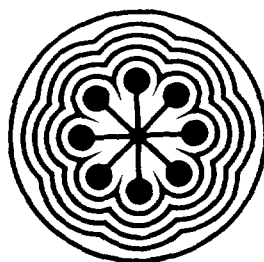




MX0700140

instituto nacional de investigaciones nucleares



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

DIRECCION DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

**MECANISMOS DE ADAPTACION DE ESCHERICHIA COLI A LA LUZ
ULTRAVIOLETA I.- AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A LUZ
ULTRAVIOLETA.**

GERENCIA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y GENETICA

INFORME TECNICO CA-95-36

SEPTIEMBRE DE 1995

**MECANISMOS DE ADAPTACION DE ESCHERICHIA COLI A LA LUZ
ULTRAVIOLETA I.- AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A LUZ
ULTRAVIOLETA.**

**David Alcántara Díaz,
Departamento de Genética,
Gerencia de Ciencias Ambientales y Genética,
Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.**

INFORME TECNICO CA-95-36

SEPTIEMBRE DE 1995

INTRODUCCION.

De acuerdo con la teoría de la evolución, desde su aparición, los seres vivos han experimentado un sinnúmero de transformaciones que han dado lugar a toda la diversidad biológica que existe o ha existido en la tierra. Un punto de debate dentro de la teoría se refiere a la importancia que han tenido, dentro de tal diversificación, eventos de tipo aleatorio o azaroso; así, una parte de los evolucionistas opina que la diversidad biológica es el producto de la adaptación y que la selección natural puede explicar cualquier diferencia fenotípica entre los organismos; según este punto de vista, la evolución ha sido dirigida por la necesidad de los organismos de adaptarse lo mejor posible a las condiciones del medio circundante, dejando muy poco lugar a variaciones al azar. Otro grupo, en cambio, dá mayor énfasis al papel que ha jugado el azar en la evolución biológica; según este grupo, el carácter aleatorio de las mutaciones y de la deriva genética; así como factores externos, tales como fluctuaciones climáticas o acontecimientos geológicos, han dado lugar a una biodiversidad irreproducible (Gould, 1995).

En principio, esta controversia podría resolverse si la evolución biológica pudiera repetirse bajo las mismas condiciones. Si en la segunda vuelta tomara el mismo curso, el punto de vista adaptacionista o seleccionista se vería favorecido; pero si se generara una biota completamente diferente, la importancia de los acontecimientos

estocásticos sería reforzada. Desde luego ese experimento no se puede realizar, pero se pueden diseñar experimentos que, en menor escala, cuantifiquen el papel del azar en la evolución; en lugar de repetir todo el proceso evolutivo se puede lograr el mismo objetivo propagando simultáneamente poblaciones independientes de organismos y siguiendo el curso de algún carácter bajo las mismas condiciones ambientales. Con este sistema experimental es posible estudiar las variaciones de esas poblaciones en caracteres no sometidos a una presión selectiva o en caracteres con un alto valor adaptativo en un ambiente particular (Travisano y col., 1995). Para este propósito, las bacterias como *Escherichia coli*, constituyen un grupo de organismos muy adecuados; su fácil manejo y su rápido crecimiento, así como su gran resistencia al almacenamiento por largos periodos de tiempos, permiten el seguimiento de poblaciones durante cientos de generaciones y la comparación directa entre los tipos ancestrales y los derivados.

Utilizando este sistema experimental, en el presente trabajo se pretende estudiar los mecanismos de adaptación de *Escherichia coli* a un agente fuertemente selectivo del medio ambiente. Nos referimos a la luz ultravioleta de 254 nm (UV), un componente de la luz solar que induce una variedad de daños en el ADN de las células expuestas (Gordon y Haseltine, 1982), los cuales deben ser eliminados a fin de evitar sus efectos letales y mutagénicos. De particular interés dentro de este estudio es lo que ocurre con las poblaciones de *E. coli* sometidas simultánea pero independientemente a exposiciones repetidas de luz UV con periodos intercalados de crecimiento; ¿es la adaptación de las bacterias a tales condiciones un proceso que puede seguir indistintamente varios caminos?; o, independientemente de la ocurrencia aleatoria de

las mutaciones, ¿existe algún mecanismo que sea preferentemente seleccionado?.

En este primer informe se reportan los resultados obtenidos acerca de la resistencia a radiación UV de 5 poblaciones independientes de *E. coli* sometidas en forma paralela a 80 exposiciones sucesivas de luz UV con periodos intercalados de crecimiento. Bajo estas condiciones, las 5 poblaciones mostraron en general una tendencia hacia una mayor resistencia a los efectos de la luz UV. Sin embargo, la forma en que dicha resistencia aumentó a lo largo del proceso y el nivel alcanzado por cada una de las poblaciones es diferente, lo cual sugiere diversos mecanismos de adaptación.

MATERIALES Y METODOS

Bacterias.- Como punto de partida para este estudio se utilizó la cepa PQ30 de *E. coli*, cuyo genotipo es el siguiente: F⁻, thr, leu, his, pyrD, thi, trp::MuC⁺, srl300::Tn10, sfiA::Mud (Δ p lac)cts, lac Δ U169, galE, galY, phoC, rpoB. El uso de esta bacteria permite estudiar los mecanismos de la resistencia a radiación UV sobre la base de que todos los sistemas de reparación del ADN son funcionales; además, la presencia de la fusión sfiA::Mud (Δ p lac) permite medir la inducibilidad de la respuesta SOS por medio del cromoen ensayo (Quillardet, 1981). Cada 10 ciclos de irradiación-crecimiento se aislaron y conservaron muestras de cada una de las 5 poblaciones, a las cuales se les dió una nomenclatura consistente en agregar al nombre de la cepa progenitora PQ30, el número de ciclos acumulados seguido del número de la población del 1 al 5.

Ciclos de Irradiación.- Un mililitro de un cultivo de *E. coli* PQ30 en fase estacionaria temprana de crecimiento en medio Luria-Bertani (LB), se centrifugó a 7000 rpm durante 1 a 2 minutos y se resuspendió en igual volumen de MgSO₄ 10⁻² M. Se irradió con UV proveniente de una lámpara germicida de 15 watts y una alícuota de 0.1ml se sembró en un mililitro de medio LB adicionado con ampicilina y tetraciclina (30ug/ml de cada uno), incubándose a 37°C por un período no menor de 6 horas antes de iniciar nuevamente todo el procedimiento.

Determinación de la supervivencia a UV.- Las células bacterianas de cultivos en fase exponencial de crecimiento en medio LB se centrifugaron y se resuspendieron en igual volumen de MgSO₄ 10⁻² M. Se irradiaron con diferentes dosis de luz UV, se diluyeron en MgSO₄ 10⁻² M y se sembraron en medio LB solidificado con agar al

15%. Se incubaron 18-20 horas a 37°C y se contaron las colonias sobrevivientes.

RESULTADOS

En su fase inicial el estudio comprende la realización de 5 series paralelas e independientes de ciclos de irradiación-crecimiento con el fin de determinar hasta que punto la adaptación de *E. coli* a un "medio" con una alta incidencia de luz UV puede seguir diferentes caminos o si existe algún mecanismo preferentemente seleccionado.

Las dosis de luz UV de los ciclos de irradiación aparecen en la tabla I.

Dado que uno de los aspectos de mayor interés en el presente estudio es la convergencia o divergencia en la adquisición de la resistencia a UV en poblaciones bacterianas independientemente tratadas, entonces es

Tabla I.- Dosis de luz UV en J/m² de los ciclos de irradiación crecimiento.

No. de ciclos	Dosis (J/m ²)	Razón de dosis
1-10	10	1 J/m ²
11-20	20	1 J/m ²
21-30	40	1 J/m ²
31-40	80	1 J/m ²
41-50	160	10 J/m ²
51-60	160	10 J/m ²
61-70	320	10 J/m ²
71-80	640	10 J/m ²

necesario asegurarse que los mutantes resistentes a UV no estaban ya presentes en

la población original. Si la luz ultravioleta únicamente selecciona los mutantes "espontáneos" ya presentes, entonces la probabilidad de una convergencia en los mecanismos de resistencia a UV aumentaría notablemente.

Con objeto de descartar esta posibilidad, la cepa progenitora PQ30 fue sembrada por estría sobre medio sólido LB, irradiada con 50, 100 y 150 J/m² de luz UV e incubada a 37°C durante 18 a 20 horas. Después de ese período de incubación se observó el crecimiento de las bacterias y se encontró que a 150 J/m² habían aparecido varias colonias aisladas, posibles mutantes espontáneos resistentes a UV. Esas colonias fueron resembradas en medio LB e incubadas por otras 20 horas con el fin de verificar su resistencia a UV por medio del mismo método de estría en agar. El resultado fue que dichos clones volvieron a mostrar la misma sensibilidad a UV que la cepa PQ30, es decir, un crecimiento confluyente entre 0 y 100 J/m² y solo colonias aisladas a 150 J/m². Un tercer aislamiento cultivo e irradiación de esas colonias, dió los mismos resultados cualitativos, sugiriendo que en la cepa progenitora PQ30 no existen mutantes espontáneos resistentes a UV y que los clones sobrevivientes encontrados a la dosis más alta sobrevivieron por alguna otra razón, tal como la protección o encubrimiento de unas células por otras.

En la figura 1, basada en los datos de supervivencia en diferentes etapas de los ciclos de irradiación-crecimiento, obtenida a una dosis uniforme de 100 J/m², se muestra que aunque al principio la resistencia a UV de las 5 poblaciones aumentó muy poco, a partir de los 40 ciclos, hubo ya en general una clara tendencia hacia una mayor tolerancia a los efectos letales de la luz UV. Sin embargo, la forma en que cada una de las poblaciones se comportó posteriormente fue muy diferente y hasta se podría

decir caótica; mientras que en algunas (PQ30-1, 2 y 3) la resistencia a UV siguió en aumento, en otras (PQ30-4 y 5) disminuyó después de alcanzar un máximo. El caso de la población número 5 es verdaderamente insólito, ya que a partir de los 50 ciclos en que alcanzó su máxima resistencia, su sensibilidad a la luz UV aumentó hasta un nivel no muy diferente del de la cepa progenitora PQ30; un comportamiento completamente inesperado en virtud de que las dosis de UV se duplicaron cada 10 ciclos y al final de la serie eran ya bastante altas. Probablemente esta población acumuló varias mutaciones deletereas que reducen su tolerancia a los efectos letales de la luz UV, las cuales inexplicablemente no fueron eliminadas en favor de otras que incrementaran la resistencia de las bacterias a UV. Este es un hecho desconcertante porque implica que la selección de los mutantes bacterianos inducidos más resistentes, no es una consecuencia necesaria de la exposición repetida a la luz UV. Las gráficas de supervivencia a UV mostradas en las figuras 2 y 3, indican que en general la resistencia adquirida por las poblaciones bacterianas es mayor a dosis altas de UV (100 J/m^2) que a dosis bajas (25 J/m^2). Por ejemplo, mientras que a 25 J/m^2 las poblaciones derivadas después de 80 ciclos de irradiación no son significativamente más resistentes que la cepa original, a 100 J/m^2 son, con excepción de la población número 5, por lo menos 50 veces más resistentes. Esto sugiere claramente que cualesquiera que sean los mecanismos de resistencia a UV seleccionados, su eficacia es mayor a dosis altas (Tabla II).

DISCUSION

El presente informe presenta los primeros resultados obtenidos en el estudio de la adaptación a un medio con una alta incidencia de luz UV de 5 poblaciones

bacterianas que comparten un ancestro común. La idea es tratar de reproducir en el laboratorio los procesos que ocurren en la naturaleza bajo una intensa presión selectiva; en nuestro estudio dichos procesos naturales son acelerados por medio de un agente externo como la luz UV, que, tanto induce las mutaciones, materia prima del cambio evolutivo, como selecciona aquellas que ofrecen a las células una mayor ventaja adaptativa en ese medio particular. En teoría tales mutaciones deberían ser las que confieren a las bacterias una alta resistencia a los efectos letales de la luz UV, ya sea por protección del material genético, principal blanco celular de la radiación UV, o por una reparación enzimática más eficiente de los daños inducidos en él.

Con excepción de las llamadas mutaciones adaptativas descritas por Cairns (Cairns y col., 1988) y revisadas por Rosenberg (1994), las mutaciones en general ocurren al azar y por lo tanto se puede suponer que las bacterias seguirán indistintamente varios caminos para alcanzar ese fin.

Sin embargo, la selección puede favorecer el mecanismo de resistencia a UV más simple o económico para las células, que satisfaga al mismo tiempo los altos requerimientos para sobrevivir. En nuestro sistema experimental hemos asumido que, como resultado de las irradiaciones con luz UV aparecen varios mutantes que tienen la oportunidad de multiplicarse durante el período de crecimiento intermedio y de ser seleccionados en la siguiente irradiación.

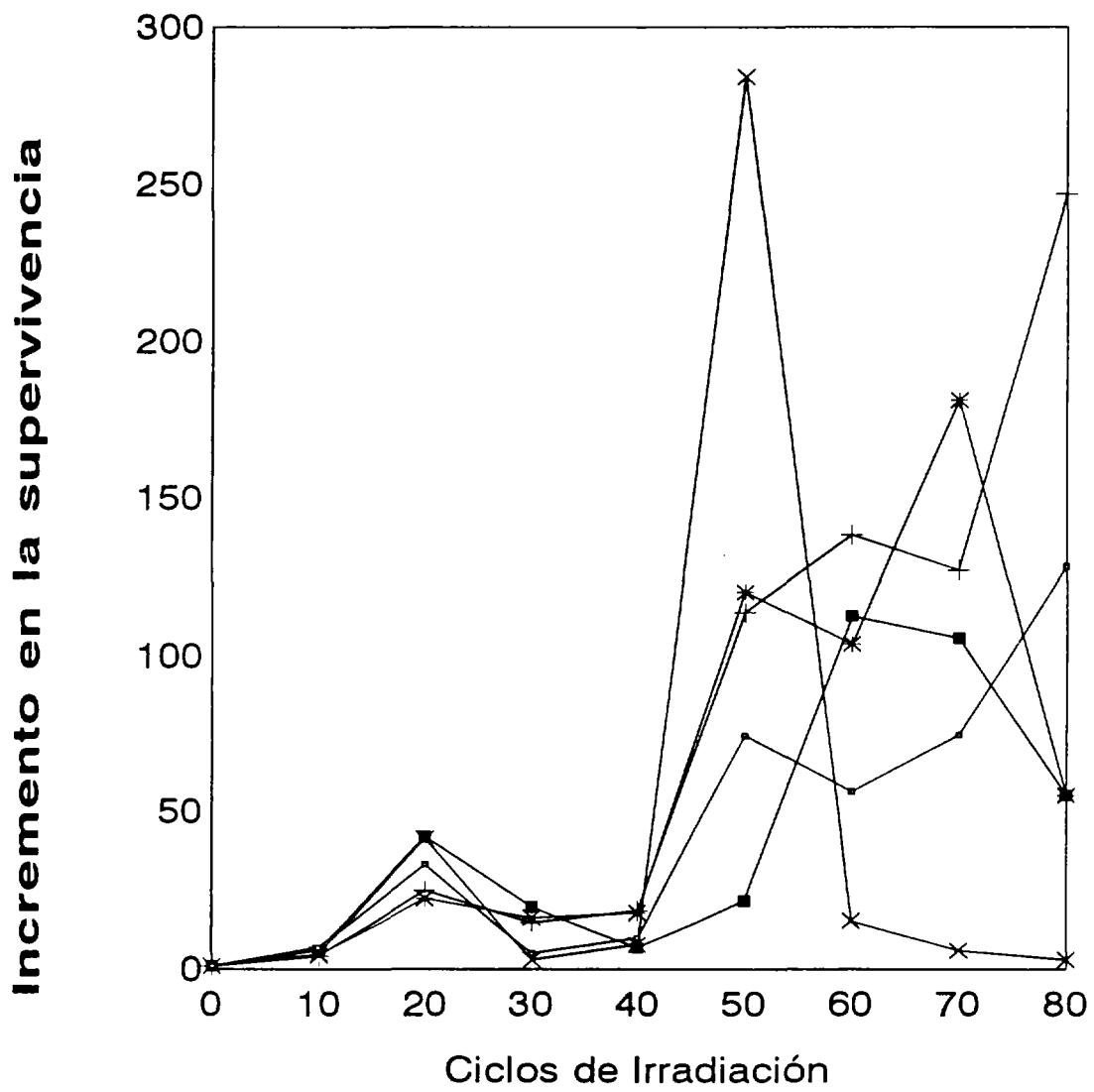
Sin embargo, durante los primeros 40 ciclos de irradiación-crecimiento, es decir, unas 160 generaciones, las poblaciones no cambiaron gran cosa con respecto al tipo ancestral, a pesar de haber sido expuestas a dosis de UV que podrían matar entre el

15 y el 90 % de los individuos. No obstante, en ese lapso de tiempo las bacterias probablemente acumularon mutaciones al azar que no afectaban significativamente la supervivencia celular y por lo tanto no eran seleccionadas, pero que, posteriormente, al intensificarse la presión selectiva por las altas dosis de UV, determinaron la gran variabilidad observada en las 5 poblaciones bacterianas.

En conclusión, la adaptación de las 5 poblaciones paralelas a una alta incidencia de UV consistió en un aumento de la resistencia a los efectos letales de dicho agente selectivo; pero, puesto que la adaptación depende de mutaciones al azar es altamente probable que los mecanismos seleccionados sean diferentes en cada una de ellas. La identificación de los genes mutados, causantes de los cambios fenotípicos observados en cada una de las 5 poblaciones, está ahora bajo estudio en nuestro laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- Cairns J., Overbaugh J. y Miller S. 1988. The origin of mutants. *Nature* (London), 335: 142-145.
- Gordon L. K. y W. A. Haseltine. 1982. Quantitation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in double and single stranded DNA fragments of defined sequence. *Radiat. Res.* 88: 99-112.
- Gould S. J. 1994. The evolution of life on the earth. *Sci. Am.* 271 (4):62-69.
- Rosenberg S. M. 1994. In pursuit of a molecular mechanism for adaptive mutations. *Genome*, 37: 893-899.



—•— PQ30-1 + PQ30-2 * PQ30-3 ■ PQ30-4 ✕ PQ30-5

Fig.1 Incremento en la supervivencia a 100 J/m^2 de luz UV de las poblaciones derivadas de *E. coli* PQ30.

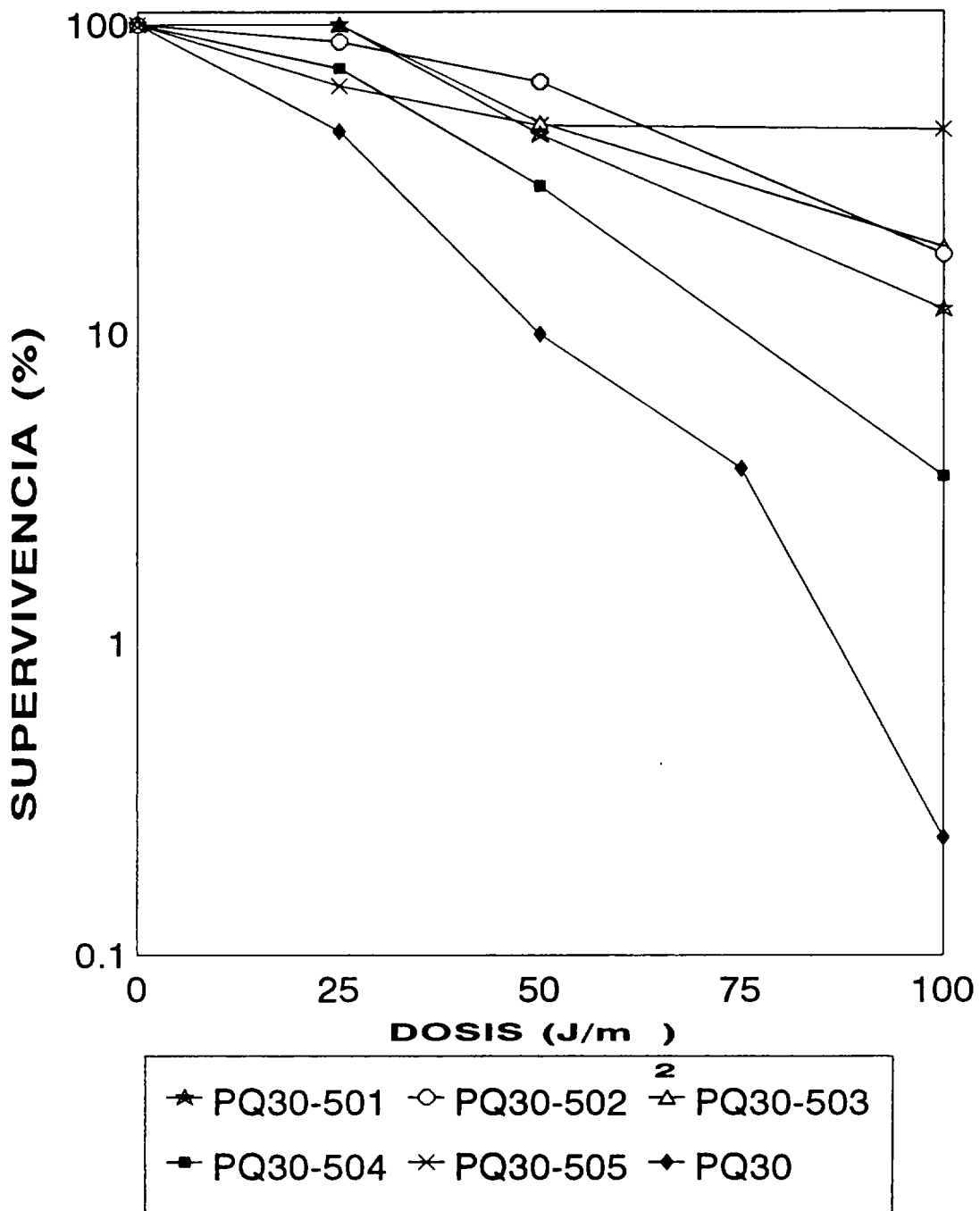


FIG. 2. CURVAS DE SUPERVIVENCIA A LUZ UV DE E. coli PQ30 Y CEPAS DERIVADAS DESPUES DE 50 CICLOS.

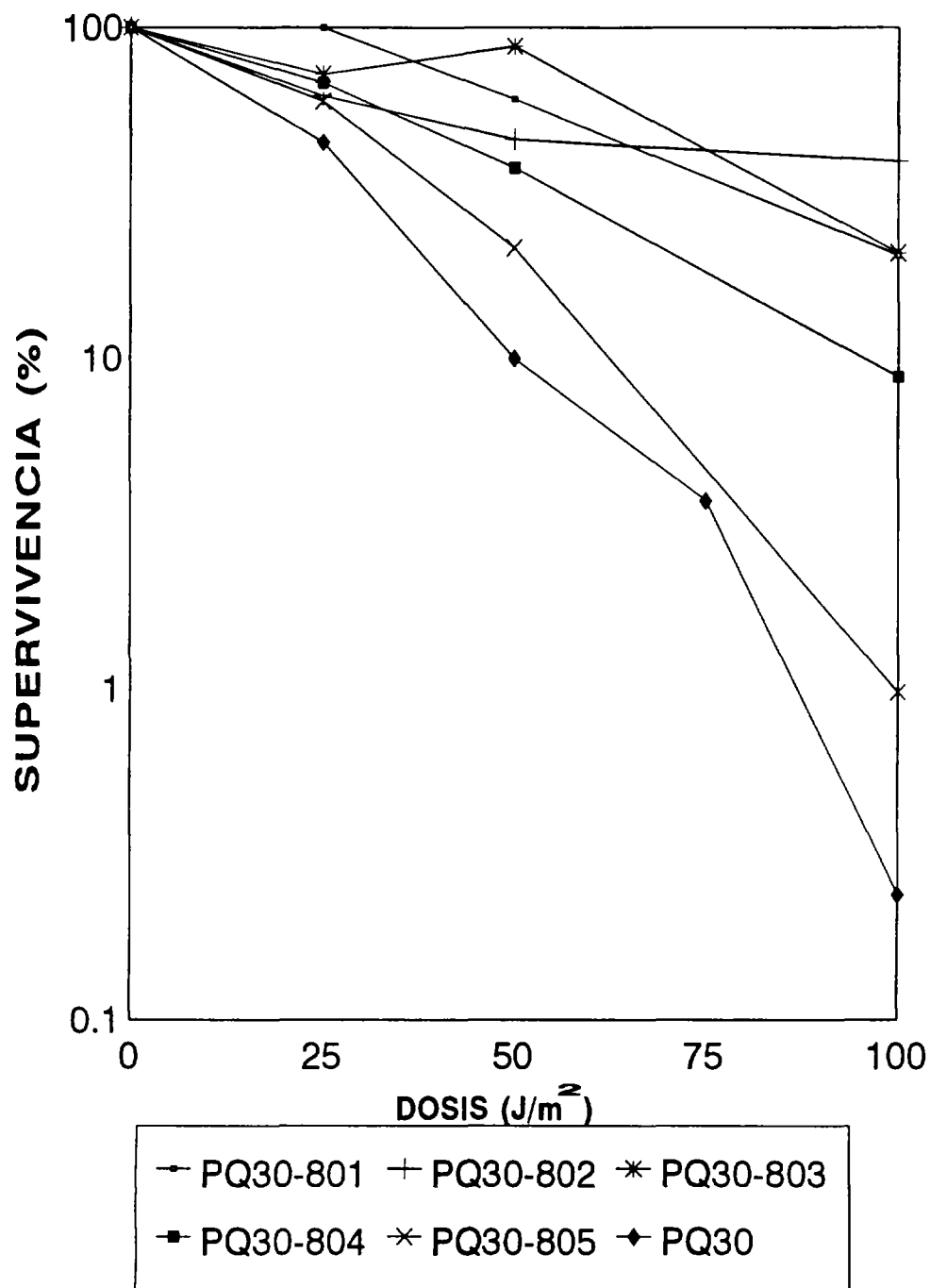


FIG. 3. CURVAS DE SUPERVIVENCIA A LUZ UV DE E. coli PQ30 Y CEPAS DERIVADAS DESPUES DE 80 CICLOS