustenta en el hecho de que también en los cultivos logarítmicos crecidos a 41°C el número de células formadoras de colonias es generalmente menor que el del total de células contadas.

No se conocen las causas de la inhibición de la división celular mostradas por los mutantes *rodA* y *mre* a 30°C. La baja tasa de división que se mantiene en esas circunstancias parece deberse a un alargamiento uniforme del tiempo de duplicación más bien que a la división de solamente una parte de la población. Por otra parte, tanto a 41°C como a 30°C, las proteínas RodA o Mre están ausentes en los correspondientes mutantes, y, pese a ello, la división se completa en ambas condiciones, si bien a velocidades muy diferentes. Este hecho sugiere que esas proteínas tienen una función indirecta en ese proceso.

El comportamiento de los derivados *rodA* y *mre* de la cepa DA1138, que a 30°C presentan las anomalías detalladas, se normaliza notablemente a 41°C. Las evidencias presentadas en la sección II de Resultados demuestran que la tolerancia a mutaciones letales de forma manifestada por la cepa DA1138 a 41°C está determinada por el aumento en el nivel de ppGpp que se produce, a esa temperatura, por inactivación parcial de la alanil-tARN sintetasa.

Empleando una cepa de *E. coli* K-12 portadora de una mutación en el gen de la leucil-tARN sintetasa (*leuS*) que produce crecimiento dependiente de la temperatura, Vinella y col. (1993) han demostrado que esa cepa también presenta, en forma condicional, resistencia a mecilinam y tolerancia a una delección que afecta a los genes *rodA* y *pbpA*. Aunque a 37°C la cepa tolera la presencia de la mutación $\Delta(\textit{pbpA-rodA})$, a 30°C se presentan fenómenos similares a los descritos en este trabajo: inhibición de la división celular, caída de la viabilidad y aumento del volumen celular. La tolerancia (y resistencia a mecilinam) de la cepa a 37°C es causada por la elevación del nivel de ppGpp que produce, a esa temperatura, la inactivación parcial de la leucil-tARN sintetasa. Teniendo en cuenta los resultados de Joseleau-Petit y col. (1994) que indican que se requiere un umbral mínimo de ppGpp para que aparezca resistencia a mecilinam, es evidente que a 41°C en la cepa *alaS* y a 37°C en la cepa *leuS* de *E. coli*, la inactivación de las correspondientes sintetetas permite que se supere el nivel de ppGpp necesario para que se manifieste la resistencia a mecilinam y la tolerancia a las mutaciones de forma.

Los resultados expuestos, conjuntamente con los de Vinella y col. (1993), indican que PBP 2, RodA y Mre están de alguna manera involucradas en el proceso de división celular y sugieren que es allí donde desempeñan su papel vital. Los efectos producidos por la falta de estos productos son muy similares, por lo cual no es posible asignar un rol específico a cada uno de ellos. Dado que RodA actúa como activadora de la actividad transglicosilasa de PBP 2 durante la elongación de la pared celular, podría suponerse que ambos productos también trabajan conjuntamente en la función esencial que desempeñan en una bacteria salvaje.

El hecho de que la falta de RodA, PBP 2 o Mre pueda ser compensado por el efector de la respuesta estricta ppGpp indica que su papel en la división celular

es suplido por algún mecanismo aún desconocido. Sin embargo, esta compensación no es 100% eficiente ya que la cepa *divD*, en la que sólo está alterada la forma celular, presenta en condiciones de tolerancia (41°C) mayor velocidad de crecimiento que los mutantes *rodA* y *mre*.

Dada la capacidad de ppGpp para actuar como activador o inhibidor transcripcional en varios operones (Stephens y col., 1975; Sales y Brenchley, 1982; Zidwick y col., 1984; Cashel y Rudd, 1987), este compuesto podría actuar habilitando caminos alternativos de división celular, ya sea por la inducción de un gen o genes capaces de reemplazar en función a los faltantes, o por inhibición de la síntesis de productos que en ausencia de PBP 2, RodA o Mre puedan actuar bloqueando la división. Se ha demostrado que la superproducción de la proteína de división FtsZ es capaz de conferir resistencia a mecilinam y tolerancia a una mutación $\Delta(pbpA-rodA)$, si bien no se estudió el efecto de esa proteína sobre la división y viabilidad celular en condiciones de no-tolerancia (Vinella y col., 1993). La proteína FtsZ está homogéneamente distribuida en el citoplasma, pero en el momento de la división celular se condensa y forma un anillo en el centro de la célula que resulta esencial para el proceso de septación. Como la expresión de los genes del operon *ftsQAZ* está muy finamente regulada, de manera de asegurar una relación constante entre esas proteínas y un determinado nivel independiente del tamaño celular, Vinella y col. (1994) han propuesto que dado que las células esféricas poseen volúmenes superiores a los de bacilos creciendo a la misma velocidad, la cantidad de moléculas FtsZ producidas en ausencia de tolerancia no alcanzaría para completar el anillo y dificultaría la división. La concentración de ppGpp varía en igual forma que la expresión de FtsZ con respecto a la tasa de crecimiento; por ello, esos autores suponen que ppGpp podría actuar como inductor de *ftsZ*, aumentando así el nivel de dicha proteína y

permitiendo la división. Sin embargo, la relación entre *ppGpp* y *ftsZ* no se ha comprobado.

La hipótesis anterior sugiere que los genes de forma no actúan directamente en el proceso de división y que la alteración en el crecimiento ocasionada por inactivación de los mismos se debe simplemente a un problema de tamaño celular, ocurrido por el desbalance entre los procesos de elongación y septación. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que la falta de división sea la causa y no el efecto del aumento de volumen en células esféricas en condiciones de no-tolerancia. De hecho, en los experimentos con acetato que se discutirán en la próxima sección, una importante reducción en el tamaño celular causada por ese compuesto no fue efectiva para normalizar la división celular, lo que no apoya la hipótesis de Vinella y colaboradores.

La tolerancia mediada por *ppGpp* parece no ser el único camino que compensa la falta de las proteínas de forma ya que también las mutaciones que afectan el complejo AMP cíclico/CRP (Ogura y col., 1989; Costa y Antón, 1992) y las mutaciones *cysB* o *cysE* (Oppezzo y Antón, 1995), que alteran el control del regulón cisteína, confieren tolerancia. No se sabe aún si en todos esos casos actúan diferentes mecanismos que permiten neutralizar el desbalance creado en la división celular por la ausencia de las proteínas de forma o todos son elementos de un complejo proceso que conduce a ese resultado.

4. Restauración de la viabilidad en mutantes de forma celular

La viabilidad celular, medida por la capacidad de formación de colonias, es una de las funciones más seriamente afectadas por la expresión de mutaciones letales de forma en ausencia de tolerancia. Sin embargo, esta alteración, cuya naturaleza todavía se desconoce, se manifiesta únicamente durante la fase logarítmica ya que la entrada del cultivo en la fase estacionaria no afecta la

división celular; pero va acompañada por un veloz incremento de la viabilidad. La coincidencia existente entre la detención en el aumento de la masa bacteriana y la recuperación de la capacidad de formación de colonias planteó la posibilidad de que se tratara de un fenómeno de fase estacionaria (Kolter y col., 1993), y como tal, dependiente de la síntesis del factor σ^S , regulador global propio de los genes que se expresan en esa etapa del crecimiento bacteriano (Lange y Hengge-Aronis, 1991; Fang y col., 1992).

El efecto positivo de la presencia de acetato o benzoato sobre la viabilidad celular durante el crecimiento en fase logarítmica a 30°C de la mutante *rodA22* dio fuerte apoyo a esta hipótesis dada la demostrada capacidad de estos compuestos para inducir la expresión del gen *rpoS*, codificador del factor de transcripción σ^S . Por otra parte, si bien el aumento de la viabilidad fue el efecto más evidente de la presencia de acetato y benzoato, también se observó una cierta mejoría en la tasa de división celular, y, en el caso de acetato, una drástica disminución en la masa bacteriana a 30°C acompañada por una notable reducción del volumen celular.

El estudio del efecto de mutaciones *rpoS* sobre la viabilidad celular de la cepa *rodA22* a 30°C demostró que el comportamiento depende de la naturaleza de la mutación *rpoS* utilizada. En el caso de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062*, obtenidas en este laboratorio, la primera a partir de un cultivo envejecido y la segunda aislada de un cultivo permanente de varios años de antigüedad, corresponderían al tipo de mutaciones que otorgan ventaja adaptativa en fase estacionaria, de acuerdo a las conclusiones de Zambrano y col. (1993). Si bien esta interpretación parece contradecir la teoría de que las funciones controladas por σ^S proporcionan a la célula el estado de resistencia a variados agente físicos y químicos que caracterizan a la fase estacionaria, Kolter y col. (1993) han propuesto una explicación de la selección positiva de esos mutantes en variadas

condiciones de estrés. De acuerdo a esa hipótesis, la ventaja de esas cepas radicaría en una mejor aptitud para el crecimiento en situaciones de falta de nutrientes en relación con las células salvajes, ya que éstas, al inducir plenamente el regulón de funciones de fase estacionaria controlado por σ^S , resistirían mejor numerosas agresiones pero serían menos capaces de dividirse y crecer en esas condiciones. Como las mutaciones que inactivan totalmente el producto del gen *rpoS* no resultan en ese fenotipo, se ha especulado que esas características requerirían un cierto nivel de expresión del regulón (Kolter y col., 1993).

Las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062*, que no han sido aún caracterizadas molecularmente, no modifican sustancialmente el comportamiento de la cepa *rodA22* en ausencia de tolerancia, pues tanto la recuperación de la viabilidad en fase estacionaria como la restauración por acetato se mantienen. A pesar de que estos resultados indicarían que el gen *rpoS* no está involucrado en esos fenómenos, el contrastante comportamiento del alelo *rpoS::Amp-R* sugiere que las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062* mantienen un cierto nivel de expresión de *rpoS* que permite el comportamiento aparentemente normal de las cepas en ese aspecto, a pesar de ser claramente mutantes en otras características dependientes de σ^S .

La introducción en la cepa *rodA22* de la mutación *rpoS::Amp-R*, que inactiva totalmente el producto del gen, produjo cambios que no se ajustan totalmente a la hipótesis formulada en el comienzo, pero que asignan a σ^S un importante papel en los fenómenos desencadenados por la falta de tolerancia en células esféricas. De acuerdo a aquella hipótesis, si *rpoS* fuese el responsable de la recuperación de viabilidad en fase estacionaria al inducirse naturalmente y de la restauración en fase exponencial al ser inducido por acetato, debería esperarse que en la cepa *rpoS::Amp-R* no ocurriera ninguno de los dos fenómenos.

En contra de lo esperado, la falta del factor σ^s anuló totalmente el efecto negativo de la mutación *rodA22* sobre la viabilidad celular, ya que el 100% de las células provenientes del cultivo de 30°C mostró capacidad para formar colonia. Sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la división se mantuvo, a pesar de una cierta mejoría parcial observada en ese parámetro en la cepa *rpoS::Amp-R* respecto de la cepa *rpoS⁺*, tanto a 30°C como a 41°C. Por otra parte, el acetato no afectó las tasas de división y viabilidad celular en el derivado *rpoS::Amp-R* a 30°C, aunque se mantuvo la reducción de la masa celular con disminución del tamaño bacteriano.

Tanto el incremento de la viabilidad celular en fase estacionaria como el efecto de acetato o benzoato sugieren que la recuperación de la capacidad de formación de colonias inhibida por el pasaje de la condición permisiva (41°C) a la restrictiva (30°C) requiere un nivel elevado de σ^s . A primera vista parece contradictorio, entonces, que la ausencia total de σ^s sea capaz de producir el mismo efecto.

En base a los resultados obtenidos y los datos de la literatura acerca de la expresión de promotores dependientes de *rpoS*, podría plantearse una nueva hipótesis. De acuerdo a este modelo, existiría un gen codificador de una sustancia inhibidora de la viabilidad celular que estaría regulado por el factor σ^s . El promotor de este gen tendría alta especificidad para σ^s de tal manera que se transcribiría aún en fase logarítmica, cuando el nivel de σ^s es muy bajo. Por este motivo habría efecto inhibitorio sobre la viabilidad aún fase exponencial, y también en presencia de las mutaciones *rpoS1061* y *rpoS1062* que, al menos en teoría, mantienen un bajo nivel de expresión de *rpoS*. En fase estacionaria, cuando se produce la inducción del gen *rpoS* y aumenta el nivel de σ^s , o en fase logarítmica cuando la presencia de ácidos débiles desencadena el mismo fenómeno, se activaría la expresión de otro gen, también dependiente de σ^s , pero con un promotor débil que sólo en presencia de un alto nivel de σ^s sería capaz de expresarse. Este segundo

gen codificaría un producto que neutralizaría el efecto del inhibidor, con la consiguiente recuperación de la viabilidad.

Entre los resultados experimentales que quedarían explicados por este modelo se cuenta el dispar comportamiento, en fase logarítmica, de las cepas *rodA22 rpoS*⁺ y su derivado *rpoS::Amp-R*, que demuestra que también en dicha fase hay actividad de σ^s pues la única diferencia entre las dos cepas es la falta de ese factor en la segunda. Asimismo, el mantenimiento de la viabilidad celular en el derivado *rpoS::Amp-R* estaría justificado por la ausencia de σ^s que impediría la síntesis del inhibidor.

El modelo presentado está avalado por evidencias recientes que demuestran la existencia de un bajo nivel de σ^s en células en activo crecimiento, y sugieren la posible expresión de genes dependientes de *rpoS* en fase exponencial (Tanaka y col., 1993). Es, además, bien conocida la inexistencia de una secuencia consenso específica en los promotores regulados por *rpoS*, y este hecho a llevado a suponer la ocurrencia de mecanismos que regulan la transcripción por una u otra de las holoenzimas σ^s y σ^{70} , y aún la posibilidad de regulación cruzada involucrando a ambos factores de transcripción (Hengge-Aronis, 1993).

En este trabajo se han encontrado tres condiciones que restauran la viabilidad celular inhibida por la ausencia del producto RodA: a) la llegada a fase estacionaria, b) la presencia de ácidos débiles tales como acetato y benzoato (posibles inductores del gen *rpoS*), y, c) la falta de σ^s . La similitud del comportamiento de mutantes letales *rodA*, *pbpA* y *mre* en fase logarítmica hace suponer que esas condiciones afectan de igual manera a todos ellos.

La restauración de la viabilidad celular en ausencia del factor σ^s no constituye un fenómeno de tolerancia a mutaciones letales de forma, ya que la cepa portadora de una mutación nula *rpoS* no presenta resistencia a mecilinam ni tolerancia a mutaciones de forma (medida como aceptación, en transducción, de

la mutación letal *mre-9*). En ninguno de los tres casos mencionados la división celular alterada por la mutación *rodA22* se recuperó totalmente, como ocurre al elevar el nivel de ppGpp, indicando que el fenómeno de tolerancia está relacionado con la normalización de la división celular y que la restauración de la capacidad de formación de colonias, por sí sola, es incapaz de anular la letalidad de las mutaciones de forma. El incremento parcial observado en el número total de células al cultivar la cepa *rpoS*^{*} con acetato o benzoato y en el derivado *rpoS::Amp-R* podría ser un efecto secundario de la restitución de viabilidad que mejorara la integridad celular. De esta manera, el aumento en el número total de células provendría simplemente de contar un mayor número de bacterias y no de un aumento real de la velocidad de división celular.

Gentry y col. (1993) han demostrado que ppGpp es capaz de activar la síntesis de σ^S , lo que podría indicar que la restauración del crecimiento a través de ppGpp ocurre vía *rpoS*. Al elevar el nivel de ppGpp en la cepa DA1138 *rodA22* (por crecimiento a 41°C) el crecimiento se normaliza totalmente, no siendo así en presencia de acetato, o al llegar a fase estacionaria a 30°C, ya que se sigue observando un efecto negativo sobre la división celular aún con un teóricamente alto nivel de σ^S . Ese hecho, junto con la observación de que la falta de σ^S en el derivado *rodA22 rpoS::Amp-R* no impide que a 41°C la cepa se divida normalmente, indica que el efecto positivo de ppGpp sobre la división celular no ocurre a través de *rpoS*.

Además de la tolerancia mediada por ppGpp, la superproducción de la proteína de división celular FtsZ (Vinella y col., 1993), la mutación de los genes reguladores del sistema de biosíntesis de cisteína *cysB* y *cysE*, y la inactivación del complejo AMP cíclico/CRP, permiten la supervivencia de bacterias portadoras de mutaciones letales de forma. La disparidad de las funciones que confieren tolerancia (y resistencia a mecilinam) y la presencia entre ellas de diferentes

sistemas globales de regulación da una idea de la complejidad del fenómeno en estudio y hace suponer que a medida que se despejen las incógnitas surgidas, entre ellas, el efecto sobre viabilidad y su relación con σ^s , se aclararán aspectos de las relaciones entre forma, viabilidad y división celular.

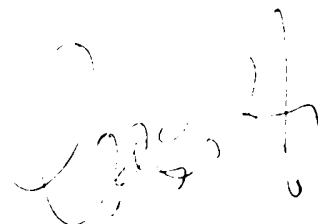
II. Conclusiones

- El propósito del trabajo consistió en el estudio de la expresión de mutaciones que inactivan totalmente a los genes involucrados en el mantenimiento de la forma bacilar, en *S. typhimurium*, en condiciones de falta de tolerancia a los mismos.
- Se obtuvieron mutaciones en los genes de forma *rodA*, *mre* y *divD* por inserción del transposón de Tn10 Δ 16 Δ 17, no así en el gen *pbpA*, probablemente por carecer éste de secuencias apropiadas para la inserción de Tn10.
- Las mutaciones *rodA* y *mre* (no así *divD*) no son toleradas por bacterias salvajes, pero son aceptadas por cepas resistentes al antibiótico mecilnam (Mec-R), y por mutantes *cya* o *crp*. Esto indica que si bien los productos RodA, Mre y DivD están relacionados con el control de la forma bacteriana, los genes *rodA* y *mre* desempeñan además alguna función esencial cuya falta está compensada en cepas Mec-R, *cya* o *crp*.
- Se demostró que una mutación que produce resistencia a mecilnam y tolerancia a mutaciones letales de forma condicionadas por la temperatura afecta al gen de la alanil-tARN sintetasa. Ambas características dependen de un incremento en el nivel del efector ppGpp por expresión de dicha mutación.
- La expresión de las mutaciones letales *rodA22::Tn10 Δ 16 Δ 17* y *mre-17::Tn10 Δ 16 Δ 17* en condiciones de no-tolerancia produce inhibición de la

división celular y de la capacidad de formación de colonias, si bien las células mantienen signos vitales tales como la masa ribosomal y respiración. Este defecto en el crecimiento se elimina al elevar el nivel de ppGpp, que podría actuar induciendo algún sistema relacionado con la división celular, proceso en el cual los genes *rodA* y *mre* parecen desempeñar su función vital. La mutación *divD* no afecta el crecimiento bacteriano en condiciones de no tolerancia.

- La inhibición de la capacidad de formación de colonias observada en condiciones de no-tolerancia se revierte en tres casos: a) en fase estacionaria, etapa caracterizada por la inducción del gen *rpoS*, que codifica el factor σ^s , b) en fase logarítmica, en presencia de acetato o benzoato, posibles inductores del gen *rpoS*, y, c) en fase logarítmica, en ausencia del factor σ^s ; sin embargo, en ninguno de los tres casos se restaura la división celular. A partir de los resultados obtenidos se postula un modelo que involucra al factor transcripcional σ^s en el proceso de formación de colonias en mutantes de forma celular.

- El fenómeno de tolerancia a mutaciones de forma implica la restauración de la división celular, ya que una cepa *rodA* portadora de una mutación nula de *rpoS*, en la cual no se observa el efecto negativo de la falta de tolerancia sobre la capacidad de formación de colonias y sí sobre la división celular, no presenta tolerancia ni resistencia a mecilinam. Por otra parte, la restauración de la capacidad de formación de colonias observada en dicha cepa no ocurre en el caso de derivados portadores de mutaciones *rpoS* que otorgan ventaja adaptativa en fase estacionaria.



Referencias

- Adams MH (1959) Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, EEUU
- Aldea M, Garrido T, Hernández-Chico C, Vicente M, Kushner SR (1989) Induction of a growth-phase dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. EMBO J 8:3923-3931
- Aldea M, Hernández-Chico C, de la Campa AG, Kushner SR, Vicente M (1988) Identification, cloning and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. J Bacteriol 170:5169-5176
- Anderson RP, Roth JR (1978) Tandem chromosomal duplication in *Salmonella typhimurium*: fusion of histidine genes to novel promoters. J Mol Biol 119:147-166
- Antón DN (1978) Genetic control of defective cell shape and osmotic-sensitivity in a mutant of *Salmonella typhimurium*. Mol Gen Genet 160:277-286
- Antón DN (1979) Positive selection of mutants with cell envelope defects of a *Salmonella typhimurium* strain hypersensitive to the products of genes *hisF* and *hisH*. J Bacteriol 137:1271-1281
- Antón DN (1987) Conditional transduction of *Salmonella typhimurium envB* mutations. J Bacteriol 169:1767-1771
- Antón (1995) Resistance to mecillinam produced by the cooperative action of mutations affecting lipopolysaccharide (LPS), *spoT*, and *cya* or *crp* genes of *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol (en prensa)
- Antón DN, De Micheli AT, Palermo AM (1983) Isolation of round-cell mutants of *Salmonella typhimurium*. Can J Microbiol 29:170-173
- Aono R, Yamasaki M, Tamura G (1979) High and selective resistance to mecillinam in adenylate cyclase-deficient or cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein-deficient mutants of *Escherichia coli*. J Bacteriol 137:839-845

Arnosti DN, Chamberlin MJ (1989) Secondary σ factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci Usa 86:830-834

Arnqvist A, Olsén A, Normark S (1994) σ^8 -dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by σ^{70} in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. Mol Microbiol 13:1021-1032

Asoh S, Matsuzawa H, Ishino F, Strominger JL, Matsubishi M, Ohta T (1986) Nucleotide sequence of the *pbpA* gene and characteristics of the deduced aminoacid sequence of penicillin-binding protein 2 of *Escherichia coli* K12. Eur J Biochem 160:231-238

Bachmann BJ (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. Microbiol Rev 54:130-197

Bayer ME (1979) The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection. p 167-202. En Inouye M (ed), Bacterial outer membranes. John Wiley & Sons, Inc., New York, EEUU

Beck BD, Park JT (1976) Activity of three murein hydrolases during the cell division cycle of *Escherichia coli* K-12 as measured in toluene-treated cells. J Bacteriol 167:1250-1260

Begg KJ, Donachie WD (1978) Changes in cell size and shape in thymine-requiring *Escherichia coli* associated with growth in low concentration of thymine. J Bacteriol 133:452-458

Begg KJ, Donachie WD (1985) Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. J Bacteriol 163:615-622

Begg KJ, Takasuga A, Edwards DH, Dewar SJ, Spratt BG, Adacho H, Ohta T, Matsuzawa H, Donachie WD (1990) The balance between diferent peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. J Bacteriol 172:6697-6703

- Bi E, Lutkenhaus J (1991) FtsZ structure associated with cell division in *Escherichia coli*. *Nature* 354:161-164
- Böck A (1969) Mutation affecting the charging reaction of alanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* K 10. *Arch Mikrobiol* 68:165-178
- Bochner BR, Ames BN (1982) Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol Chem* 257:9759-9769
- Bochner BR, Huang H-C, Schieven GL, Ames BN (1980) Positive selection for loss of tetracycline resistance. *J Bacteriol* 143:926-933
- Bork P, Sander C, Valencia A (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7290-7294
- Botta GA, Park JT (1981) Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol* 145:333-340
- Bouloc P, Jaffé A, D'Ari R (1988) Preliminary physiological characterization and genetic analysis of a new *Escherichia coli* mutant, *lov*, resistant to mecillinam. *Rev Infect Dis* 10:906-910
- Carson M, Barondess J, Beckwith J (1991) The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol* 173:2187-2195
- Cashel M (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid starved stringent strains. *J Biol Chem* 244:3133-3141
- Cashel M, Rudd KE (1987) The stringent response. p 1410-1438. En Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol 2. American Society for Microbiology, Washington, DC, EEUU

- Costa CS, Antón DN (1992) Round-cell mutants of *Salmonella typhimurium* produced by transposition mutagenesis: lethality of *rodA* and *mre* mutations. *Mol Gen Genet* 236:387-394
- Cronan JE, Gennis RB, Maloy SR (1987) Cytoplasmic membrane. p 31-55. En Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Sachaechter M, Umbarger HE (ed), *Escherichia coli y Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, vol 1. American Society for Microbiology, Washington, DC, EEUU
- Dai K, Lutkenhaus J (1992) The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:6145-6151
- Davis RW, Botstein D, Roth JR (1980) *Advanced bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EEUU
- de Boer PAJ, Crossley RE, Rothfield LI (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the *minicell* locus determine the proper placement of the division site in *Escherichia coli*. *Cell* 56:641-649
- de Boer PAJ, Crossley RE, Rothfield LI (1992) Roles of MinC and MinD in the site specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:63-70
- Doi M, Wachi M, Ishino F, Tomioka S, Ito M, Sakagami J, Suzuki A, Matsubishi M (1988) Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 170:4619-4624
- Donachie WD (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 47:199-230
- Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG (1992) The alternative σ factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11978-11982

- Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M (1993) Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* 175:7982-7989
- Gibson MM, Ellis EM, Graeme-Cook KA, Higgins CF (1987) OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (*tppB*) of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 207:120-129
- Groat RG, Schultz JE, Zychlinsky E, Bockman AT, Martin A (1986) Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J Bacteriol* 168:486-493
- Gross CA, Strauss DB, Erickson JW, Yura T (1990) The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. p 167-189. En Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C (ed), *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EEUU
- Halling SM, Kleckner N (1982) A symmetrical six-base-pair target site sequence determines Tn10 insertion specificity. *Cell* 28:155-163
- Hane MW, Wood TH (1969) *Escherichia coli* mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies. *J Bacteriol* 99:238-241
- Hengge-Aronis R (1993) The role of *rpoS* in early stationary-phase gene regulation in *Escherichia coli* K12. p 171-200. En Kjelleberg S (ed), *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York, EEUU
- Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173:7918-7924
- Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B, Jaffé A (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 171:1496-1505

Huisman GW, Kolter R (1994) Sensing starvation: a homoserina lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science* 265:537-539

Inouye M (1974) A three dimensional molecular assembly model of a lipoprotein from the *Escherichia coli* outer membrane. *Proc Nat Acad Sci USA* 71:2396-2400

Ishino F, Mitsui K, Matsubishi M (1980) Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin sensitive transpeptidase, in preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein-1A. *Biochem Biophys Res Commun* 97:287-293

Ishino F, Park W, Tomioka S, Takase Y, Kunugita K, Matsuzawa S, Asoh S, Ohta T, Spratt B, Matsubishi M (1986) Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA. *J Biol Chem* 261:7024-7031

Ishino F, Tamaki S, Spratt B, Matsubishi M (1982) A mecillinam-sensitive peptidoglycan crosslinking reaction in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 109:689-696

Iwaya M, Weldon Jones C, Khorana J, Strominger JL (1978) Mapping of the mecillinam-resistant, round morphological mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133:196-202

Jaffé A, Chabbert Y, Derlot E (1983) Selection and characterization of β -lactam-resistant *Escherichia coli* K12 mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 23:622-625

Joseleau-Petit D, Thévenet D, D'Ari R (1994) ppGpp concentration, growth without PBP 2 activity, and growth-rate control in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 13:911-917

Kaasen Y, Falkenberg P, Styrvoid OB, Strøm AR (1992) Molecular cloning and physical mapping of the *otsBA* genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by KatF (AppR). *J Bacteriol* 174:889-898

- Kato J, Nishimura Y, Imamura R, Niki H, Hiraga S, Suzuki H (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell* 63:393-404
- Kjeldgaard NO, Maaløe O, Schaechter M (1958) The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* 19:607
- Kolter R, Siegele DA, Tormo A (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Ann Rev Microbiol* 47:855-874
- Korgaonkar KS, Ranade SS (1966) Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 12:185-190
- Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D, Weiss D (1989) Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* 53:367-376
- Lange R, Hengge-Aronis R (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:49-59
- Lange R, Hengge-Aronis R (1994) The cellular concentration of the σ^s subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes & Dev* 8:1600-1612
- Levy Yeyati P (1987) Estudio de la tolerancia a mutaciones *envB* en *Salmonella typhimurium*. Trabajo de Seminario de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
- Liu D, Reeves PR (1994) *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology* 140:49-57
- Loewen PC (1984) Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol* 157:622-626
- Loewen PC, Triggs BL (1984) Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 160:668-675

- Lonetto M, Gribskow M, Gross CA (1992) The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174:3843-3849
- Lowry O, Resebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Lund F, Tybring L (1972) 6 β -amidinopenicillanic acids-a new group of antibiotics. *Nature New Biol* 236:135-137
- Lutkenhaus JF (1977) Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131:631-637
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EEUU
- Markiewicz Z, Broome-Smith J, Schwarz U, Spratt BG (1982) Spherical *Escherichia coli* due to elevated levels of D-alanine carboxipeptidase. *Nature* 297:702-704
- Matsubishi S, Kamiryo T, Blumberg P, Linnet P, Willoughby E, Strominger JL (1974) Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. *J Bacteriol* 117:578-587
- Matsubishi M, Nakagawa J, Ishino F, Nakajima-Iijima S, Tomioka S, Doi M, Tamaki S (1981) Penicillin binding proteins: their nature and functions in the cellular duplication and mechanism of action of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*. p 203-223. En *Beta-lactam antibiotics*. Japan Scientific Societies Press, Tokio, Japón
- Matsubishi M, Nakagawa J, Tomioka S, Ishino F, Tamaki S (1982) Mechanism of peptidoglycan synthesis by penicillin-binding proteins in bacteria and effects of antibiotics. p 364-377. En Mitsubishi S (ed), *Drug resistance in bacteria-genetics, biochemistry and molecular biology*. Japan Scientific Societies Press, Tokio, Japón

- Matsubishi M, Wachi M, Ishino F (1990) Machinery for cell growth and division: penicillin binding proteins and other proteins. *Res Microbiol* 141:89-103
- Matsuzawa H, Asoh S, Kunai K, Muraiso K, Takasuga A, Ohta T (1989) Nucleotide sequence of the *rodA* gene, responsible for the rod shape of *Escherichia coli*: *rodA* and the *pbpA* gene, encoding penicillin-binding protein 2, constitute the *rodA* operon. *J Bacteriol* 171:558-560
- McCann MP, Kidwell JP, Matin A (1991) The putative σ factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173:4188-4194
- McMacken R, Silver L, Georgopoulos C (1987) DNA replication. p 564-612. En Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Sachaechter M, Umberger HE (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol 1. American Society for Microbiology, Washington, DC, EEUU
- Melchior NH, Blom J, Tybring L, Birch-Andersen A (1973) Light and electron microscopy of the early response of *Escherichia coli* to a 6 β -amidinopenicillanic acid (FL 1060). *Acta path microbiol scand Section B* 81:393-407
- Mengin-Lecreulx D, Parquet C, Desviat LR, Pla J, Flouret B (1989) Organization of the *murE-murG* region of *Escherichia coli*: identification of the *murD* gene coding for the D-glutamic acid adding enzyme. *J Bacteriol* 171:6126-34
- Meynell GG, Meynell E (1970) Theory and practice in experimental bacteriology, 2nd edition. Cambridge University Press, London, Great Britain
- Mulvey MR, Loewen PC (1989) Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel σ transcription factor. *Nucl Acids Res* 17:9979-9991
- Mulvey MR, Sorby PA, Triggs-Raine BL, Loewen PC (1988) Cloning and physical characterization of *katE* and *kafF* required for catalase HPII expression in *Escherichia coli*. *Gene* 73:337-345

- Mulvey MR, Switala J, Borys A, Loewen PC (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172:6713-6720
- Murray ML, Hartman PE (1972) Overproduction of *hisH* and *hisF* gene products leads to inhibition of cell division in *Salmonella*. *Can J Microbiol* 18:671-681
- Neu HC, Heppel LA (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem* 240:3685-3692
- Nguyen LH, Jensen DB, Thompson EN, Gentry DR, Burgess RR (1993) In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli katF/rpoS* gene product. *Biochemistry* 32:11112-11117
- Nikaido H, Vaara M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1-32
- Niki H, Jaffé A, Imamura R, Ogura T, Hiraga S (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kDa protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J* 10:183-193
- Normark S (1969) Mutation in *Escherichia coli* K-12 mediating spherelike envelopes and changed tolerance to ultraviolet irradiation and some antibiotics. *J Bacteriol* 98:1274-1277
- O'Neal CR, Gabriel WM, Turk AK, Libby SJ, Fang FC, Spector MP (1994) RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon, and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176:4610-4616
- Ogura T, Boulloc P, Niki H, D'Ari R, Hiraga S, Jaffé A (1989) Penicillin-binding protein 2 is essential in wild type *Escherichia coli* but not in *lov* or *cya* mutants. *J Bacteriol* 171:3025-3030
- Oliver JD (1993) Formation of viable but nonculturable cells. p. 239-272. En Kjelleberg S (ed), Starvation in bacteria. Plenum Press, New York, EEUU

Oppezzo OJ, Antón DN (1995) Involvement of *cysB* and *cysE* genes in the sensitivity of *Salmonella typhimurium* to mecillinam (manuscrito en preparación)

Palva ET, Liljeström P, Harayama S (1981) Cosmid cloning and transposon mutagenesis in *Salmonella typhimurium* using phage λ vehicles. *Mol Gen Genet* 181:153-157

Park JT (1987) Murein Synthesis. p 663-671. En Neidhart FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (ed), *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol 1. American Society for Microbiology, Washington, DC, EEUU

Prince RW, Xu Y, Libby SJ, Fang FC (1994) Cloning and sequencing of the gene encoding the RpoS (KatF) σ factor from *Salmonella typhimurium* 14028s. *Bioch Biophys Acta* 1219:198-200

Rosen BP, Heppel LA (1973) Bacterial membranes and walls. L. Leive (ed), M. Dekker, Inc., New York, EEUU

Roszak DB, Colwell (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365-379

Roth JR, Antón DN, Hartman PE (1966) Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. I. Isolation and general properties. *J Mol Biol* 22:305-323

Rothfield LI, de Boer PAJ, Cook WR (1990) Localization of septation sites. *Res Microbiol* 141:57-63

Sales M, Brenchley JE (1982) The regulation of the ammonia assimilation enzymes in Rel⁺ and Rel⁻ strains of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 186:263-268

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EEUU

- Sanderson KE, Ross H, Ziegler L, Makela PH (1972) F⁺, Hfr and F⁻ strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella abony*. *Bacteriol Rev* 36:608-637
- Sanderson KE, Roth JR (1988) Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Edition VII. *Microbiol Rev* 52:485-532
- Satta G, Fontana R, Canepari P, Botta G (1979) Peptidoglycan synthesis in cocci and rods of a pH-dependent, morphologically conditional mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 137:727-734
- Schellhorn HE, Hassan HM (1988) Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170:4286-4292
- Schellhorn HE, Stones VL (1992) Regulation of *katF* and *katE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol* 174:4769-4776
- Siegele DA, Almirón M, Kolter R (1993) Approaches to the study of survival and death in stationary-phase in *Escherichia coli*. p. 151-169. En Kjelleberg S (ed), *Starvation in bacteria*. Plenum Press, New York, EEUU
- Siegele DA, Kolter R (1992) Life after log. *J Bacteriol* 174:345-348
- Spector MP, Aliabadi Z, Gonzalez T, Foster JW (1986) Global control in *Salmonella typhimurium*: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis- and heat shock-inducible proteins. *J Bacteriol* 168:420-424
- Spratt BG (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci Usa* 72:2999-3003
- Spratt BG (1977) Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with termolabile penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* 131:293-305
- Spratt BG, Boyd A, Stoker N (1980) Defective and plaque-forming lambda transducing bacteriophage carrying penicillin-binding protein-cell shape genes: genetic and physical mapping and identification of gene products from the *lip-dacA-rodA-pbpA-leuS* region of the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* 143:569-581

Spratt BG, Cromie KD (1988) Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis* 10:699-711

Spratt BG, Pardee AB (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *Escherichia coli*. *Nature* 254:516-517

Steck TR, Drlica K (1985) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* 36:1081-1088

Stephens JC, Artz SW, Ames BN (1975) ppGpp: positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:4389-4393

Stoker N, Broome-Smith J, Edelman A, Spratt BG (1983) Organization and subcloning of the *dacA-rodA-pbpA* cluster of cell shape genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 155: 847-853

Strugger S (1948) Fluorescence microscope examination of bacteria in soil. *Can J Res* 26:188

Tamakl S, Matsuzawa H, Matsubishi M (1980) Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141:52-57

Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N, Ishihama A, Takahashi H (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 USA* 90:3511-3515

Tedin K, Bremer H (1992) Toxic effects of high levels of ppGpp in *Escherichia coli* are relieved by *rpoB* mutations. *J Biol Chem* 267:2337-2344

Touati E, Dassa E, Boquet PL (1986) Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2,5 acid phosphatase expression and restore succinate utilization in CRP-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 202:257-264

- Tuveson RW (1981) The interaction of a gene (*nur*) controlling near-UV sensitivity and the *polA1* gene in strains of *Escherichia coli* K-12. *Photochem Photobiol* 33:919-923
- van Alphen W, van Selm N, Lugtenberg B (1978) Pores in the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 159:75-83
- Vinella D, D'Ari R, Bouloc P (1992) Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. *EMBO J* 11:1493-1501
- Vinella D, Joseleau-Petit D, Thévenet D, Bouloc P, D'Ari R (1993) Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression. *J Bacteriol* 175:6704-6710
- Vogel HJ, Bonner DM (1956) Acetyl-ornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218:97-106
- Wachi M, Doi M, Okada Y, Matsushashi M (1989) New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 171:6511-6516
- Wachi M, Matsushashi M (1989) Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 171:3123-3127
- Waxman DJ, Strominger JL (1983) Penicillin binding proteins and the mechanism of action of β -lactam antibiotics. *Ann Rev Biochem* 52:825-869
- Way JC, Davis MA, Morisato D, Roberts DE, Kleckner N (1984) New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32:369-379
- Weidel W, Pelzer H (1964) Bagshaped macromolecules. A new outlook in bacterial cell walls. *Advan Enzymol* 26:193-232

- Westling-Häggström B, Normark S (1975) Genetic and physiological analysis of an *envB* spherelike mutant of *Escherichia coli* K12 and characterization of its transductants. *J Bacteriol* 123:75-82
- Wientjes FB, Nanninga N (1991) On the role of the high molecular weight penicillin-binding proteins in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 142:333-344
- Woldringh CL, Huls P, Pas E, Brakenhoff GJ, Nanninga N (1987) Topography of peptidoglycan synthesis during elongation and polar cap formation in a cell division mutant of *Escherichia coli* MC4100. *J Gen Microbiol* 133:575-586
- Wolf-Wartz H, Normark S (1976) Evidence for a role of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in septum separation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 128:580-586
- Wyche JH, Kennedy J, Hartman Z, Hartman PE, Diven J (1974) Round-cell mutant of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 120:965-969
- Zambrano MM, Siegele DA, Almirón M, Tormo A, Kolter R (1993) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259:1757-1760
- Zidwick MJ, Korshus J, Rogers P (1984) Positive control of expresión of the *argECBH* gene cluster in vitro by guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate. *J Bacteriol* 159:647-651