

207



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y Posgrado del C. C. H.

Fusiones $rpoH$:: lac Z en el estudio de la inducibilidad
del regulón HTP en Escherichia coli.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A ;
CLAUDIA GONZALEZ ESPINOSA

MEXICO, D. F.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	45
MATERIALES Y METODOS	46
RESULTADOS	87
DISCUSION	125
CRONOLOGIA DE LA RESPUESTA HTP	131
BIBLIOGRAFIA	140

I N T R O D U C C I O N

Una de las características más relevantes de los seres vivos es que funcionan de una manera ordenada para mantener su alto grado de complejidad. De hecho, se puede definir a la regulación como el conjunto de mecanismos que lleva al individuo a mantener su funcionamiento con un riguroso orden. (Goldberger, 1980). Es importante señalar, sin embargo, que en los sistemas vivientes los procesos ordenados son solamente más frecuentes que los desordenados y entonces tienden a preservarse puesto que confieren ventajas selectivas a los organismos que los poseen. Los miles de reacciones químicas que ocurren en la célula están controlados por mecanismos de regulación que operan a muy distintos niveles, por ejemplo, en la expresión diferencial de la información genética.

Dada la multiplicidad de controles en cada sistema regulatorio y dada también la diversidad de mecanismos de control entre diferentes sistemas, la regulación genética ofrece un excitante y amplio paisaje para quienes estén interesados en la comprensión de las funciones de los seres vivos.

Todas las células tienen la capacidad de modular sus funciones vitales en respuesta a cambios en su entorno: tienen receptores específicos para mensajeros químicos, poseen también sensores de cambios de pH, concentración de osmolitos, temperatura, oxígeno, falta de nutrientes, etc.; estas moléculas están acopladas casi siempre a algún sistema de transducción de señales, y la respuesta celular puede variar de intensidad ó duración dependiendo de cuál sea el estímulo y por cuánto tiempo se presente.

Todos los organismos, desde las arqueobacterias hasta los mamíferos, presentan la capacidad de inducir un conjunto de proteínas específicas en respuesta a un aumento en la temperatura. Al conjunto de modificaciones metabólicas que tienen lugar dentro de la célula, y especialmente a la síntesis de polipéptidos especiales para contender con el incremento de temperatura, se le conoce con el nombre de respuesta calórica (Heat-Shock Response). Esta respuesta permite la adaptación a situaciones de estrés celular y es un ejemplo fehaciente de unidad dentro del mundo biológico.

1. LA RESPUESTA CALORICA EN EUKARIONTES

Los estudios sobre la respuesta calórica per se comenzaron prácticamente en 1962 con la publicación de un trabajo (Ritossa, 1962) que describía un nuevo conjunto de "puffs" en los cromosomas politénicos de las células gigantes, en las glándulas salivales de la mosca Drosophila busckii. Estos eran inducidos por calor, dinitrofenol o salicilato de sodio. Durante la siguiente década, la respuesta fue estudiada sobre todo a nivel citológico y se hicieron varias observaciones importantes; dentro de las más notables estaban que los "puffs" eran:

- a) Inducibles por otros tratamientos que ponían en estrés a la célula (Ashburner, 1970; Leenders, 1972).
- b) Se producían en unos cuantos minutos (Ashburner, 1970).
- c) Estaban asociados a la producción de RNA (Ashburner, 1970; Ritossa, 1962; Leenders, 1972).
- d) Se encontraban en otras especies de Drosophila y en otros tejidos (Ritossa, 1964).
- e) Y estaban acompañados de la desaparición de otros "puffs" (ver figura 1).

En 1973, Tissières y Mitchell inauguraron el estudio molecular de la respuesta reportando que la inducción de estos "puffs" coincidía con la aparición de un pequeño conjunto de proteínas (Tissières, et al., 1974). Esta respuesta podía estudiarse perfectamente en un cultivo de tejidos y desde el principio, fue tomada como modelo para estudiar la estructura de los genes y su regulación; así, los genes para las prote<inas de choque calórico (hsps, por "heat-shock proteins"), fueron los primeros genes eucarióticos clonados (Livak, et al., 1978; Shedl et al., 1978; Craig et al., 1979.); de los que se conoció su organización en el genoma (Livak, et al., 1978); de los que se supo el arreglo de su cromatina antes y después de ser activados (Wu, et al., 1979); de los que se encontraron indicios de sus

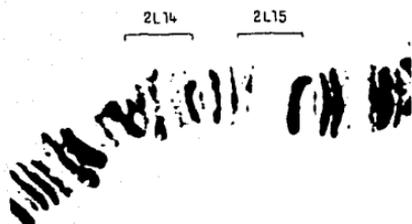


Fig. 1. The 2L 14 and 15 regions of salivary gland chromosome of *D. busckii* larvae reared at 25° C about 15 h before pupation.

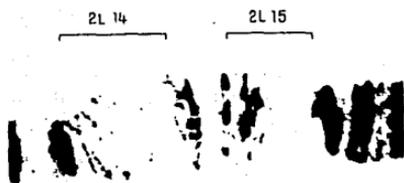


Fig. 2. The same regions as in Figure 1 after a thermal shock of 30 min at 30° C. Larvae near to pupation.

Figura 1. Ritossa describió en 1962 que después de un tratamiento con calor se inducían nuevos puffs en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales, en la mosca de la fruta *Drosophila busckii*. Se muestran algunas ilustraciones de un artículo publicado por él (ver referencias).

secuencias reguladoras (Pelham, 1982); y de los que se identificaron claramente sus factores de transcripción (Farker, 1984). Los genes para una de estas proteínas, hsp 70, dio uno de los primeros ejemplos convincentes de la conversión génica operando en una escala evolutiva del tiempo (Brown et al., 1981). La respuesta también proveyó de uno de los primeros ejemplos de la expresión genética selectiva actuando a nivel de traducción (Storti et al., 1980).

No fue sino hasta después de 1978 cuando investigadores que trabajaban con otros organismos descubrieron que el calor y muchos otros tipos de estrés podían inducir proteínas similares en células de pollo en cultivo (Kelly et al., 1982), en levadura (Miller et al., 1979) y en *Tetrahymena* (Guttman et al., 1979). Ahora sabemos que algunos genes de choque calórico están enormemente conservados en la escala filogenética y también sus secuencias regulatorias (Ignolia et al., 1980; Manseau et al., 1982).

Desafortunadamente, con respecto a la fisiología de la respuesta, se tiene todavía un panorama muy incompleto. Ultimamente se ha puesto mucha atención a tratar de investigar qué funciones tienen las proteínas inducidas y cómo se regulan. Sobre su funcionamiento se ha avanzado más y hay evidencias de que dan protección contra los efectos tóxicos del estrés. Los mecanismos de protección no se conocen y sólo se han podido establecer las funciones de unas cuantas proteínas. Por otro lado, la regulación de la expresión de las proteínas de choque calórico parece involucrar sistemas que operan a nivel transcripcional y traduccional.

1.1. LAS PROTEINAS INDUCIDAS POR CALOR.

Las proteínas de choque calórico son nombradas de acuerdo a su peso molecular, así pues, Hsp70 y Hsp90 corresponden a proteínas con un peso de 70 y 90 kilodaltones respectivamente.

Se define como proteína de "heat-shock" aquella cuya síntesis se ve inducida, a veces dramáticamente, a altas temperaturas. La descripción de cada proteína en particular está desligada en algunas ocasiones, de su funcionamiento como conjunto; de la siguiente descripción hay que tomar en cuenta que la respuesta es muy compleja, así que las funciones de cada proteína aislada no

necesariamente reflejan el papel que realiza durante el choque calórico.

HSP 70. Es la más conservada de las hsp's y como tal, tiene un enorme interés. La secuencia completa de aminoácidos de la Hsp70 de cuatro eucariontes y de un procarionte se presenta en la figura 2, tomada de Lindquist, en 1986.

La proteína humana tiene un 73% de homología con la de D. melanogaster y posee un 50% de homología con la de Escherichia coli. Hay que hacer notar que muchas de las diferencias se deben a sustituciones homólogas (R-K; D-E; A-G; etc.), y hay regiones extremadamente conservadas, por ejemplo de los aa 143 al 187 hay solo dos diferencias entre la proteína de humano y la de Drosophila, y solo cuatro entre éstas y la de E. coli.

Si bien en E. coli el gene para Hsp70 es único (ver más adelante), en Drosophila (Ignolia, 1982) y en Saccharomyces cerevisiae (Manseau, 1982) ésta proteína está codificada por familias multigénicas que son expresadas diferencialmente. Parece ser que la misma organización se encuentra en otros eucariontes.

No se sabe claramente el papel de Hsp70, pero algunos datos sugieren que está involucrada en remover la clatrina de vesículas en el interior de la célula, reacción dependiente de ATP (Chappell et al., 1985).

También se le ha encontrado unida a ribosomas y a otros complejos macromoleculares, sugiriéndose que tiene un papel como proteína estabilizadora de estructuras complejas (Finley et al., 1984).

Se ha sugerido que puede inhibir la precipitación de proteínas desnaturalizadas cuando se une a ellas (Finley et al., 1984). De hecho, la producción de proteínas desnaturalizadas e inestables ha sido propuesta como un mecanismo de inducción de la respuesta calórica, ya que ésta se activa cuando se inyectan a ovocitos de Xenopus proteínas dañadas (Subjeck et al., 1985).

MURAN	NA-KARRUGI	DLGTTYSUG	UFQNGVEII	ANDQSHATP	SYVAFT-DTE	ALIGDAKNG	
XENOPUS	.T.GU	.T					
DROSOPHILA	.P---	.I	.Y	.M	.V	.S	.H.EP
YERST	.S---		.A	.H.ANDR.D		.F	
E.COLI	.G---	.II	.M	.A	INDGTPAUL	E.AE.D	.II.V.Q.G
							T.V.QP..A
							60
VALPQHTVF	DAKALIGAKF	GDPVUQSDK	HUPFQIINDG	DKPKUQUSYK	GETKAFYPEE	ISSHULTKRE	
	.A	.C.L	.US.E	.K.E	.E.S.F		
	.AK	.Y	.D	.KIAE	.K.US	.G	.IG.E
							.S.A.A
							.M.T.Q
							.G
							.AE.K
							130
EIRAVLEYF	UTRAUITUPA	YFNDQSQAT	KDAGUIAGLN	ULNIIMEPTA	MAIRVGLDNT	GGGRNULIF	
	.L		.I			.KG	.AR.Q
	.ES	.I.D				.L	.L
	.S	.AK	.MD	.U			.E.M7
	.D	.E					.T.H.TIRUY
							200
QLGGGTFDUS	ILTIDGG---	IFEUKATAG	DTHLGGEDFD	NALUNHFVEE	FKAKHKKBIS	QNKAAVRAA	
							.G
							.T.LN
							.Y
							.M.L
							.L
							.KQBI
							.NPL.NQ.K
							270
TACRANKYL	SSSTGASLEI	DSLFE6IDFY	TSI----	TAA	AFEELCSOLF	ASTLEPUKA	LADAKLQKQ
	.SQ	.I	.A			.G	
	.E	.TI	.A	.Q	.KU	.S	.AN
							.M.Q
							.M.H.GD
							.D
							.U
							.S
							.Q.G.SUSD
							340
INDLULUGS	TRIPKUQELL	QOFFMGRDLM	KSINPDERUG	VGARVQRAIL	AGDKSENUQO	LLLLDUAPLS	
							.A
							.E
							.M.KM
							.L
							.A
							.SC.Q.GKI
							.U.U
							.T.Y
							.KEP
							.M
							.A
							.T
							.E.SKT
							.U
							.K
							.U
							.T
							410
LGLETAGGUR	TALIKRNTI	PTKQTOJFTT	YSDNPGULI	QUVEGERANT	KOMHLLGAFE	LSCIPAP-G	
	.U	.I	.S		.F		.G
							.K
							.A
							.T.D
							.G
							.A
							.K
							.G
							.A
							.OG.N
							.A
							480
UPQIEUTFDI	DAMGILNUTA	TKDSTGKANK	ITITADGKAL	SKEEIEANUQ	EAEKYKADE	VQRERUSAKH	
		.S	.VEK	.S	.Q		.D
							.D
							.A
							.D
							.M
							.AD
							.KMGQ
							.ITSA
							.F
							.E
							.KESQ
							.IAS
							.Q
							.QTR
							550
ALSYAFNAX	SAVEDEGLEG	KISERDKKKU	LQKQEVISH	LDAMTLAEKD	EFENKKELE	QUCHPIISGL	
	.L	.M	.NU	.DE	.ATI	SE	.TQ
							.EM
							.Q
							.D
							.K
							.G
							.TK
							.S
							.ATM
							.E
							.D
							.NE
							.T
							.RN
							.S
							.ATM
							.E
							.D
							.L
							.Q
							.DIA
							.R
							.K
							.E
							.KFE
							.L
							.QTR
							620
VQ-GR---	GG	PG	GGF	GGG	GGG	GGG	GGG
							610aa
VQ----	GG	UPG	GG	GGG	GGG	GGG	GGG
							617aa
HDGGRGAGG	PGAGCGQA	GGF	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
							611aa
VQ--AG--GR	PGGAGGAP	GGFP	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
							613aa
QQQHQQQTA	GAGASRNAX	DDDUUD	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
							638aa

Figura 2. Se muestra la secuencia completa de aminoácidos de cinco genes de hsp 70: de humano, de *Xenopus laevis*, de *Drosophila melanogaster*, de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Escherichia coli*. Un punto significa que es el mismo aminoácido que en la secuencia de humano.

Se ha especulado sobre el papel de Hsp70 pensando que probablemente se trate de una "chaperona", uniéndose a proteínas sintetizadas de novo hasta que son correctamente ensambladas dentro de estructuras complejas como el ribosoma, por ejemplo. Una vez cumplida su misión Hsp70 puede liberarse de la proteína escoltada; se lleva a cabo una hidrólisis de ATP cuya energía puede ser usada para ayudar al ensamblaje de la proteína, para liberarse de ella ó para ambas cosas (Welch et al, 1985).

Usando un sistema in vitro, Chirico et al., en 1988 mostraron que se requiere un factor soluble para que una proteína hidrofóbica pueda ser colocada en el interior de una membrana. Aparentemente, se necesita una proteína que resultó ser muy homóloga a Hsp70. En ese mismo año, Deshaies utilizó mutantes de levadura en Hsp70 para demostrar que la célula utiliza éste polipéptido para mover proteínas a través de membrana mitocondrial (Deshaies et al., 1988), figura 3.

La inducción de los genes de Hsp70 está regulada por oncogenes virales y celulares (Imperiale et al, 1984). Anticuerpos monoclonales indican que la proteína en condiciones normales se encuentra distribuida en citoplasma, pero bajo choque térmico migra al núcleo (La Thanque, 1984).

En general, el análisis de la familia de Hsp70 es complicado, los miembros tienen un punto isoeléctrico ácido y patrones tripticos similares en todas las especies estudiadas. Desafortunadamente no hay suficiente información para una comparación sistemática. Unen ATP (Welch, 1985), están metiladas en lisina y arginina (Wang, 1984), y unen ácidos grasos como palmítico y esteárico en una proporción de 1 a 1 (Guidon et al., 1985). Se sabe que Hsp70 de *Dyctostelium discoideum* se fosforila, pero no se ha comprobado en otros organismos (Loomis, 1982).

Mención aparte merece el papel de ésta familia de proteínas en algunos parásitos, ya que se ha encontrado que tienen un papel importante en la diferenciación de *Trypanosoma brucei* (Davies, 1987) y de *Leishmania* (Shapira, et al., 1988). Además, durante la respuesta inmune a lepra, tuberculosis (Young et al., 1988), malaria (Richman et al., 1989), y filariasis (Selkrik et al., 1989), se producen una gran cantidad de anticuerpos contra Hsp70.

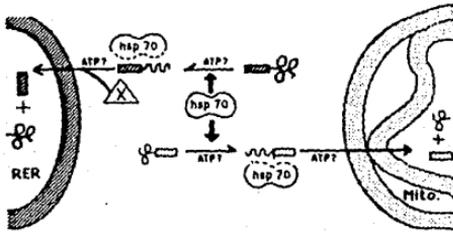


Figura 3. Se ha propuesto que hsp70 tiene un papel en la traslocación de proteínas. Una o más se unen al precursor que será translocado. En reacciones dependientes de ATP, hsp70 ayuda al polipéptido a cruzar la membrana. Ilustración tomada de Chirico et al., 1988.

Siendo tal vez la proteína más conservada a lo largo de toda la escala filogenética, el encontrar que Hsp70 es inmunógeno potente hace pensar en que probablemente tenga en su estructura regiones variables entre cada especie, además de otras altamente conservadas. Para una buena revisión del tema, ver el trabajo de Newport et al., 1988.

HSP 83. Esta es la segunda proteína más conservada de "heat-shock". La de *Drosophila* y de levadura son de 83 kd, su homólogo en *E. coli* tiene una masa aparente de 62.5 kd. Entre los genes de *Drosophila* y levadura se puede inferir un 60% de aminoácidos idénticos (Hackett et al., 1983). Los genes de *Drosophila* y los de *E. coli* tienen un 36% de homología en secuencia de aminoácidos, pero hay regiones donde es de más del 90%. Todas las células eucarióticas hacen esta proteína con un rango de tamaños de 83 a 90 kd. No hay secuencia de los genes en otros organismos pero los anticuerpos contra Hsp89 de pollo muestran una reacción cruzada con las proteínas de humano, ratón, rana y *Drosophila* (Schlesinger et al., 1982).

La caracterización bioquímica de la proteína está mucho más avanzada en vertebrados que en cualquier otro organismo. Está metilada en lisina y arginina (Wang, 1984) y se fosforila (Hackett et al., 1981). Se induce con calor pero la magnitud de la inducción depende del tejido y a la fecha, las más importantes propiedades de ésta proteína son 1) su asociación con proteínas transformantes de origen retroviral, 2) a complejos de receptor con hormonas esteroides y 3) su unión a citoesqueleto (figura 4).

La proteína del virus de sarcoma de Rous, pp60src, se une a Hsp89 y otra proteína de 50kd inmediatamente después de ser sintetizada. Este complejo es citosólico y pp60src se fosforila en serinas, pero no en tirosinas. Cuando se disocia de Hsp89, pp60src se activa como cinasa, se autofosforila en tirosinas y migra a la membrana plasmática (Brugge et al., 1981).

Anticuerpos monoclonales preparados contra el receptor 8S de progesterona, revelaron que Hsp90 es un componente mayoritario del complejo. Cuando el receptor se convierte en la forma 4S, se disocia de Hsp90 y adquiere su capacidad de unirse a DNA (Such et al., 1985), figura 5.

Si bien Hsp70 y Hsp90 son las principales proteínas de choque calórico en eucariontes, hay un grupo de polipéptidos de bajo peso molecular que también son inducidos y cuya función no se ha caracterizado todavía.

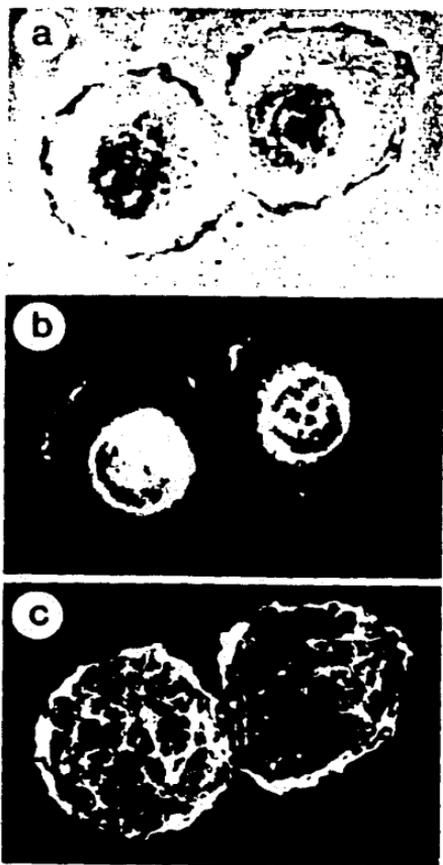


Figura 4. Cuando algunas células son estimuladas por insulina, hsp90 cambia su localización celular migrando del núcleo (b) a los filamentos de actina (c). En la figura a se muestra una imagen de las mismas células vistas en el microscopio de contraste de fases. Tomado de Koyasu et al., 1986.

La ubiquitine, que probablemente interaccione con Hsp70; la histona H2b, el τ -interferón, la enolasa y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa son otras proteínas inducibles por calor en eucariontes (Lindquist, 1985).

1.2. REGULACION DE LA RESPUESTA EN EUCARIONTES.

Los sistemas de control de la respuesta calórica varían, pero existen puntos comunes de regulación.

A nivel transcripcional. Fue encontrada una secuencia hacia el 5' de todos los genes de *Drosophila* inducibles por calor y se postula que funcionan como activadores de la transcripción, figura 6 (Ingolia et al., 1980).

Ha sido descrito además, un factor de transcripción para levadura, que es específico para los genes de choque calórico (Wiederrecht, et al., 1988) y se sabe que es esencial, que se fosforila cuando aumenta la temperatura (Sorger et al., 1988) y que es homólogo al de *Drosophila* y al de *E. coli*, porque fue purificado de una columna con sferosa acoplada a una secuencia de DNA con un promotor "Heat-shock" de *Escherichia coli*. (Parker, 1987).

Hay evidencia de que la respuesta también está regulada negativamente por Hsp70 (Di Domenico, et al., 1982) pero no se sabe si es un control directo o indirecto.

A nivel traduccional. El tratamiento con calor produce en células de *Drosophila* el más dramático cambio de especificidad de traducción que se haya descrito. Después de 10 minutos de un cambio de 25 a 37°C, los polisomas normales virtualmente desaparecen (Lindquist et al., 1975). Cuando aparecen los mRNAs de las proteínas de "heat-shock", se traducen muy eficientemente (Lindquist, 1980). Los ribosomas tienen la capacidad de distinguir cuáles son los mensajeros que corresponden a proteínas de choque térmico también en células He-La. Probablemente, los mRNAs de las hsp's tienen alguna característica estructural que les permite ser reconocidos: un líder no traducido hacia el 5' que es rico en residuos de adenosina, por ejemplo (Holmgren et al., 1981).

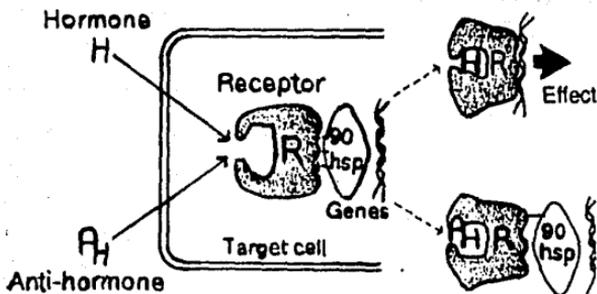


Figura 5. Se ha postulado que la proteína hsp90 regula, entre otras cosas, la acción de hormonas esteroides enmascarando el sitio de unión a DNA. Miller, D. 1989.

Consensus	<u>CTGGAAT</u> NTTCTAGA
Function
hsp 70	CCGAGAGACCCGGCCCTCGAATCTTCGGGAAAAGAGCCCGGGAGTATAAA
hsp 83	CATCCAGAAGCCTCTAGAAGCTTCTAGAGACITCCAGTTCGGTCCGGTITTTCTATAAA
hsp 22	ATTCCGAGACAGTCCGGGTATTTCTAGATTATATGCAITTCCTCTCTGTCAAGAGTATAAA
hsp 26	TTTCTGTCACTTTCGGACTCTTCTAGAAAAGCTCCAGCGGGTATAAA
hsp 27	GTCCCGTCTTGGTIGCCATCCACTAGTGTGTCTCAGCCAGCGGTCACTATAAA
hsp 68	TGACCCITTTCTCCAGGGAAAATCTCGAATTTTCCCTCCCGGGCCAGACAGTATAAA
hsp 68	CTCCGAGGGAATCTCGAATTTCCCTCCCGGGCCAGACAGTATAAA
hsp 21	CCCCGACCGGGCACGCACACTACGATACCGACCGGTTGTATAAA

Figura 6. Hacia el 5' de los genes de "heat-shock" en eucariontes se encuentran secuencias muy conservadas. Aquí se muestran las regiones consenso de 8 proteínas de choque calórico.

1.3. INDUCCION DE LA RESPUESTA CALORICA EN EUKARIONTES

Además del cambio de temperatura (un aumento de 5°C o más), la exposición a etanol, arsenito de sodio, cadmio, anaerobiosis, zinc, cobre, mercurio, iones sulfhidrilo, ionóforos de calcio, hormonas esteroides, agentes quelantes, piridoxinas, azul de metileno, glucosamina, desoxiglucosa, infección viral, adriamicina, análogos de aminoácidos, inducen las proteínas de choque calórico en casi todas las especies estudiadas. Con algunas excepciones, como *Dyctostelium*, donde el etanol, el arsenito y el cadmio no inducen la respuesta (Lindquist, 1985).

Por otro lado, un pequeño grupo de proteínas pueden ser inducidas preferencialmente dependiendo del estímulo; la síntesis no es generalizada sino parece diferencial de acuerdo al estrés producido. Los nucleótidos polifosforilados parecen tener un papel en la inducción (figura 7).

El puente que existe entre la señal y la inducción de las proteínas está lejos aún de ser caracterizado.

2. LA RESPUESTA CALORICA EN PROCARIONTES

La respuesta "heat-shock" en procariontes ha sido dilucidada en su mayor parte, por estudios realizados en la enterobacteria *Escherichia coli*, así que me referiré a ella en lo sucesivo y sólo mencionaré otros organismos cuando sea necesario.

Si bien son los procariontes los organismos que han aportado un mayor número de datos con respecto a la regulación de la expresión genética durante los últimos cuarenta años, la respuesta al calor en éstos fue reportada mucho después de que el fenómeno había sido descrito en plantas, animales y eucariontes unicelulares. Exceptuando algunos estudios de sobrevivencia de las bacterias a temperaturas elevadas, los fisiólogos bacterianos estaban más interesados en conocer los mecanismos por los cuales las células procarionticas lograban crecer en un gran rango de temperaturas y en cómo cambiaba la composición química de los cultivos.

Inducer	Ap ⁿ Np ⁿ	ppGpp	HSPs										OXY	SOS		
CdCl ₂	+++	++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
28 → 42°C	-	+/-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
28 → 50°C	+++	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ACDQ	++	+++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H ₂ O ₂	+	+++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
10% EtOH 28°C	+/-	++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
10% EtOH 37°C	+	+++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4% EtOH 28°C	-	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4% EtOH 37°C	-	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nalidixic Acid	-	-	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
-Ile	-	++	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

not induced
 induced

Figura 7. En esta tabla, tomada de Lindquist en 1986 se hace un resumen de las proteínas inducidas por diferentes tipos de estrés. Se menciona su relación con la producción de nucleótidos polifosforilados.

ESTUDIOS DE LA FISILOGIA DE *E. coli* DE ACUERDO CON LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

E. coli está clasificada como mesófilo con respecto a la temperatura y como neutrófilo con respecto al rango de pH que permite su crecimiento.

En el siglo pasado, Arrhenius (Arrhenius, S., 1889) desarrolló la relación entre la velocidad (v) de una reacción química y la temperatura absoluta (T) a la cual ocurre,

$$v = Ae^{-DE/RT}$$

Donde DE es la energía de activación de la reacción, R es la constante universal de los gases y A es una constante llamada el factor de colisión o el factor de frecuencia. Esta ecuación predice una relación casi lineal entre el logaritmo de la velocidad y el recíproco de la temperatura absoluta. Esa gráfica, llamada gráfica de Arrhenius, da una línea para reacciones químicas sencillas.

La gráfica de Arrhenius, en forma modificada, se usa frecuentemente para describir la relación entre la constante específica de crecimiento, k, de una bacteria y la temperatura. Para éste propósito, el término n, llamada temperatura característica se sustituye por DE. Si se aplica la ecuación de Arrhenius al crecimiento de un cultivo, la forma de crecer de casi todas las bacterias es muy similar. Bajo ciertos intervalos de temperatura, comúnmente llamado la normal del rango de Arrhenius, la gráfica es lineal. A temperaturas muy elevadas o muy bajas, la tasa de crecimiento decrece progresivamente, produciendo una gráfica vertical tanto a la temperatura máxima como mínima. Muchas bacterias, como *E. coli* y *Salmonella thyphimurium* pueden crecer en un rango de 13 a 48°C (ver fig. 8).

El rango normal de temperatura se extiende desde 21 hasta 37°C, con valor de 13,000 a 14,000 cal/mol (cerca de 54,000 a 59,000 J/mol) (Ingraham, 1985). La temperatura máxima a la cual puede mantenerse un crecimiento balanceado es aproximadamente 49°C. La mínima temperatura a la que puede crecer *E. coli* es de 7.5 a 7.8°C (Shaw, et al., 1971).

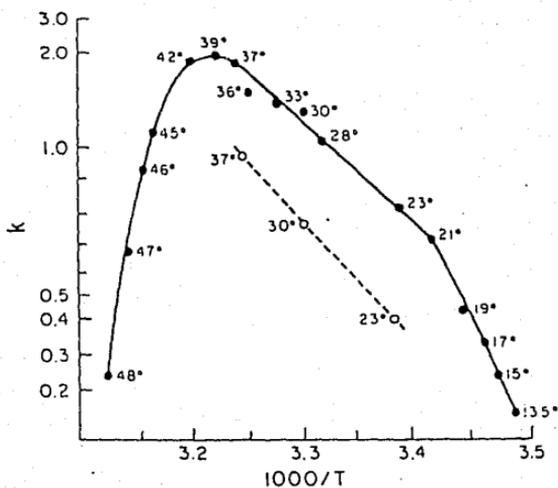


Figura 8. *Escherichia coli* puede ser considerado como un organismo mesófilo, su crecimiento es óptimo entre 40°C y 33°C, pero decrece a temperaturas extremas. Esta gráfica fue tomada de Ingraham, 1985.

El crecimiento de muchas cepas de *E. coli* K12 se afecta marcadamente a temperaturas elevadas, como 40 ó 45°C, por deficiencia de metionina (Ron et al., 1971). A estas temperaturas, la actividad de la primera enzima de la vía biosintética de metionina (homoserina transuccinilasa) se inhibe reversiblemente, probablemente por la desestabilización de sus puentes de hidrógeno.

Cuando los cultivos de *E. coli* crecen a cierta temperatura y son abruptamente cambiados a otra superior, la tasa de crecimiento asume el valor característico de cada temperatura sin ningún periodo de ajuste aparente. Si embargo, cuando el cambio se hace hacia una temperatura inferior, hay una fase lag seguida de un periodo de crecimiento anormalmente rápido antes de adquirir el valor característico de la temperatura final. Estos cambios observados son reflejo de una composición química muy distinta de la bacteria cuando el crecimiento se lleva a cabo en cada temperatura.

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS.

Como en el caso de muchos organismos poiquilotermos, la composición de ácidos grasos en *E. coli* cambia marcadamente con la temperatura a la cual son sintetizados: cuando baja la temperatura, la fracción de ácidos grasos insaturados se incrementa. El ajuste es una respuesta homeostática, ya que la función celular requiere de una membrana plasmática fluida pero a bajas temperaturas los lípidos de la membrana sufren un cambio reversible en su estado: forman un arreglo hexagonal de las cadenas de los ácidos grasos que pierde fluidez (Nishihara et al., 1976). Los fosfolípidos de una bacteria creciendo normalmente contienen 3 ácidos grasos: uno saturado, el ácido palmítico (hexadecanoico) y dos insaturados, palmitoleico (cis-9-hexadecanoico) y el ácido cis vaccínico (cis-11-octadecanoico). El ácido cis vaccínico es el que presenta un cambio mayor (ver tabla 1).

La fluidez de las membranas de *E. coli* se mantiene en un nivel óptimo a diferentes temperaturas porque la síntesis de ácido cis vaccínico se regula por temperatura y a nivel de actividad de la enzima que lo sintetiza (de Mendoza et al., 1983).

Fatty acid	Fatty acid composition (%) at temp (°C):							
	10	15	20	25	30	35	40	43
In lipopolysaccharide								
Myristate	3.9	3.8	4.1	3.8	4.1	4.7	6.1	7.7
β -Hydroxymyristate	12.6	12.5	10.4	6.9	10.1	11.0	4.8	7.5
In phospholipid								
Palmitate	18.2	21.9	25.4	27.6	28.9	31.7	37.1	48.0
Palmitoleate	26.0	25.3	24.4	23.2	23.3	23.3	28.0	9.7
Methylene hexadecanoate	1.3	1.1	1.5	3.1	3.4	4.8	3.2	11.6
cis-Vaccinate	37.9	35.4	34.2	35.5	30.3	24.6	20.8	12.2
Methylene octadecanoate	0	0	0	0	0	0	0	3.7

* Grown in mineral salts-glucose medium and harvested during exponential growth.

Tabla I. Efecto de la temperatura de crecimiento en la composición de ácidos grasos en *E. coli*. Datos tomados de Marr, A. G. et al., 1962.

COMPOSICION DE PROTEINAS.

Se ha reportado que la velocidad de recambio de proteínas se incrementa cuando células normales de *E. coli* se pasan de 30 a 42°C (Gottesman et al., 1977). La proteasa Lon está involucrada en la degradación de casi todos los polipéptidos de la bacteria y se ha identificado como una proteína inducible por calor (ver más adelante). Para una revisión completa, ver el trabajo de Lemaux, et al., 1978.

Algunos estudios detallados (Herendeen, et al., 1979) de electroforesis bidimensional de la composición de proteínas de *E. coli* B/r creciendo a varias temperaturas (13.5, 15, 23, 30, 42 y 46°C) indicaron que:

- Entre 23 y 37°C, las concentraciones de sólo dos proteínas de las 111 estudiadas, cambian más de 2.5 veces.

- Entre 13.5 y 46°C, sin embargo, 83 de las 133 proteínas estudiadas varían más de 2 veces, 18 varían más de 5 veces y 9 varían más de 10 veces. La concentración de algunas de estas proteínas se incrementa dramáticamente solo a temperatura alta y algunas otras cambian solo a temperaturas bajas.

Las concentraciones de 3 proteínas llamadas, por cierto, termómetro por los autores, varían constantemente según el rango de temperatura.

Aquellas proteínas cuya concentración intracelular se incrementa con el aumento de temperatura, son las pertenecientes a la respuesta calórica (ver más adelante). Aumentan de 10 a 50 veces cuando se eleva la temperatura y cuando las células se exponen a etanol (ver figura 9).

En la figura 10 puede observarse que estas proteínas confieren termorresistencia a la bacteria *Escherichia coli* (Yamamori et al., 1982). Cuando un cultivo se crece a 30°C y se pasa a 42°C durante 30 minutos, se provoca un aumento de 10 veces en el número de sobrevivientes cuando estas células se exponen después a 55°C durante 10 minutos. Sin embargo, la tolerancia al calor desaparece casi completamente cuando los cultivos se incuban por dos horas a 42°C.

La máxima temperatura de crecimiento se afecta claramente por la habilidad de la célula para sintetizar las proteínas de choque calórico, poseen un papel particularmente importante en permitir el crecimiento a temperaturas elevadas, y algunas lo tienen a todas las temperaturas.



Figura 9. A) Células en fase estacionaria que fueron crecidas a (1) 30°C, (2) 33°C, (3) 36°C, (4) 39°C, (5) 42°C se marcaron con un pulso de leucina radiactiva durante dos minutos.

B) Células crecidas hasta fase exponencial fueron incubadas de una temperatura baja a una temperatura alta y fueron marcadas a 30°C. Del (2) al (9) las células se transfirieron como sigue: (2) de 30° a 33°C, (3) de 33 a 36°C, (4) de 36 a 39°C, (5) de 39 a 42°C, (6) de 42 a 45°C, (7) de 30 a 42°C, (8) de 30 a 34°C y (9) de 36 a 42°C. Tomado de Yura, et al., 1980.

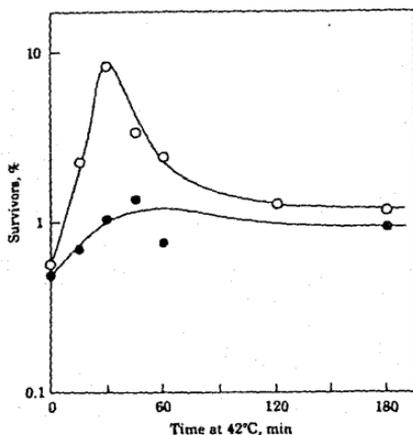


Figura 10. La síntesis de proteínas de "heat-shock" ayuda a que las células adquieran termorresistencia. Cultivos de *E. coli* fueron crecidos a 30°C y después transferidos a 42°C. Muestras de 0.3ml fueron tomadas a los tiempos indicados y una parte (0.1ml) se espatuló a 30°C, mientras que el resto (0.2ml) se calentó a 55°C durante 10 minutos y se espatuló también. Fueron contadas las sobrevivientes en la cepa silvestre O y en una cepa mutante en *rrpH* (K165) O. Yamamori y Yura, 1982.

RECEPTORES MEMBRANALES PARA CAMBIOS DE TEMPERATURA

Vale la pena hacer un paréntesis para señalar que E. coli responde a cambios en su medio ambiente modulando su patrón de movimiento: muchos estímulos químicos y físicos se detectan por receptores específicos los cuales transmiten la información hacia el interior de la célula generando señales que cambian el movimiento flagelar del organismo. La adaptación al estímulo se lleva a cabo por la metilación reversible de ciertos residuos en los receptores.

En el rango de 20° a 37°C, E. coli responde al aumento de temperatura "sintiendo" un estímulo atrayente y al decremento de la temperatura interpretando un estímulo repelente (Maeda et al., 1976). La máxima sensibilidad se observa en temperaturas cercanas a los 30°C y también la quimiotaxis tiene un óptimo a 30°C.

Un interesante descubrimiento se realizó en 1979, cuando se observó (Maeda et al., 1979) que la L-serina ó la L-leucina actúan como inhibidores competitivos de la termotaxis (ver fig.11). El postular la existencia de termoreceptores específicos abrió un gran campo en la investigación de la fisiología de E. coli en respuesta al calor.

Existen proteínas integrales de membrana, que no están involucradas en el transporte pero sí actúan como receptores para efectores quimiotácticos. No son proteínas acarreadoras de periplasma, su labor se extiende más que éstas porque después que fijan el compuesto son capaces de iniciar eventos a nivel citoplásmico que aún no están bien definidos y su propia metilación. Así, se les llama tanto receptores como transductores (Macnab, 1985).

Hay cuatro tipos bien caracterizados de este tipo: Tsr (por taxis to serine and repellents; también llamado MCP I), Tar (por taxis to aspartate and repellents; MCP II), Trg (por taxis to ribose and galactose; MCP III), y TapE (por taxis associated protein; MCP IV); un quinto, Tips (por taxis involved protein), está menos estudiado.

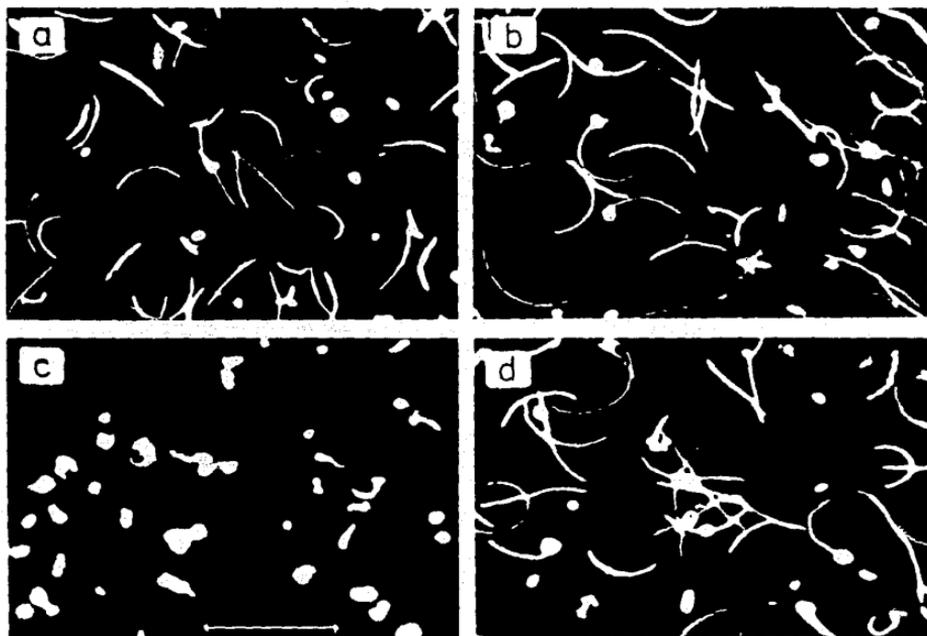


Figura 11. La temperatura tiene efectos en la quimiotaxis de *E. coli*. A) Células creciendo a 22°C. B) Células creciendo a 35°C. C) Células creciendo con leucina 30 mM a 22°C y D) Células a 35°C con 30 mM de leucina. Las bacterias fueron filmadas en un microscopio de campo oscuro. Tomado de Maeda et al., 1979.

Tienen un peso molecular similar (cerca de 60,000) y muestran una gran homología en el extremo carboxilo (Krikos et al., 1983); hay diferencias en el extremo amino. Por su estructura (ver figura 12) parece razonable tal arreglo: el extremo carboxilo tiene interacciones con componentes citoplásmicos como las enzimas metilantes. El extremo amino reconoce los quimioefectores con diferente especificidad. Los detalles de la estructura fueron establecidos gracias a un elegante trabajo construyendo fusiones entre los diferentes dominios de los receptores Tsr y Tar (Krikos et al., 1985).

El receptor que se ha involucrado en la recepción de los cambios de temperatura es Tsr (MCP1), que es el responsable de reconocer L-serina y L-leucina; la serina y el aspartato son dos de los principales quimioatrayentes de *E. coli*. También causa el cambio de temperatura (Maeda et al., 1979) y el cambio de pH, tanto externo como citoplásmico (Kihara et al., 1981).

Se demostró (Lee et al., 1983) que la capacidad de sentir cambios de temperatura no se afecta en mutantes que reducen o eliminan su afinidad por serina, lo que indica que la termosensibilidad mediada por Tsr no es un efecto secundario de las alteraciones en el sitio de unión a serina. Se propuso que la termosensibilidad de Tsr está mediada por un cambio conformacional inducible por temperatura en la molécula.

No se ha realizado un estudio profundo aún para observar el cambio producido en el receptor por la temperatura. De hecho, se sabe muy poco de su funcionamiento cuando recibe señales químicas. Se ha demostrado que en presencia de leucina o serina, se metila el extremo carboxilo en una reacción que es dependiente de S-adenosilmetionina (Stock, 1978) en residuos de glutámico y glutamina. La reacción de metilación está catalizada por Che R (metil transferasa) y la desmetilación por la Che B, que es una metil esterasa. En los ciclos de metilación la S-adenosilmetionina es el donador (Stock, 1978) y el metanol es el producto de la desmetilación (Toews et al., 1979).

Se ha demostrado que un complejo sistema que involucra los productos CheA, CheW, CheY y CheZ conecta los cambios de metilación con el movimiento flagelar y la atracción ó repulsión de la bacteria (figura 13). No se ha determinado si el estímulo

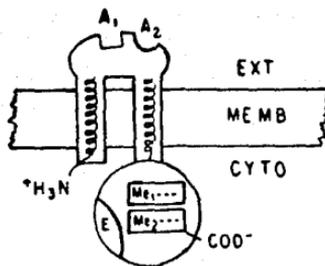


Figura 12. La organización de un receptor/transductor de membrana puede ser predicha por la secuencia de la proteína (ver texto).

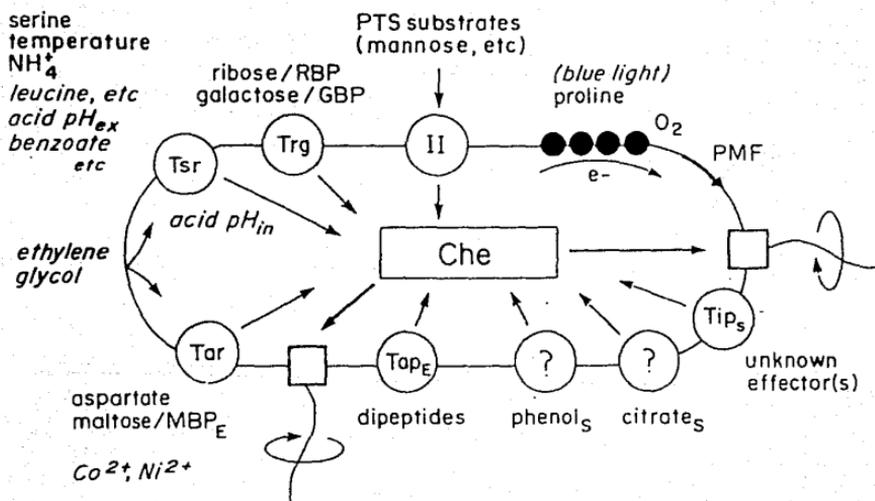


Figura 13. Existe un complejo sistema que regula la quimiotaxis y la termotaxis de *E. coli*. Los atrayentes están en letras romanas y los repelentes en *italicas*. Esta ilustración fue tomada de Macnab, 1985.

por temperatura provoca señales intracelulares diferentes. Asimismo, tampoco se ha explorado la posibilidad de que los receptores sean sensores de temperatura ó que los cambios observados sean consecuencia propia de su estructura, como en el caso de la homoserina-transuccinilasa (Ron, et al., 1971); mucho menos, su relación con la respuesta calórica, inducible a temperaturas mas altas y en un tiempo mucho mas corto.

No es necesario aclarar que el comportamiento celular en respuesta a cambios de temperatura es muy complejo y que entonces los intentos de describir inductores específicos de la respuesta calórica se enfrentan con un problema multifactorial.

LA RESPUESTA CALORICA EN E. coli A NIVEL MOLECULAR.

El descubrimiento de la respuesta en E. coli ayudó a hacer más evidente que hay una respuesta casi universal a un cambio en la temperatura, y que los elementos estaban conservados a través de los reinos procariota, eucariota y de arqueobacterias.

Como se esperaba, siendo un organismo donde es posible hacer experimentos más accesiblemente, E. coli ha contribuido a dar información sobre la generalidad de la respuesta calórica y también reveló una nueva manera de regular la transcripción en este organismo.

La descripción del fenómeno se hizo analizando una mutante que originalmente había sido aislada como una letal condicional sensible a temperatura (42°), en un fondo genético que contenía un supresor de un codón sin sentido (Cooper et al., 1975). Si principio se asumió que la mutante tenía defectuoso un gene esencial, pero por análisis en geles de doble dimensión se observó que había perdido la capacidad de inducir un set de proteínas después de un aumento en la temperatura (Neidhardt et al., 1981). A este conjunto de polipéptidos se le llamó HTP (por high temperature production) y pronto fueron reconocidos como las proteínas de "heat-shock" en E. coli, que estaban bajo el control de un solo gene, mutado en la cepa K16S.

Hasta ese entonces se sabía que en *E. coli* una manera eficiente de coordinar la síntesis de proteínas que son requeridas en rangos estequiométricos fijos, bajo cualquier condición ambiental, es poner sus genes en la misma unidad transcripcional (operón). Las células procariotas hacen uso extensivo de esta estrategia para producir proteínas que tienen una función relacionada, como aquellas envueltas en la síntesis de histidina y triptofano. Muchos de los genes de *E. coli* están organizados en operones consistentes de 2 a 8 cistrones individuales. Una gran parte del trabajo de los genetistas moleculares de las pasadas décadas ha sido dilucidar la variedad de vías en las cuales la actividad transcripcional de operones es modulada por la interacción de proteínas reguladoras específicas (activadores o represores), o por el proceso de atenuación en sitios de control (promotor-operador) cerca del inicio de cada operón.

El saber que moléculas individuales regulan operones individuales es sólo el primer paso en entender la regulación celular, y la existencia de sistemas más complejos fué sugerido por primera vez gracias a la observación de que los operones de utilización de azúcares era un grupo que respondía a la presencia de glucosa en el medio (Magasanik, 1962).

Si bien el sistema de represión catabólica fué el primer ejemplo de regulación coordinada de varios genes, el trabajo desarrollado en los siguientes años y el advenimiento de nuevas metodologías favoreció que se encontraran conjuntos de operones que respondían a una sola molécula reguladora. A tales circuitos se les llamó sistemas globales de regulación o simplemente regulones y la respuesta calórica pasó a formar parte importante de éstos ya que involucraba la inducción de por lo menos 17 genes por un solo modulador (ver tabla II).

Se encontró que la mutante K165 era complementada por algunos plásmidos del banco de Clark-Carbon (1975) que contenían fragmentos del minuto 76 del cromosoma de *E. coli*. Estos plásmidos reestablecían el crecimiento a 42°C y la inducción de las proteínas de choque calórico. Trabajo subsecuente llevó a la caracterización del gene *htpR* como un modulador positivo de la respuesta y a su producto, como un factor σ de la RNA polimerasa requerido para iniciar la transcripción de los genes de las proteínas HTP (Grossman, 1984; Landick, 1984).

Multigene system	Environmental stimulus	Regulatory gene(s)	Regulated genes
Nitrogen utilization	Ammonia limitation	<i>glnB, glnD, glnG, glnL</i>	<i>glnALG</i> plus others
Carbon utilization	Carbon/energy limitation	<i>cya, crp</i>	<i>gal, deo, ara, mal, dsd, tna, lac</i> , plus others
Phosphate utilization	Phosphate limitation	<i>phoB, phoM, phoR, phoU</i>	20+ genes
Stringent response	Amino acid/energy limitation	<i>relA, relB, relX, spoT, gpp</i> , plus others	Many
Heat shock response	Heat, certain toxic agents	<i>htpR (rpoH)</i>	17 genes
SOS response	UV and other DNA damagers	<i>recA, lexA</i>	17 genes
Adaptive response	Methylating agents	<i>ada</i>	3+ genes
Translation apparatus	Growth rate-supporting ability of medium	Many	200+ genes
Osmotic stress response	High osmolarity	<i>envZ, ompR, kdpD</i>	<i>ompF, ompC, kdpABC</i> plus others
Oxidative stress response	H ₂ O ₂ , other oxidants	<i>oxyR</i>	12+ genes
Anaerobic respiration	Presence of electron acceptors other than O ₂	<i>fnr (=nirA, =nirR)</i>	20+ genes
Anaerobic fermentation	Absence of electron acceptors	?	20-50 genes
Aerobic response	Addition of oxygen	?	20 (?) genes

Tabla II. Sistemas multigénicos en *E. coli*. Tomado de Neidhardt y Van Bogelen, 1985.

2.1. LAS PROTEINAS INDUCIDAS POR CALOR EN *E. coli*.

En la tabla III pueden observarse las proteínas que son inducidas por un aumento de temperatura (de 30°C a 42°C) en *Escherichia coli*.

Las 17 proteínas de "heat-shock" son distintas en tamaño, carga neta, abundancia dentro de la célula y son, desde luego, inducibles por calor en una vía dependiente del σ específico (σ_{32}), ver más adelante.

Se han caracterizado bioquímicamente más proteínas de choque térmico en *E. coli* que en cualquier otro organismo, aunque los detalles de su funcionamiento están tan confusos como en el caso de los eucariontes. Diez de estas proteínas han sido caracterizadas. Mencionaré algunas características de las proteínas más estudiadas. Los nombres abreviados se refieren a la posición de cada polipéptido en un gel de doble dimensión.

Proteínas B56.5 y C15.4. Son productos de los genes *groEL* (*gppA*) y *groES* (*gppB*), respectivamente. Estas dos proteínas interactúan funcionalmente. Mutantes en cualquiera de los dos genes son fenotípicamente idénticas y mutaciones en una pueden suprimir parcialmente mutaciones en la otra (Tilly, et al., 1982). Aunque no copurifican, se asocian in vitro en presencia de ATP. La proteína GroEL puede ser purificada como una partícula homopolimérica de 14 subunidades (Hendrix, 1979), que tiene una actividad débil de ATP'asa. Puede encontrarse asociada a los ribosomas y en alguna ocasión se le llamó proteína A.

Las dos proteínas GroE son esenciales en la morfogénesis de los fagos (Georgopoulos, 1978); el ensamble de la cola se bloquea en T5 y el ensamble de la cabeza se bloquea en T4 (Georgopoulos, 1972) y lambda (Georgopoulos, 1973), cuando los fagos son amplificadas en mutantes en *groEL* ó *groES*. En lambda, se une a la proteína lambda B, formando parte del puente cabeza-cola. Dentro de la célula no se conocen sus funciones.

Algunas mutantes son frágiles y tienen alterada su permeabilidad (Takano, et al., 1972), algunas otras tienen defectos en la división celular (Georgopoulos et al., 1974) y otras son termosensibles con defectos en la síntesis de DNA y RNA (Wada et al., 1984). Durante el crecimiento a 46°C, cerca del 15% de la proteína de una célula es el conjunto de éstos dos polipéptidos.

Tabla III. Las proteínas de "heat-shock" en *E. coli*. Tomado de Neidhardt y VanBogelen, 1985

Protein no.	Alphanumeric designation	Mol wt	Abundancia (α , 10^3)	Induction ratio	Gel location	Protein name(s)	Gene
1	B25.3	25,300	1.44	9.5	107 × 62	GrpE	<i>grpE</i>
2	B56.5	62,883	16.47	7.9	102 × 102	GroEL	<i>mopA (gruL)</i>
3	B66.0	69,121	14.09	13	104 × 108	DnaK	<i>dnaK</i>
4	B83.0	70,263	2-3	ND		Sigma	<i>rpoD</i>
5	C14.7	14,700	0.87	74	80 × 27		<i>htpE</i>
6	C15.4	10,670	2.61	19	79 × 30	GroES	<i>mopB (gruS)</i>
7	C62.5	71,000	2.61	26	87 × 107		<i>htpG</i>
8	D33.4	33,400	1.0-2.0	11	73 × 79		<i>htpH</i>
9	D48.5	48,500	1.0-2.0	ND	77 × 95		<i>htpI</i>
10	D60.5	60,500	0.18	10	78 × 105	Lysyl-tRNA synthetase form II	<i>lysU</i>
11	F10.1	10,100	<0.1	45	58 × 11		<i>htpK</i>
12	F21.5	21,500	<0.2	6.4	58 × 51		<i>htpL</i>
13	F84.1	84,100	<0.73	10	72 × 113		<i>htpM</i>
14	G13.5	13,500	<0.2	56	52 × 27		<i>htpN</i>
15	G21.0	21,000	<0.1	25	42 × 50		<i>htpO</i>
16	H94.0	94,000	1.61	12	31 × 115	Lon, La	<i>lon</i>
17	H26.5	40,975	<0.2	ND		DnaJ	<i>dnaJ</i>

Proteína B66.0. Es la segunda proteína de "heat-shock" más abundante (Georgopoulos, et al., 1982). Esta y su gene, dnaK, son probablemente los elementos más conservados en toda la escala filogenética. La proteína bacteriana es necesaria para la replicación del DNA de algunos fagos tanto *in vivo* como *in vitro* (Georgopoulos, et al., 1977), pero su función dentro de la célula se desconoce todavía. A temperaturas altas, mutantes en dnaK detienen la síntesis de RNA y de DNA (Itikawa et al., 1979). La proteína DnaK purificada muestra una actividad débil de ATPasa y es capaz de autofosforilación; además de tener una actividad de 5' nucleotidasa (Zylicz et al., 1983). La fosforilación ocurre en un residuo de treonina, el mismo aminoácido que es fosforilado en la proteína equivalente de Dyctostelium discoideum (Loomis, et al., 1982).

DnaK es un modulador de la respuesta calórica, siendo necesario para el retorno al equilibrio después de una incubación prolongada a 42°C (Tilly, et al., 1983). Y su inducción depende de la presencia de σ_{32} .

Proteína H26.5. Es el producto del gene dnaJ, que es parte del mismo operón que dnaK (Saito, et al., 1978). Se conoce poco acerca de esta proteína, es la única que se ha encontrado asociada con la membrana celular y su punto isoelectrico es el más básico de todas las proteínas HTP (Fariweather, et al., 1981). Parece ser esencial para el crecimiento de células no infectadas con fagos pero se ha observado que interacciona con DnaK en la replicación del DNA del bacteriófago lambda (Liberek et al., 1988), ver figura 14.

Proteína B83.0. Es el factor sigma de la RNA polimerasa, una proteína de 70 kd que programa a la enzima para que reconozca los promotores normales (Chamberlin, 1974). La subunidad tiene la misma función a 30 que a 42°C pero cabe preguntarse porqué se induce ésta (y no, por ejemplo, otras subunidades de la RNA polimerasa) cuando aumenta la temperatura. La síntesis de las proteínas de "heat-shock" está inversamente relacionada con la abundancia del factor sigma (Gross et al., 1984) y ha sido de gran importancia estudiar esta proteína, especialmente en relación a la competencia que puede presentar con el σ de "heat-shock" cuando se eleva la temperatura.

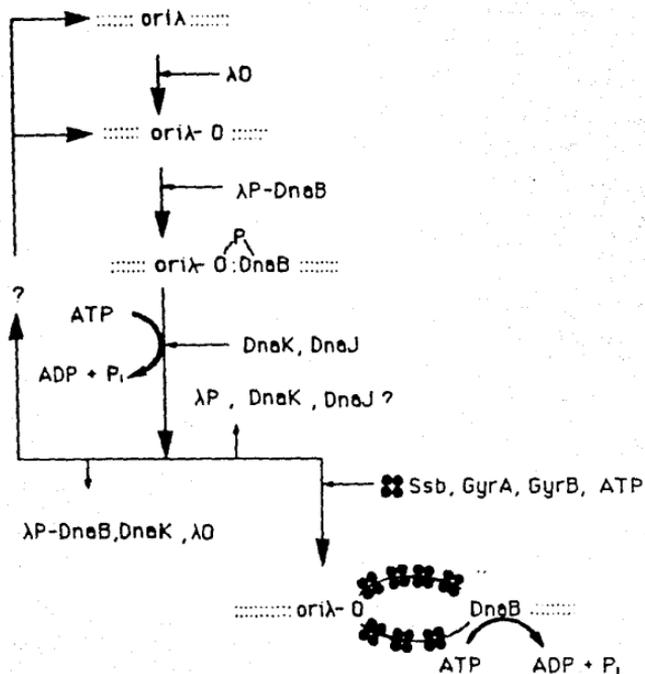


Figura 14. DnaK y DnaJ juegan un papel importante en la iniciación de la replicación del fago lambda. Este esquema muestra un modelo propuesto por Liberek et al, 1989. La proteína O se une específicamente al *ori lambda*. La proteína P, a través de su capacidad de interactuar con *lambda O* y DnaB, genera un complejo compuesto por *ori lambda - lambda*, *lambda O - lambda*, *lambda P-DnaB*. La actividad de helicasa de DnaB es suprimida por la proteína P en este complejo. Cuando se añade DnaK y DnaJ y hay hidrólisis de ATP, se libera P del complejo. La proteína DnaB, liberada de P, puede utilizar su capacidad de helicasa para desenrollar el DNA cerca del *ori lambda*. Esta reacción requiere ATP y es estimulada por Ssb y girasa.

La región desenrollada, protegida por Ssb, presumiblemente sirve como sustrato para un "primer" de RNA. La acción de DnaK y DnaJ puede liberar no solo *lambda P* sino *lambda O* y Dna B, una situación que puede crear una reacción de "feedback" por construir y destruir el complejo en *ori lambda*.

Proteína D60.5. Es el producto del gene lysU (Hirshfield et al., 1984); es una isoespecie de la lisil-tRNA-sintetasa, la única que se ha descrito en varias formas en E. coli. El gene lysU está silente en casi todas las condiciones de crecimiento pero algunas condiciones ambientales pueden inducirla (Hirshfield et al., 1984). Se piensa que la lisil tRNA sintetasa puede estar regulada por algunos derivados fosforilados de adenosina, algunos de los cuales pueden estar implicados como posibles señales de inducción para el regulón HTP.

Proteína H94.0 Es el producto del gene capR ó lon, (Goff, et al., 1984), la proteasa Lon (ó La), una enzima proteolítica dependiente de ATP que tiene una especificidad no bien reconocida todavía (Chung, 1981). Lon no es esencial para el crecimiento bacteriano en condiciones normales, pero la pérdida de Lon conlleva una multitud de defectos fenotípicos. Mutantes defectuosas en Lon presentan una respuesta SOS letal porque una de las proteínas SOS, Sula, es un inhibidor de la división celular que debe ser degradado para escapar del estado SOS (Mizusawa, et al., 1983). Estas mutantes acumulan gran cantidad de mucopolisacárido (Hua et al., 1972), y también in vivo, la estabilidad de varias proteínas reguladoras de fagos se altera, llevando a una deficiencia en lisogenización (Gottesman et al., 1981).

Proteína C62.5 . Se le conoce por la secuencia de nucleótidos de su gene, tiene 36% de homología con la proteína Hsp83 de D. melanogaster (referida por Neidhardt, 1985).

Proteína D48.5. Una mutante que aparentemente perdió la proteína D48.5 se aisló como resultado de la inserción del bacteriófago Mud1(lacZ), sólo se sabe que es esencial para el crecimiento a 46°C (referido por Neidhardt, 1985).

Proteínas C14.7, D33.4, F10.1, F21.5, F84.1, G13.5, y G21.0. Lo único que se conoce de estas proteínas es su tamaño y su carga aproximada, (ver tabla III).

2.2 REGULACION DE LA RESPUESTA CALORICA EN *E. coli*.

Toda la respuesta "heat-shock" en *E. coli* está regulada positivamente por un factor sigma de la RNA polimerasa con un peso aproximado de 32 kd. Es el producto del gene σ^{32} ($htrR$) localizado en el minuto 76 del cromosoma de la bacteria. Aparentemente, el control negativo de la respuesta depende de la proteína DnaK (Tilly, et al., 1985).

Este sigma le confiere especificidad a la enzima para reconocer un tipo especial de promotores, que se encuentran delante de cada uno de los genes inducibles por calor, ver tabla IV.

Como en el caso de los eucariontes, existen varios inductores del sistema HTP y no es muy obvio el nivel al cual actúa cada uno. Sin embargo, es claro que, previo a cualquier aumento de proteínas de choque térmico, hay un incremento del σ^{32} activo dentro de la célula.

En general, entre los inductores se incluyen algunos compuestos que producen estrés en eucariontes, pero algunos muy efectivos en éstos no inducen la respuesta en la bacteria. Un aumento en la temperatura es el inductor más potente y es el único agente que puede inducir la respuesta bajo condiciones que afecten mínimamente el crecimiento celular. El agente químico que mejor induce la respuesta con sus 17 polipéptidos es el etanol. En la tabla V pueden verse otros inductores de la respuesta.

Los blancos inmediatos para éstos inductores no se conocen con certeza, pero los candidatos incluyen al DNA y su maquinaria de replicación, la estructura de las proteínas y el aparato traduccional, la membrana plasmática, etc. Algunos agentes, como calor y etanol deben afectar la estructura de las proteínas, ácidos nucleicos y membranas, mientras otros como ácido nalidixico parecen no tener un efecto especial inmediato.

Viéndolos juntos, la lista de inductores genera la interrogante de conocer si es que hay múltiples blancos efectivos para la respuesta, o si son solo parte de una cascada secuencial de eventos, en la figura 15 se observan diferentes modelos propuestos para explicar la inducibilidad de éste regulón.

Promoter	<u>-35 region</u>		<u>-10 region</u>	<u>+1</u>
<u>groE</u>	<u>ITTCCCCCTTGAA</u>	GGGGCGAAGCCTCAT	<u>CCCCATTTICTCTGGTCAC</u>	
<u>dnaK P1</u>	<u>ICTCCCCCTTGAT</u>	GACGTGGTTTACGA	<u>CCCCATTTAGTAG</u>	TCAA
<u>dnaK P2</u>	<u>ITGGGCAGTTGAA</u>	ACCAGACGTTTCG	<u>CCCCTATTACAGACTCAC</u>	
C62.5 gene P1	<u>GCTTCGCTTGAA</u>	ATTATTCTCCCTTGT	<u>CCCCATCTCTCCACATC</u>	
<u>rpoD PHS</u>	<u>IGCCACCCTTGAA</u>	AAACTGTGATGTGG	<u>GACGATAIAGCAG</u>	ATAA
<u>lon</u>	<u>ICTGGGCGTTGAA</u>	TGTGGGGGAAACAT	<u>CCCCATTAIACTGACGTAC</u>	
σ^{32} consensus	T IC CccTTGAA	13-15 bp	CCCCAT Ta	

Tabla IV. La secuencia consenso para los promotores de σ^{32} . Tomado de Gross, 1987.

Tabla V. Agentes que inducen la respuesta calórica en *E. coli* y *S. Typhimurium*. Neidhardt y VanBogelen, 1985.

Inducing agent(s) ^a	Reference(s)	Effect(s) on cell structures or functions
Shift from 28 to 42°C	83	Growth rate doubling (83); transient inhibition of cell division (26, 104, 124); general transient alteration of gene expression (71); increase in ppGpp accumulation (33)
Shift from 28 to 50°C	125a	Single- and double-stranded breaks in DNA (114, 132); inactivation of many enzymes and macromolecular synthesis (91, 122); damage to cytoplasmic membrane (98, 99); degradation of ribosomes and rRNA (121); unfolding of nucleoid followed by aggregation to it of much cell protein (94)
Ethanol	123, 125a	Mistranslation (44, 106); disruption of transmembrane transport (63) and translocation (53); increase in ppGpp accumulation (70)
Puromycin	43, 125a	Premature chain termination and release of peptidyl puromycin from ribosomes (105)
Viral infection	27, 66	Inhibition of host RNA, DNA, and protein synthesis (17, 20); decreased accumulation of cyclic AMP (20, 21); increase in ppGpp accumulation (21)
Nalidixic acid	67, 125a	Inhibition of DNA gyrase activity, thus blocking of replication (for a review, see reference 28)
Methylating and alkylating agents	72	Inactivation through modification of nucleic acids and proteins in general
Cadmium chloride	125a	Single-strand breaks in DNA (78); inactivation of proteins (125)
Hydrogen peroxide	14, 125a	Depletion of cellular glutathione (107); direct damage to DNA (25); general inactivation of proteins
ACDQ ^b	79, 125a	Inhibition of leucyl-tRNA synthetase (131)
Amino acid restriction	51, 125a	Increased accumulation of ppGpp and decreased synthesis of stable RNA and protein (for a review, see reference 32)

^a The agents are listed roughly in order of effectiveness as inducer.

^b ACDQ, 6-Amino-7-chloro-5,8-dioxoquinoline.

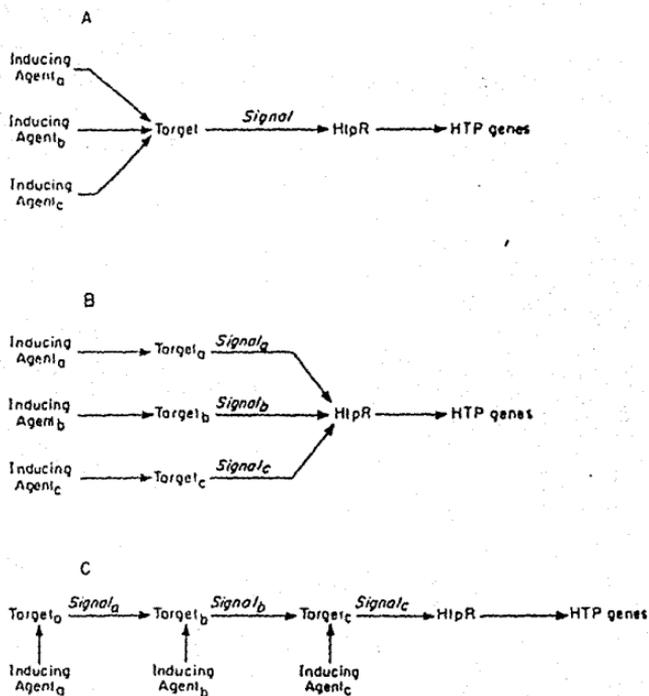


Figura 15. Modelos para la inducción de la respuesta al calor tanto en *E. coli* como en *S. Typhimurium*. Tomado de Neidhardt y Van Bogelen, 1985.

2.2.1. ESTRUCTURA DEL GENE *ppcH*

Tomando en cuenta que, sin importar el inductor, para que se lleve a cabo la respuesta calórica debe haber un aumento del σ^{32} activo dentro de la célula, el interés de muchos investigadores del área se concentró en averiguar la regulación de la expresión del sigma regulador de la respuesta, considerando al gene *ppcH* el blanco probable de todos los inductores, ya fuera directa o indirectamente.

La secuencia de nucleótidos de éste gene se tiene desde 1984 (Landick, et al., 1984). La región codificante de 284 aminoácidos está flanqueada por zonas de regulación muy interesantes, ver la figura 16. Doce pares de bases hacia el 5' del ATG que se supone como inicio de la traducción se encuentra la secuencia GGAGG; un buen sitio de unión a ribosomas, según el criterio de Shine-Dalgarno (1974).

Hay por lo menos 7 secuencias parecidas a promotores en los 200 pb que preceden al gene. Las regiones de -35 para éstos posibles promotores comienzan en 187, 150, 136, 127, 122, 116 y 45pb antes del ATG y tienen espaciadores entre -35 y -10 de 19, 17, 21, 18, 18, 17, y 16 pares de bases respectivamente. Los promotores son consenso para el sigma normal, σ^{70} . No se ha observado que el propio σ^{32} transcriba al gene *ppcH* en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Gross et al., 1986).

La secuencia de -58 a -24 contiene una región de simetría bilateral que si es transcrita, puede producir una estructura de tallo-asa con una estabilidad probable de -15.6 kcal/mol. Además, los nucleótidos de -69 a -62 constituyen una secuencia *boxA* (consenso: C/TGCTCTTCT/A). Esta secuencia ha sido implicada en la actividad de N como antiterminador de lambda (Friedman y Gottesman, 1983); y puede ser un sitio de unión para NusA. Esta secuencia se encuentra justamente arriba de los genes de lambda *nutL*, *nutR*, *nut* y las regiones *21nutR*, y *P22nutL*, el terminador del gene *trp* y la región líder de *trnB*; las cuales son sitios de terminación dependientes de Nus A. La secuencia "boxA" precede usualmente a la estructura de tallo-asa de RNA en un arreglo similar al observado en *ppcH*.

CCCCCGTGTCTCGTTCCCGGTATTTTCATCTCTATGTGCACATTTTGTGCGTAATTTATTCACAAGCTTGCATGA

ACTTCTGGATAAAATCACGGTCTGATAAAAACAGTGAATGATAACCTCGTTCCTCTTAAGCTCTGGCACAGTCTTCTGCTA
 box A hairpin

1

CCACTCAACCCGCCAAGATATCGATTGGGAGGATTTGG ATG GCT GAC AAA ATG CAA AGT TTG GCT TTG
 S.D. Met Ala Asp Lys Met Gln Ser Leu Ala Leu

BCC CCA GTT GGA GGC CTA GAT TCC TAC ATC CGG GCA GCT AAC GCG TGG CCG ATG TTG TCG
 Ala Pro Val Gly Gly Leu Asp Ser Tyr Ile Arg Ala Ala Asn Ala Trp Pro Met Leu Ser

BCT GAC GAG GAG CGG GCG CTG GCT GAA AAG CTG CAT TAC CAT GGC GAT CTG GAA GCA
 Ala Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ala Glu Lys Leu His Tyr His Gly Asp Leu Glu Ala Ala

AAA ACG CTG ATC CTC TCT CAC CTG CGG TTT GTT GTT CAT ATT GCT CGT AAT TAT GCG GCG
 Lys Thr Leu Ile Leu Ser His Leu Arg Phe Val Val His Ile Ala Arg Asn Tyr Ala Gly

TAT GCG CTG CCA CAG GCG GAT TTG ATT CAG GAA GGT AAC ATC GGC CTG ATG AAA GCA CTG
 Tyr Gly Leu Pro Gln Ala Asp Leu Ile Gln Glu Gly Asn Ile Gly Leu Met Lys Ala Val

CCG CGT TTC AAC CCG GAA GTG GGT GTG CGC CTG CTC TCC TTC GCC GTT CAC TGG ATC AAA
 Arg Arg Phe Asn Pro Glu Val Gly Val Arg Leu Val Ser Phe Ala Val His Trp Ile Lys

GCA GAG ATC CAC GAA TAC GTT CTG CGT AAC TGG CGT ATC GTC AAA GTT GCG ACC ACC AAA
 Ala Glu Ile His Glu Tyr Val Leu Arg Asn Trp Arg Ile Val Lys Val Ala The Thr Lys

GCG CAG CGC AAA CTG TTC AAC CTG CGT AAA ACC AAG CAG CGT CTG GCG TGG TTT AAC
 Ala Gln Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu Arg Lys Thr Lys Gln Arg Leu Gly Trp Phe Asn

CAS GAT GAA GTC GAA ATG GTG GCC CGT GAA CTG GCC GTA ACC AGC AAA GAC GTA CGT GAG
 Lys Asp Glu Val Glu Met Val Ala Arg Glu Leu Gly Val Thr Ser Lys Asp Val Arg Glu

ATG GAA TCA CGT ATG GCG GCA CAG GAC ATG ACC TTT GAC CTG TCT TCC GAC GAC GAT TCC
 Met Glu Ser Arg Met Ala Ala Gln Asp Met Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Asp Asp Ser

GAC AGC CAG CCG ATG GCT CCG GTG CTC TAT CTG CAG GAT AAA TCA TCT AAC TTT GCC GAC
 Asp Ser Gln Pro Met Ala Pro Val Leu Tyr Leu Gln Asp Lys Ser Ser Asn Phe Ala Asp

GCG ATT GAA GAT GAT AAC TGG GAA GAG CAG GCG GCA AAC CGT CTG ACC GAC GCG ATG CAG
 Gly Ile Glu Asp Asp Asn Trp Glu Glu Gln Ala Ala Asn Arg Leu Thr Asp Ala Met Gln

GGT CTG GAC GAA CGC AGC CAG GAC ATC ATC CGT GCG CGC TGG CTG GAC GAA GAC AAC AAG
 Gly Leu Asp Glu Arg Ser Gln Asp Ile Ile Arg Ala Arg Trp Leu Asp Glu Asp Asn Lys

TCC ACG TTG CAG GAA CTG GCT GAC CGT TAC GCC GTT TCC GCT GAG CGT GTA CGC CAG CTG
 Ser Thr Leu Gln Glu Leu Ala Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ala Glu Arg Val Arg Gln Leu

GAA AAG AAC GCG ATG AAA AAA TTG CGT GCT GCC ATT GAA GCG TAA TTTCGGCTATTATGCGAGAG
 Glu Lys Asn Ala Met Lys Lys Leu Arg Ala Ala Ile Glu Ala END box A

AACCCTAGATGAGAGTCCGGGGTCTTTGTGTTTTTGGCCCTGTGTAATAATCAATTTCCCGCTCGGCAAAAGCCCAATCC
 termination 1032

CCACGGCAGATGTTAATAAATCTGCAAAAATAGTATTCCAAATATCATAAAAATCGGGATATGTTTATGACAGAGTATGCT

-35*

-10*

liivj

Figura 16. Secuencia de nucleótidos del gene ppdH en E. coli. Tomado de Landick et al, 1984.

La iniciación de la transcripción en 6 de los 7 probables promotores puede producir un líder de RNA que puede incluir en su secuencia a la "boxA" y a la horquilla. No se sabe si éstas estructuras son importantes en el control de la expresión del gene.

Una segunda secuencia "boxA" aparece cuatro nucleótidos después del codón de término (TAA) al final del gene. Esta seguido de una secuencia que se parece a una señal tradicional de término de la transcripción: una zona de G-C con una estabilidad de -16.7 kcal/mol seguido de 6 bases A-T. La terminación de la transcripción por la RNA polimerasa en este sitio fué probado en un sistema *in vitro* (Landick et al., 1984).

Aproximadamente 80 nucleótidos de éste sitio de terminación está la región de -35 del promotor para *liyJ*, el gene para una proteína que une leucina, isoleucina y valina; es un componente periplásmico del sistema de alta afinidad de transporte de aminoácidos en *E. coli* (Oxender et al., 1984).

$\sigma 32$ tiene una enorme similitud con $\sigma 70$, el gene para el sigma normal, hay un 43% de homología entre identidades y sustituciones conservativas, entre los 284 residuos de RpoH y el extremo carboxi terminal del $\sigma 70$. Además, hay similitudes en cuanto a distribución de cargas eléctricas y estructura secundaria (Landick, 1984). Cerca del carboxi terminal de RpoH hay dos regiones muy similares a las consenso (Sauer et al., 1982) de contacto proteína-DNA conocidos en proteínas de fago y de bacteria.

Cuando se induce la respuesta calórica, se establece una competencia entre el $\sigma 70$ y el $\sigma 32$ por el "core" de la RNA polimerasa, lo que ocasiona que se incremente la transcripción de los genes de una forma dependiente de la concentración de éstos factores en el interior de la célula. Las concentraciones efectivas de éstas subunidades se verán afectadas si se altera la síntesis de novo o la vida media de cada σ . De esta forma, se puede elaborar un esquema (ver figura 17) donde se contemple que se puede regular la expresión de lo genes HTP a nivel transcripcional modulando la cantidad de cada una de las subunidades sigma.

Es claro que la región reguladora del gene tiene una complejidad muy grande. Conocer cómo distintos inductores son responsables de la regulación del aumento en $\sigma 32$ es una de las preguntas más importantes del campo.

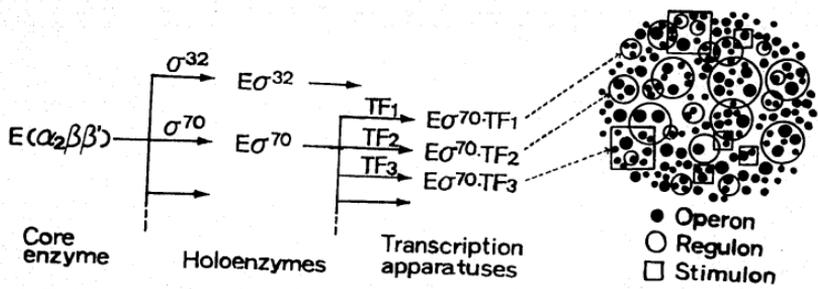


Figura 17. La expresión de los genes de *E. coli* puede regularse modulando las concentraciones de cada subunidad sigma, lo que ocasionará que solamente algunas secuencias del genoma sean transcritas en presencia de cierto estímulo. A la fecha, existen 5 sigmas descritas en este microorganismo.

A N T E C E D E N T E S

Cuando se comenzó el presente estudio, no estaba claro si el aumento en σ_{32} como respuesta a un cambio de temperatura era producido por alguno de los siguientes niveles de regulación:

- Aumento generalizado de la transcripción de rpoH.
- Activación del σ_{32} pre-existente.
- Transcripción diferencial del gene.
- Traducción diferencial de los mensajeros.
- Aumento en la vida media de la proteína σ_{32} .
- Alguna combinación de eventos pre y postraduccionales.

Se decidió averiguar si la inducción de la respuesta "heat-shock" involucraba un aumento de la transcripción de rpoH y si ésto era cierto, indagar si se debía a una expresión diferencial de los promotores del gene; experimentos de tipo Northern (hibridación RNA-DNA) podían ayudarnos a resolver las preguntas.

Detectamos por "Northern" que del gene rpoH eran sintetizados cuatro mensajeros, uno de los cuales era inducible específicamente a los 10 minutos de exposición a 42°C. Cuando nos disponíamos a realizar un análisis fino de los sitios de inicio por medio de un mapeo por S1, fué publicado este estudio por Erickson y cols. En efecto, del gene rpoH son sintetizados cuatro mensajeros distintos y el proveniente del promotor 3 es específico de alta temperatura, los demás son aparentemente constitutivos, aunque se detectaban ciertos incrementos a 42°C, ver la figura 18.

El trabajo publicado en el primer número de la revista Genes and Development no presentaba resultados con ningún otro inductor que no fuera el aumento de temperatura. Intentar un mapeo con otros inductores parecía ser poco práctico, ya que era factible que Erickson y cols. fueran adelante de nosotros.

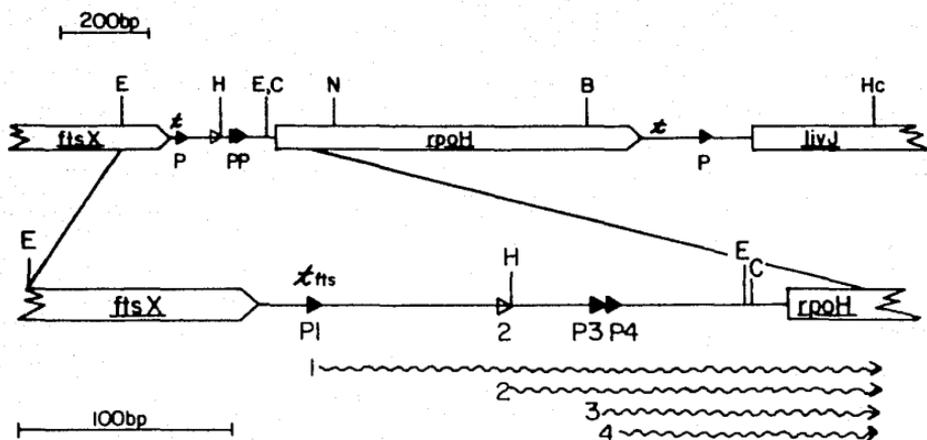


Figura 18. Han sido descritos cuatro promotores funcionales del gene *rpoH*. Aquí se muestra un diagrama de la unidad transcripcional del gene. Tomado de Erickson et al en 1987.

Gross, a finales de 1987 reportó que, cuando la temperatura sufre un cambio de 30 a 42°C, el aumento en la cantidad de sigma 32 tiene un máximo a los 7 minutos después del choque térmico. Fue medido por medio de anticuerpos específicos contra la proteína. Midiendo la vida media del $\sigma 32$ era claro que a 30°C el polipéptido era degradado a gran velocidad (vida media de 30 segundos), pero a 42°C, adquiría una gran estabilidad (vida media de 5 minutos). El incremento en la vida media del $\sigma 32$ era tan dramático que pasaba de 50 a 3,000 moléculas por célula (ver fig 19).

Desde entonces, la idea de una inducción directa de la respuesta por una activación de la propia proteína se ha vuelto muy atractiva pero difícil de probar. Por otro lado, la naturaleza de la inducción ó activación de la proteína podía depender del inductor utilizado.

Para tratar de profundizar en el estudio de la regulación de la expresión del gene rpoH y, por tanto, del regulón HTP, y tomando en cuenta que la medición de mensajeros es una técnica que no permite medir directamente la cantidad de proteína funcional dentro de la célula, se encaminó el trabajo hacia la construcción de fusiones del gene rpoH con el gene lacZ en plásmidos multicopia que permitieran, por medio de una fusión con actividad enzimática, medir la inducibilidad del regulón bajo diferentes condiciones e inferir en la naturaleza de la inducción de este sistema global. En esta tesis se describe la construcción y caracterización de las herramientas genéticas que nos permitirán abordar problemas como la inducibilidad diferencial del regulón HTP y las moléculas que intervienen en la transducción de la señal, desde el estímulo (calor) hasta la síntesis de las proteínas de choque calórico.

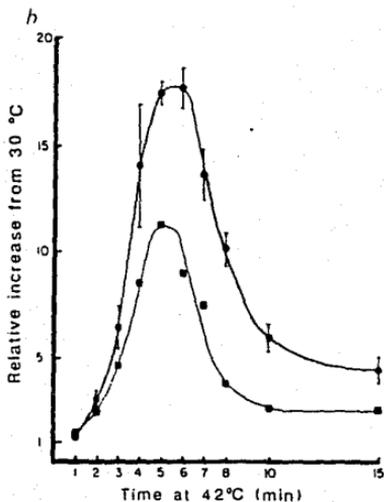


Figura 19. Las cuantificaciones por "Western" (reconocimiento por anticuerpos), de las concentraciones de DnaK y de σ^{32} muestran que en *E. coli* sufren un aumento en respuesta a un cambio de temperatura. Hay que hacer notar la magnitud del incremento y el tiempo donde se observa. Tomado de Gross, 1987.

O B J E T I V O

Obtener, caracterizar y utilizar fusiones del gene rpoH con el gene lacZ para facilitar el estudio de los diferentes parámetros de inducibilidad de la respuesta calórica.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas utilizadas en el presente trabajo se encuentran detalladas en la tabla VI.

T A B L A VI

C E F A	DESCRIPCION	FUENTE O REFERENCIA
MX614	galE, ilv, pro, thy	Colección del laboratororio
MX881	igual a MX614 pero recA	Colección del lab.
MX1230	MX614 pero asd	Colección del lab.
KY1429	araD, lac, thy, rpoH	Yura, 1984
MX1231	MX614 pero rpoH6	Colección del lab.
MX971	MX614 pero argG	Colección del lab.
CAG12153	Tn10 en el minuto 70	Gross, 1989
MX1088	MX971 pero Tn10 en el min. 70	Esta tesis
MX1301	MX1231 pero argG y Tn10 en el minuto 70.	Esta tesis
KL708	F'argG, rpoH	Low, 1972
JM103	(lac-pro), thi, strA, supE, endA, sbcB, hsdR, F' traD36, proAB, lacIa z M15.	Messing, 1981
MC1061	lac-pro	Casadaban, 1983

Los plásmidos utilizados se encuentran descritos en la tabla VIII.

T A B L A V I I I

PLASMIDO	DESCRIPCION	FUENTE O REFERENCIA
pKV3	pBR322 <u>ropH</u> , Amp ^r	Yura, 1984
pMC1871	pBR322 <u>lacZ</u> , Amp ^r	Casadaban, 1983
pMC1403	pBR322 <u>lacZYA</u> , Amp ^r	Casadaban, 1983
pTZ 18R	pUC 18, ori M13, Amp ^r	Pharmacia Lab.
pCG27	pKV3 <u>ropH::lacZ</u> , Amp ^r	Esta tesis
pCG29	pMC1403 <u>ropH::lacZ</u> , Amp ^r	Esta tesis
pCG28	mutación espontánea del pCG29 a una actividad baja de β -gal	Esta tesis
pRPOH1	pTZ 18R <u>ropH</u> , Amp ^r	Esta tesis
pRPOH2	pTZ 18R <u>ropH₆</u> , Amp ^r	Esta tesis

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias fueron:

Medio LB (por litro)

10g NaCl
10g Peptona
5g Extracto de levadura

Cuando se requiera un medio sólido se añadan 16g/l de agar.

Medio mínimo N05 (por litro)

Fosfato de potasio monobásico 13.6g
Sulfato de potasio 2.61g
Sulfato de magnesio 0.2g
Cloruro de calcio 0.01g
Sulfato ferroso 0.0005g
Glucosa 2g
Amonio 0.8g

Ajustar el pH a 7.4 con KOH

Medio LCTG (por litro)

10g de bactetriptona
10g de NaCl
5g de extracto de levadura
10ml de timina 2%
10ml de glucosa 20%
10ml de cloruro de calcio 0.25 M
12g de agar

Medio LC (agar suave)

Medio luria (LB)
8g de agar (por litro)
Cloruro de calcio 0.002 M

Cuando se utilizaron antibióticos fue a las siguientes concentraciones: ampicilina (amp) 250 ug/ml; kanamicina (kan) 50 ug/ml; tetraciclina (tet) 25 ug/ml.

Cuando las bacterias se concentraban para medir actividad enzimática, se hacía en medio mínimo (N05), pero sin fuente de nitrógeno ni de carbono, únicamente las sales (medio NN).

Las técnicas utilizadas que serán descritas en esta sección forman parte de la metodología clásica de la genética y también parte de la biología molecular reciente. Aunque están descritas en manuales que serán citados en su oportunidad, algunas tienen modificaciones que se han implementado en el laboratorio y que han probado su eficiencia durante ya mucho tiempo.

PROPAGACION DE P1 VIR A

1. Crecer un pre-cultivo de la cepa donde se desea propagar el fago P1 en medio rico (LB) de preferencia.

2. Inocular 1:50 en 10 ml de LB y dejar que crezcan hasta 50 unidades klett.

3. A un tubo con 3ml de agar suave a 45°C agregar 0.5ml de cultivo y 0.1 ml de P1 vir A diluido a 10 000 000 pfu/ml.

4. Agitar y vaciar sobre placas de LCTG, esperar a que solidifique e incubar de 8 a 12 horas.

5. El control se realiza añadiendo a 3ml de agar suave a 45°C 0.5ml del cultivo, agitando y vaciando en una caja con LCTG. Se incuba también de 8 a 12 horas.

6. Después de incubar, se agregan 3 ml de LB a cada placa y se recoge junto con el agar suave.

7. Agregar cloroformo 1:20, agitar vigorosamente en vortex y centrifugar a 3 000 rpm durante 10 min.

8. Añadir cloroformo nuevamente, centrifugar y titular sobre una cepa receptora (AB1157).

TRANSDUCCION

1. Crecer un precultivo de la cepa receptora en medio rico (LB).
2. Inocular 1:50 en 10 ml de medio nuevo y dejar crecer hasta 40 u. k.
3. Centrifugar y resuspender el paquete celular en 1/10 de medio rico.
4. En dos tubos mezclar:

Control:	0.5ml de bacterias
	0.5ml de Ca-Mg (ver más adelante)
	0.5ml de LB
Transducción:	0.5ml de bacterias
	0.5ml de Ca-Mg
	0.5ml de LB con el bacteriófago diluido a una multiplicidad de 0.05.
5. Incubar 20 minutos a 37°C sin agitación.
6. Centrifugar a 5 000 rpm por diez minutos y lavar dos veces con el mismo volumen (1.5 ml) de NN.
7. Resuspender la pastilla celular en 0.2ml de NN y espatular sobre medio de selección.
8. Incubar a la temperatura que se requiera.

CONJUGACION INTERRUPTIDA A UN SOLO INTERVALO

1. Crecer un precultivo tanto de la cepa donadora como de la receptora.
2. Inocular 10 ml de medio LB nuevo (1:50).
3. Incubar con agitación hasta alcanzar 40 u. k.
4. En el tubo de la conjugación, mezclar 0.5ml de la cepa donadora con 4.5ml de la cepa receptora.

5. Los controles son:

donadora: 0.5ml de bacterias + 4.5ml de LB
receptora: 4.5ml de bacterias + 0.5ml de LB

6. Agitar suavemente e incubar a 37°C durante 1 hora sin agitación.

7. Centrifugar a 5 000 rpm durante 10 minutos y lavar la pastilla dos veces con NN.

8. Resuspender la pastilla en 5 ml de NN y espatular en medio selectivo algunas diluciones de la conjugación.

F U S I O N E S C O N β - G A L A C T O S I D A S A

Existen en la actualidad muchos métodos para fusionar el operón lac o únicamente el gene lacZ a prácticamente cualquier gene de E. coli. La fusión confiere el fenotipo Lac+ con casi todos los genes, operones o regulones donde se haya llevado a cabo la inserción, y entonces se puede utilizar la facilidad de detectar y cuantificar la actividad enzimática para un análisis genético detallado.

En los últimos años, las fusiones lac han sido utilizadas para estudiar una gran variedad de fenómenos biológicos. Ha sido ampliamente demostrado que éstas fusiones pueden ser empleadas para estudiar tanto la regulación transcripcional como traduccional (Bassford, et al., 1978; Weinstock et al., 1983; Baker et al., 1984). Las fusiones lac se han usado para identificar genes cuya expresión se incrementa en presencia de ciertos substratos, agentes físicos como radiación ultravioleta o varios tipos de estrés (Kenyon et al., 1981; Strauch et al., 1984). Las fusiones ofrecen un mecanismo para clonar genes reguladores y para aislar y caracterizar mutaciones que alteren los componentes regulatorios o sitios que actúan en cis.

Muchas fusiones aisladas in vivo contienen un profago lambda integrado en el cromosoma, adyacente a la fusión. Fagos transductantes que llevan la fusión y genes cercanos se pueden aislar sencillamente. Tales fagos pueden ser usados para mapeo de la estructura fina de la región y para determinar la dirección de la transcripción del gene al cual se ha fusionado lac.

Se han desarrollado técnicas para subclonar fusiones de los fagos transductantes en vectores plasmídicos multicopia, los que dan suficiente cantidad de proteína fusionada como para un análisis físico o secuenciación de DNA. Se pueden usar segmentos de las fusiones para hibridar contra una biblioteca de DNA recombinante e identificar clonas. De ésta forma, se pueden purificar genes cuya función se desconoce todavía.

Ciertas fusiones resultan en la formación de un gene híbrido que codifica para una proteína compuesta por el extremo amino terminal del gene blanco y una porción carboxi terminal de β -galactosidasa, la cual es perfectamente funcional. Tales fusiones permiten marcar proteínas covalentemente con una actividad enzimática fácil de medir.

Usando la nueva actividad enzimática, se puede purificar la proteína sin ninguna dificultad. Anticuerpos contra la proteína híbrida pueden reaccionar con secuencias derivadas del gene al cual se fusionó lac, así se puede identificar y purificar el producto génico.

Además, las fusiones que resultan en la producción de una proteína híbrida, retienen propiedades características del producto génico intacto y pueden ocasionar un fenotipo nuevo. Estos fenotipos han sido usados en estudiar problemas como las interacciones proteína-proteína (Muller-Hill et al., 1976; Shuman y Silhavy, 1981) y mecanismos por los cuales se exportan las proteínas del citoplasma. Para un excelente recuento de lo que es posible realizar con fusiones genéticas, ver el libro de Silhavy et al., publicado en 1984.

El operón *lac* de *Escherichia coli* es un conjunto de genes localizado en el minuto 8 del mapa genético. Los productos de éstos genes se requieren para que la célula utilice el disacárido lactosa como fuente de carbono (glucosa [β -1-4] galactosa). La producción de las enzimas del operón *lac* en una cepa silvestre se induce por la presencia de lactosa en el medio. El orden de los genes en el operón es *lac* *IPQZYA* y sólo los productos de *lacZ* (β -galactosidasa) y *lacY* (permeasa para lactosa), se requieren para el crecimiento en lactosa. El último gene del operón, *lacA*, codifica para una transacetilasa que tiene un papel en la detoxificación de ciertos galactósidos (ver figura 20).

Los genes *lacZYA* son los más utilizados en ingeniería genética para la construcción de fusiones. En particular, el gene *lacZ* codifica para una proteína tetramérica cuyo gene puede dividirse y ser clonado en distintos vectores o sitios del cromosoma. Sin importar dónde estén los fragmentos expresados, las subunidades sintetizadas se unen para dar la proteína con actividad enzimática. El fenómeno de alfa complementación es precisamente la restitución de la actividad catalítica a la β -galactosidasa sintetizando un pequeño péptido (el péptido alfa). El sistema de alfa complementación es muy utilizado en estrategias que involucran clonación dirigida y secuenciación de DNA (ver figura 21).

DETECCION DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN CAJAS DE PETRI

Existen varios medios selectivos para detectar la expresión de β -galactosidasa. El indicador más sensible para β -gal en medio sólido es el sustrato cromogénico 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil- β -D-galactósido (Xgal; Horwitz et al., 1964). El componente no da ningún color hasta que es hidrolizado, dando un precipitado color azul indigo en la colonia que expresa la actividad enzimática.

En agar conteniendo Xgal, una bacteria que expresa la β -galactosidasa forma colonias azules, los fagos LacZ⁺ forman placas azules y gotitas de la enzima dan manchas azules. El Xgal se puede usar prácticamente en cualquier medio sólido. Usualmente el compuesto se disuelve en N-N dimetil-formamida a una concentración de 20 mg/ml y se espatula 0.1 ml en cada caja con aprox. 25ml de medio.

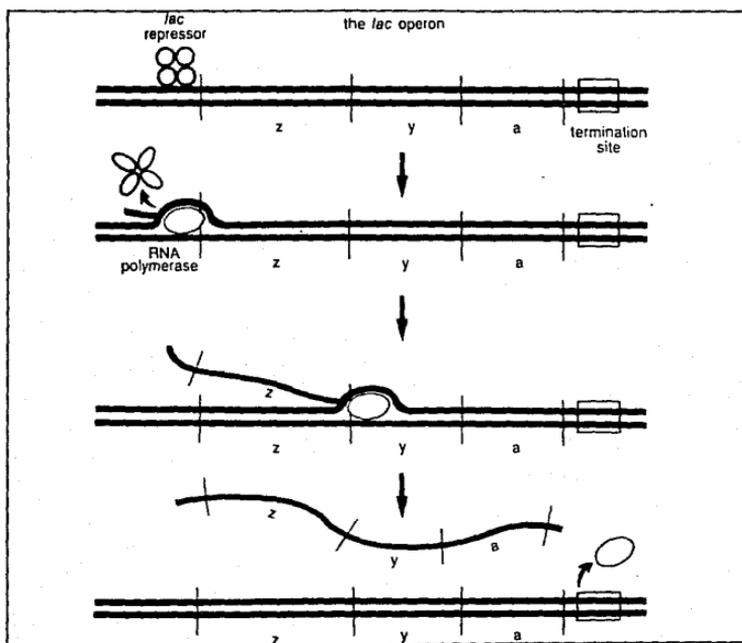
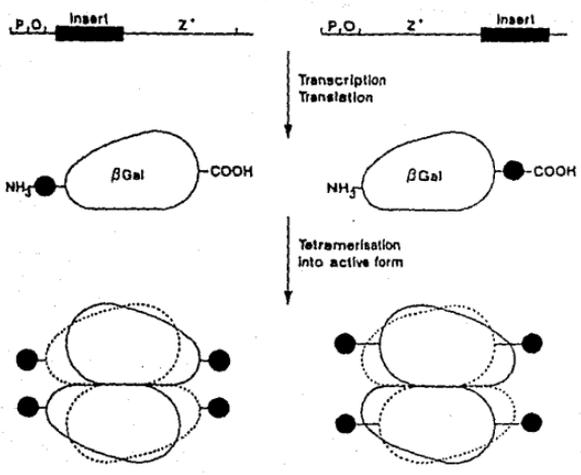


Figura 20. Se muestra la organización del operón *lac* de *E. coli*. La transcripción de los genes *lacZ*, *lacY*, y *lacA* se reprime por un represor específico. En la segunda figura se observa que el represor inactivo no se pega al operador y entonces los genes son transcritos por la RNA polimerasa. En el tercer dibujo, la RNA polimerasa transcribe el operón *lac* y finalmente, encuentra el terminador rho-dependiente y se desprende. Tomado del manual Current Protocols in Molecular Biology.

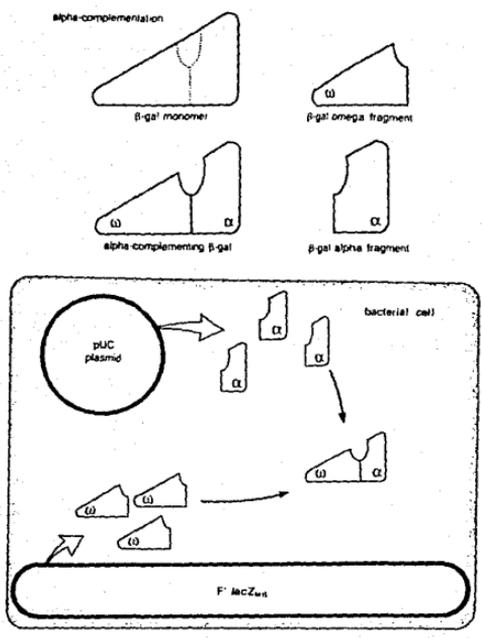
Figura 21a. Cuando se construye una fusión con la β -galactosidasa no se afecta la tetramerización de la proteína, por lo que se sigue observando actividad. Sin embargo, en algunas ocasiones, puede bajar la actividad específica por un cambio en la estructura del sitio activo.

21b. La complementación α consiste en la reconstitución de un polipéptido funcional de β -galactosidasa uniendo dos fragmentos que pueden estar clonados en vectores diferentes o en distintas partes del cromosoma. En el caso del sistema del plásmido pTZ, derivado del pUC 18, el sitio de policlonación se encuentra interrumpiendo la secuencia del péptido alfa y el péptido omega está en el episoma de la cepa receptora (JM103). Cuando se clona cualquier secuencia en pTZ, no se lleva a cabo la complementación y las colonias tienen un color blanco en cajas con Xgal. Ilustraciones del manual "Current Protocols in Molecular Biology".

A.



B.



Además del Xgal, el agar de Mac Conkey también es utilizado para los mismos fines. En este medio, las colonias Lac⁺ son rojas y las Lac⁻ son blancas.

LOS BACTERIOFAGOS $\lambda_{p\text{lacMu}}$.

Han sido construidos varios derivados del bacteriófago Mu, que frecuentemente se trata como un gran elemento de inserción, capaces de fusionar el gene de lacZ a varios genes bacterianos en un solo paso in vivo.

Se pueden aislar fusiones con la proteína o directamente con los promotores de los genes que interesen. Cuando el fago se inserta, además de dar el fenotipo Lac⁺, confiere resistencia al antibiótico ampicilina.

En estos fagos, un gene lacZ, deletado en su extremo 5' y un gene lacY están localizados a poca distancia del extremo S de Mu. Cuando se inserta un Mud(Aplac) en un gene, se crea una fusión en la cual la expresión a partir de secuencias de control del gene pasa sobre el extremo S de Mu hasta la β -galactosidasa.

Aunque los Mud han sido herramientas muy útiles para construir fusiones, tienen algunos problemas. Primero, existe la posibilidad de inserciones secundarias en otros sitios del cromosoma. Segundo, las fusiones Mud(Aplac) no se pueden usar para aislar fagos transductantes que lleven la fusión. Además, las lisógenas del Mud(Aplac) son termosensibles. Finalmente, no es posible aislar fusiones en plásmidos multicopia.

Sin embargo, existen algunos fagos líticos, los $\lambda_{p\text{lacMu}}$ que pueden ser utilizados para aislar las mismas fusiones in vivo y en un solo paso. Estos fagos llevan el sitio de inserción de Mu y se insertan en los genes por la maquinaria de transposición usual en Mu. Pueden utilizarse para construir fusiones en plásmidos multicopia. Fueron usados éstos ($\lambda_{p\text{lacMu}3}$ y $\lambda_{p\text{lacMu}507.3}$) para aislar las primeras fusiones descritas en esta tesis. Para mayores detalles, ver el trabajo de Bremmer, et al., en 1984.

MUTAGENESIS DE LOS BACTERIOFAGOS IN VITRO.

Cuando se desea mutagenizar los bacteriófagos que se encuentran en solución son incubados en una solución de citrato de sodio 1.5 M y sulfato de magnesio 0.2 M, durante 30 minutos a temperatura ambiente y después realizar una transducción a la cepa receptora.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA β -GALACTOSIDASA

Otro ejemplo de sustrato cromogénico es el o-nitrofenil- β -D-galactósido. Este compuesto es incoloro, pero en presencia de la enzima se convierte en galactosa y o-nitrofenol.

El o-nitrofenol es amarillo y puede ser medido por su absorbancia a 420 nm. Si la concentración de o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) es alta, la cantidad de o-nitrofenol es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo que la enzima reacciona con él. Para que el ensayo sea lineal, el ONPG debe estar en exceso. Para mejores resultados, la cantidad de enzima debe ser tal que tome entre 15 minutos y 6 horas para desarrollar un color amarillo. La reacción se detiene añadiendo una concentración elevada de carbonato de sodio, la cual eleva el pH a 11.0 y la β -galactosidasa se inactiva.

Las bacterias fueron crecidas hasta fase logarítmica temprana a 30°C con agitación en medio rico. Después de ésto, el cultivo fué trasladado a un baño con agitación a 42°C o se añadió etanol absoluto a una concentración final de 5% y se tomaron alícuotas a los tiempos 5, 10, 20, 40 y 60 minutos de incubación con el inductor.

Cada alícuota fue concentrada diez veces (en el caso de las fusiones con baja actividad enzimática) ó resuspendida en el mismo volumen de NN (en el caso de las fusiones con actividades elevadas).

1. En un tubo se mezclan:

0.1ml de extracto de células
0.9ml de buffer 2 (ver más adelante)
2 gotas con pipeta pasteur de cloroformo
1 gota con pipeta pasteur de SDS al 10%

2. Se agitan en vortex durante 10 segundos

3. Se colocan los tubos a 28°C durante 5 minutos

4. Se agregan 0.2ml de DNFG (4 mg/ml) a cada tubo y en este momento empieza la reacción que debe hacerse a 28-30°C.

5. Agitar en vortex durante 5 segundos.

6. Detener la reacción agregando 0.5ml de carbonato de sodio 1M a cada tubo. Los tiempos de reacción, así como la concentración de células debe estandarizarse para cada caso. Normalmente, se construye una curva deteniendo la reacción a tres tiempos diferentes y observando que el color amarillo sea proporcional al tiempo de incubación.

7. Centrifugar a 8 000 rpm durante 15 minutos.

8. Leer absorbancia a 420 nm.

Soluciones

El DNFG se prepara en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0.

El buffer 2 contiene:

Fosfato de sodio dibásico	0.06 M
Fosfato de sodio monobásico	0.04 M
Cloruro de potasio	0.01 M
Sulfato de magnesio	0.10 M
β -mercaptoetanol	0.05 M

Toda la mezcla debe estar a un pH de 7.0

Se define como actividad específica de la β -galactosidasa el número de umoles de o-nitrofenil- β -D-galactósido hidrolizado por minuto por miligramo de proteína.

La cantidad de proteína por ensayo fue determinada por el método de Lowry (1958).

PURIFICACION DE PLASMIDOS

A) En pequeña escala. "Miniprep".

Para el análisis de clonas individuales buscando la construcción correcta o la transformante deseada, se realizaron extracciones partiendo de muy pocas células (1.5 ml de cultivo crecido a fase estacionaria ó una asada de bacterias).

1. Se prepara la solución A: glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris-HCl pH 8.0 25 mM

A dos mililitros de solución A se añaden 4 mg de lisozima y 50 μ l de una solución de RNA^{asa} (10 mg/ml en acetato de sodio 0.2 M pH 5.0 hervida durante 10 minutos).

2. Resuspender una asada de la cepa en cuestión ó la pastilla obtenida después de centrifugar 1.5 ml de bacterias crecidas toda la noche, en 100 μ l de la solución A con lisozima y RNA^{asa}.

3. Mantener en hielo durante 30 minutos.

4. Agregar 100 μ l de NaOH 0.2N, SDS 1%; se mezclan cuidadosamente y la solución se aclara, debido a la lisis celular; se agregan 75 μ l de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y se mezcla, formándose un precipitado grumoso.

5. Mantener en hielo durante 15 minutos

6. Centrifugar en frío durante 5 minutos a 14, 000 rpm.
7. Colectar 200 ul de cada tubo y pasar a un tubo nuevo.
8. Agregar 600 ul de etanol absoluto e incubar en un baño de hielo seco-etanol durante 20 minutos.
9. Centrifugar 15 minutos en frío a 14, 000 rpm.
10. Descartar el sobrenadante y disolver la pastilla en 100 ul de acetato de sodio 2 M.
11. Agregar 300 ul de etanol absoluto y dejar de nuevo 20 minutos en un baño de hielo seco-etanol.
12. Centrifugar 15 minutos en frío a 14,000 rpm.
13. Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla dos veces con etanol al 80% frío.
14. Se deja secar la pastilla y una vez seca es resuspendida en 20 ul de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0.

Esta preparación, dependiendo del tamaño del plásmido y del número de copias dentro de la bacteria, permite purificar hasta 1 ug de DNA en condiciones que no interfieren con su digestión enzimática.

B) En gran escala. "Maxiprep".

Para purificación de plásmido en cantidades de 1 a 3 mg, y en condiciones listas para restricción, clonación, etc. pueden utilizarse varios métodos, se muestra una modificación que se utiliza en el laboratorio.

1. Inocular 500 ml de LB con 5 ml de un pre- cultivo con el antibiótico que requiera el plásmido a purificar.
2. Crecer hasta una densidad óptica de 0.8 a 1.0 a 660 nm.
3. Añadir 170 mg de cloranfenicol en polvo al cultivo.
4. Dejar toda la noche con agitación.

5. Al día siguiente, coleccionar las células en dos botellas de 250 ml centrifugando en el rotor GSA de Beckman a 7,000 rpm durante 15 minutos.
6. Resuspender las células en 30 mililitros de buffer de sacarosa (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 80 mM, sacarosa 10%) y dividir en 3 tubos de 50 ml (10 ml por tubo).
7. Añadir 4 ml de una solución de lisozima 10 mg/ml en buffer de sacarosa (1.33 ml por tubo).
8. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Congelar y descongelar dos veces.
10. Centrifugar en el rotor SW40 durante 20 minutos a 35,000 rpm (3 tubos).
11. Guardar el sobrenadante y precipitarlo con 1/2 volumen de LiCl 20% y 1 volumen de isopropanol.
12. Congelar en hielo seco y descongelar.
13. Centrifugar 20 minutos a 12,000 rpm.
14. Lavar la pastilla con etanol al 70% frío.
15. Secar las pastillas.
16. Resuspenderlas en un total de 5 ml de Tris- EDTA 10-1 mM a pH 7.5.
17. Añadir 30 μ l de una solución de RNA'sa 10 mg/ml en acetato de sodio 0.2M (No olvidar hervirla durante 10 minutos).
18. Incubar 1 hora a 37°C.
19. Pasar a un tubo corex y extraer con un volumen igual de fenol destilado, agitando en el vortex durante un minuto y centrifugando a 10,000 rpm durante 10 minutos.
20. Pasar la fase acuosa a otro tubo corex y repetir la extracción fenólica.
21. Extraer la fase acuosa con el mismo volumen de una mezcla de fenol-cloroformo 50-50 v/v.

22. Extraer la fase acuosa con cloroformo.

23. A la fase acuosa de esta última extracción añadir 1/10 de acetato de sodio 2 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

24. Congelar en hielo seco durante 20 minutos.

25. Descongelar y centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos.

26. Lavar la pastilla con una solución fría de etanol al 70% y secar.

27. Resuspender en 800 μ l de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0.

28. Correr en un gel de agarosa una muestra con 3 μ l para cuantificar.

PURIFICACION DE DNA CROMOSOMAL

1. Crecer la cepa en medio rico hasta la fase exponencial tardía.

2. Colectar las células por centrifugación a baja velocidad y resuspenderlas en 10 ml de un buffer de sacarosa (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1.0 mM, sacarosa 25%). Mantenerlos en hielo mientras se resuspenden con cuidado, las células deben mantenerse enteras.

3. Añadir los siguiente por litro de cultivo, en el orden dado y en hielo:

a) 3 ml de EDTA 0.3 M pH 8.0

b) 1 ml de lisozima (5 mg/ml en 0/025 mM de tris HCl pH 8.0.

c) 0.1 ml de RNA'sa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M hervida durante 10 minutos).

4. Agitar suavemente, dejar reposar 15 minutos en hielo.

5. Añadir 3 ml de tritón x-100 agitando suavemente y dejar reposar en hielo durante 15 minutos.

6. Centrifugar en tubos de polipropileno de 50 ml a 15 000 rpm durante 30 minutos.

7. Decantar el sobrenadante, disolver la pastilla en 10 ml de buffer A (Tris-HCl 0.05M pH 7.5, EDTA 2 mM, SDS 5%).

8. Agregar un décimo del volumen de una solución de proteasa K 5 mg/ml en buffer A previamente incubada 30 minutos a 37°C.

9. Agregar RNA'sa (5 mg/ml) en buffer B (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM pH 7.5) hervida 10 minutos, ajustando a que quede una concentración final de 0.1 a 0.5 mg/ml.

10. Incubar 60 minutos a 37°C.

11. Extraer tres veces a temperatura ambiente con dos volúmenes de fenol-cloroformo 50:50 v/v. En cada extracción centrifugar 10 minutos a 7, 000 rpm y tomar la fase acuosa con pipetas de boca ancha muy suavemente.

12. Después de las tres extracciones, añadir 2 volúmenes de cloroformo, centrifugar igual y tomar la fase acuosa.

13. La fase acuosa se precipita con 1/25 de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.

14. Colectar los hilos de DNA centrifugando a 10,000 rpm durante 10 minutos. Secarlos.

15. Resuspender en 3 ml de buffer Tris-HCl-EDTA 10-1 mM pH 8.0.

16. Tomar 10 ul y agregar 990 ul de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0 y medir absorbancia a 260 y 280 nm; se hace el cociente de la lectura a 260/ lectura a 280 nm y si la división es igual o superior a 1.8, la solución es adecuada; si es menor, se necesario volver a extraer y precipitar. También con estas lecturas se cuantifica el DNA: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 20 ug por mililitro de DNA de doble cadena.

PURIFICACION DE RNA TOTAL DE E. coli

MATERIAL:

1. Matraces para cultivo de las bacterias perfectamente limpios y estériles, horneados toda la noche a 200°C.
2. Pipetas de vidrio de 10, 5, y 1 ml limpias, estériles y horneadas toda la noche a 200°C.
3. Tres tubos corex de 30 ml de capacidad y un tubo corex de 15 ml limpios, estériles y horneados por cada 30 ml de cepa bacteriana.
4. Pipetas pasteur nuevas y limpias (aproximadamente 5 por cada cepa).
5. Puntas para micropipeta y tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad nuevos y estériles.
6. Baño maría a 65°-70°C.
7. Incubadora con agitación a 65°C y 200-300 rpm de velocidad de agitación.
8. Centrífuga con rotor HS4 (ángulo libre) para centrifugar a 10,000 rpm (puede usarse de ángulo fijo).
9. Espectrofotómetro para leer absorbancia a 260 y 280 nm.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

1. Los medios de crecimiento, bien preparados y estériles.
2. Agua bidestilada filtrada y estéril.
3. Solución de lisis:

Acetato de Sodio 20 mM pH 5.5
EDTA 1 mM
SDS 0.5%

esterilizar en el autoclave.

4. Fenol bidestilado saturado con acetato de sodio 20 mM pH 5.5 y EDTA 1 mM.

5. Solución de acetato de sodio 3 M pH 5.5 esterilizado por autoclave.

6. Alcohol etílico absoluto destinado solamente para precipitar el RNA.

7. Alcohol etílico al 70% : diluir con agua estéril.

PROCEDIMIENTO.

1. Se inoculan 30 ml de cultivo partiendo de un precultivo de toda la noche. Se dejan crecer hasta la fase logarítmica (0.3 UDD a 600 nm ó 90-120 u klett).

2. Se centrifuga cada cultivo en tubos corex de 30 ml a 10 000 rpm a 4°C durante 5 minutos.

3. Colocar los tubos decantados en hielo y sin sacarlos resuspender el paquete celular en 1/10 del volumen original pero en solución de lisis. Para ello, raspar las paredes del tubo con la punta de una pipeta estéril, succionar y dejar pasar el líquido varias veces, con suavidad hasta resuspender las células (no usar vortex).

4. Resuspendido en paquete celular, se calienta cada tubo a 70°C por aproximadamente 1 minuto en baño maría hasta observar lisis celular.

5. Inmediatamente añadir un volumen igual de fenol saturado para RNA, previamente calentado a 65°C, agitar.

6. Mezclar en una incubadora con agitación a 65°C a 200-300 rpm (la agitación debe garantizar que se mezclen las dos partes) durante 10 minutos.

7. Centrifugar el contenido para separar las dos fases (rotor HB-4 a 10,000 rpm 5 minutos a T. ambiente).

8. Sin mezclar las fases, sumergir los tubos unos segundos en baño maría a 65°C. Posteriormente, tomar con una pipeta pasteur estéril la fase acuosa y pasarla a otro tubo.

9. Añadir un volumen igual de fenol a 65°C y repetir los pasos 6, 7 y 8. Convencionalmente, se hacen tres extracciones de este tipo.

10. En el corax de 15 ml se toma la fase superior de la última extracción, añadiendo 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y 2 1/2 volúmenes de etanol al 100%. Se deja precipitar toda la noche a -20°C.

11. Centrifugar a 10,000 rpm en el rotor HB-4 a -10°C durante 30 minutos.

12. Secar el precipitado.

13. Resuspender la pastilla en agua (+- 150 ul) cuidadosamente y leer una dilución 1:200 (5 ó 10 ul/ml) en el espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm. La relación de absorbancias a 260/280 debe estar entre 2.0 y 2.2.

14. Calcular la concentración de RNA. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 40 ug por mililitro.

15. Guardar congelado a -20°C.

HIBRIDACION DNA-RNA (NORTHERN) CON FORMALDEHIDO COMO DESNATURALIZANTE

1. El RNA se somete a electroforesis en un gel de agarosa, horizontal, de puentes (no sumergido) de 6 mm de espesor y con pozos de 5 mm de profundidad.

2. Preparar la agarosa para separar desde 1000 a 4500 b.

Se elabora poniendo por cada 100 ml finales 10 ml de MENP 10X (ver soluciones al final), 115 gr. de agarosa y se afora a 82.1 ml; ésta mezcla se esteriliza por autoclave a 125°C durante 15 minutos. Cuando se ha enfriado hasta 65°C se añaden 17.9 ml de formaldehído al 37% (solución comercial usual).

3. Hacer el gel.

Tanto el peine como el molde para el gel y la cámara de electroforesis deben ser tratados contra RNA'sas. Sumergirlos en NaOH 100 mM durante 20 minutos y ejuagar con agua estéril es eficiente y práctico.

Fraguar el gel en el molde y montar el sistema listo para electroforesis.

El buffer de ambas depósitos en MENP 1X y durante la corrida tiene que ser recirculado a más de 1 ml por segundo usando una bomba peristáltica. Todo esto debe estar montado en el cuarto frío.

4. Preparar las muestras.

Normalmente, se hacen geles con pozos de 40 ul de capacidad. Las muestras se preparan como sigue:

Se colocan de 1 a 20 ug de RNA en 7.5 ul de agua.

Se añaden 22.5 ul de la "mezcla de muestras" (ver al final).

Calentar a 65°C durante dos minutos y poner en hielo 5 minutos.

Añadir 3 ul de solución de azul de bromofenol.

Llenar los pozos del gel con la "solución de pozos".

Poner las muestras dejando que por su mayor densidad caigan al fondo del pozo a través de la "solución de pozos".

5. Corrida del gel.

El gel se corre en el cuarto frío a 3 voltios por centímetro cuadrado; 16 horas aproximadamente. Se cubre el gel con plástico para evitar la evaporación del formaldehído, con cuidado de no crear turbulencia en los pozos. Es preferible esperar a que las muestras hallan penetrado al gel: aproximadamente 30 minutos.

6. Transferencia.

El sistema para transferir es idéntico al de Southern en cualquiera de sus versiones. Se transfiere el RNA a nitrocelulosa por medio de arrastre por un buffer. El gel no se trata ni se tiñe de ninguna manera antes de ponerse a transferir. El buffer de arrastre es 20X SSC.

Se transfiere durante 20-40 horas. Después de la transferencia, la nitrocelulosa se deja secar entre dos filtros whatman y luego se hornea a 80°C durante 2 y media horas en un horno con vacío. Es importante no exponer el filtro a ninguna solución de fuerza iónica menor a SSC 15X antes de ser horneado, pues el RNA se desprende.

7. Hibridación.

Re-hidratar el filtro en SSC 4X durante 5 minutos y dejar escurrir (casi secar); poner en una bolsa para hibridización y añadir la solución de pre-hibridización. Sellar la bolsa y pre-hibridizar a la temperatura de 42°C aproximadamente 4 horas.

Abrir una esquina de la bolsa y sacar la solución de pre-hibridización. Llenar con la solución de hibridización ya con el monitor radiactivo (no olvidar desnaturalizarlo si es de doble cadena).

Hibridar al menos 12 horas para 10 ng/ml de monitor.

8. Lavado del filtro.

Desechar con cuidado la solución de hibridización radiactiva y lavar el filtro tres veces por 5 minutos a temperatura ambiente con SSC 2X, SDS 0.1%.

Después, se lava dos veces por 10 minutos en SSC 0.1X, SDS 0.1% ya sea a 55°C si el monitor es 100% homólogo y mayor a 100 pb ó a temperatura ambiente si se desean condiciones menos estrictas de hibridización.

Enjuagar el filtro en SSC 0.1X por dos minutos; secar en un filtro whatman y exponer dentro de un cassette con pantalla amplificadora una placa de rayos X a -70 °C.

SOLUCIONES NO DESCRITAS EN EL TEXTO

MENP 10X (por litro)

MOPS	41.8 g
Acetato de sodio	6.8 g
EDTA	3.7 g
Fosfato de sodio y potasio	
1 M pH 6.9	20 ml

llevar toda la solución a un pH de 7.0

Solución de pozos (10 ml)

MENP 10X	1 ml
Agua	7.2 ml
Formaldehído 37%	1.8 ml

Mezcla de muestras (610 ul)

Formamida desionizada	400 ul
Formaldehído 37%	120 ul
MENP 10X	90 ul

Solución de azul de bromofenol

Glicerol	50%
EDTA	1 mM
Fosfato de sodio y potasio pH 6.9	1 mM
Azul de bromofenol	0.05%

Buffer SSC 20X

NaCl	3 M
Citrato de sodio	0.3 M

Solución Denhardt 50X

Ficol	1%
Albúmina bovina	1%
Polivinilpirrolidona	1%

Soluciones para hibridación.

	SOLUCION DE PREHIBRIDACION	SOLUCION DE HIBRIDACION
Formamida	2.5	2.5
SSC 20X	1.25	1.25
Fosfato de Na y K pH 6.9	0.25	0.25
SDS 10%	0.05	0.05
Pirofosfato de Na 2%	0.25	0.25
Denhardt 50X	0.50	0.10
DNA de timo de ternera 4 ug/ml	0.25	0.25
EDTA 250 mM	0.05	0.05
DNA marcado por "Nick Translation"	----	0.30
Volumen final	5.0 ml	5.0 ml

El DNA de timo de ternera debe desnaturalizarse 5 minutos a 90°C, pasarlo inmediatamente a hielo y añadirlo a la bolsa de hibridación.

El monitor de DNA (normalmente de 100-500 ng) también debe desanturalizarse calentando 5 min. a 90°C y enfriando bruscamente en hielo antes de añadirlo.

El monitor se marca usando algún desoxirribonucleótido con 32P en la posición alfa. Se utiliza el método estandarizado de "Nick translation".

Las técnicas descritas a continuación se encuentran descritas en un manual de técnicas de Biología molecular (Maniatis, et al., 1982).

DIGESTION DE ACIDOS NUCLEICOS

Para todas las manipulaciones de DNA, construcciones y mapeos físicos de los plásmidos, se utilizaron enzimas de restricción de casas comerciales conocidas como Amersham, Biolabs, Promega, etc.

Se conocen con el nombre de enzimas de restricción aquellas proteínas que reconocen una secuencia específica en el DNA (generalmente un arreglo de 4 a 6 pares de bases con simetría bilateral) y que cortan ambas cadenas de la molécula del ácido nucleico dejando extremos que pueden rasos o cohesivos (ver figura 22).

Una vez que el DNA se ha digerido, se obtiene un patrón de bandas en un gel de agarosa que corresponden a los fragmentos producidos por la enzima de restricción específica. En este trabajo se utilizaron varias, como EcoRI, PstI, SmaI, Hind III, y otras que se irán mencionando en su momento.

Normalmente las enzimas necesitan un buffer específico con ciertas concentraciones de sales y cierto pH. Una digestión típica se lleva a cabo en un volumen pequeño (10-20 ul) en un tubo eppendorf con 100-200 ng de DNA, buffer de restricción y la enzima que se requiera.

Después de un tiempo, generalmente de una hora, la muestra se hace correr a través de un gel de agarosa ó acrilamida; se tiñe con bromuro de etidio y se observa la fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

Antes de llevar a cabo la ligación de fragmentos de DNA debe tenerse en cuenta el tipo de extremos que deja cada enzima de restricción, los extremos rasos se ligan siempre con extremos rasos y los cohesivos, con sus similares. Así pues, el vehículo de clonación y/o expresión debe ser digerido con el mismo tipo de enzima de restricción que el inserto, según convenga.

Pvu II

5'...CAGCTG...3'
3'...GTCGAC...5'

SOURCE:
Proteus vulgaris ATCC 13315

Pvu I

5'...CGATCG...3'
3'...GCTAGC...5'

SOURCE:
Proteus vulgaris ATCC 13315

Figura 22. Las enzimas de restricción, al digerir el DNA pueden dejar dos tipos de extremos, rasos o cohesivos.

DEFOSFORILACION

En todas las construcciones que se mencionarán en el presente trabajo, el vector de clonación y/o expresión fue defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) para evitar la recircularización del vehículo y favorecer la ligación con las moléculas de inserto.

Una reacción típica de defosforilación lleva de 100 a 200 ng de DNA del vector, 10 unidades de BAP y un buffer de defosforilación en un volumen de 400 ul. Según el tipo de extremos que tenga el vector son las condiciones de tiempo y temperatura de la reacción.

El vehículo defosforilado se extrae una vez con fenol, una vez con fenol-cloroformo 50:50 v/v y una vez con cloroformo antes de precipitarse con 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y etanol. El DNA se seca, se resuspende en Tris-EDTA 10-1 mM y se pone a ligar.

LIGACION DE FRAGMENTOS DE ACIDOS NUCLEICOS

La enzima ligasa de DNA cataliza la unión covalente del grupo 5' fosforilo, de una molécula de cadena sencilla de DNA ó RNA con un grupo 3' hidroxilo, de una molécula de cadena sencilla de DNA ó RNA (Sugino et al., 1977).

Normalmente, después de defosforilar el vector y purificar el inserto por electroelución, la construcción de las fusiones se llevó a cabo ligando el vector con el inserto, en una reacción a 16°C catalizada por la ligasa del fago T4 en un buffer de ligación.

GELES DE AGAROSA Y ACRILAMIDA

Para separar moléculas de DNA, ya fueran productos de digestión enzimática o análisis de moléculas recombinantes, se utilizaron geles de agarosa y acrilamida a distintos porcentajes, dependiendo del tamaño esperado de las moléculas. Podrán observarse con mayor detalle cuando se analicen las construcciones. Los geles fueron preparados por técnicas estandarizadas (Helling et al., 1974).

ELECTROELUCION DE DNA DE GELES DE AGAROSA O ACRILAMIDA

Después de que la muestra ha migrado dentro del gel y se tiñe con una solución de bromuro de etidio 200 ug/ml, se observa el gel bajo una lámpara de luz ultravioleta de onda larga, seleccionando la banda de interés y cortándola con una navaja.

El trozo de agarosa ó acrilamida se coloca en el interior de una bolsa de diálisis de poco diámetro (6.4 mm) y poro pequeño (para moléculas de 20,000 a 14,000) con buffer de electroforesis.

Se aplica una corriente eléctrica hasta que el DNA sale de la agarosa y queda en suspensión dentro de la bolsa. Se extrae el buffer con una micropipeta y se coloca en un microtubo, donde será extraído con fenol, fenol:cloroformo 50:50 v/v y cloroformo; para después ser precipitado con acetato de sodio 2 M pH 4.8 y etanol absoluto (Mc. Donnell et al., 1977), ver figura 23.

MUTAGENESIS CON HIDROXILAMINA

La hidroxilamina, la metil-hidroxilamina, la fenilhidroxilamina, los N-hidroxicarbamatos y las N-hidroxiureas son agentes reductores que forman radicales libres en presencia de oxígeno y metales traza. Producen peróxido de hidrógeno, presumiblemente por una reacción cíclica del radical, que envuelve un intermediario peroxi. Inactivan el DNA transformante y los fagos. Inducen aberraciones cromosómicas en tejidos de hamster y en puntas de raíz de *Vicia* y *allium*.

La hidroxilamina reacciona específicamente con las citosinas, produciendo derivados que son N-hidroxilados en las posiciones 4 ó 6 ó ambas. Estos derivados se encuentran en distintos estados tautoméricos que la citosina, así que pueden formar puentes de hidrógeno con adenina, el lugar de la guanina original.

Así, el tratamiento de DNA desnudo ó de virus de DNA con altas concentraciones de NH_2OH induce transiciones de las bases G-A y C-T y resultan generalmente en mutaciones puntuales. Un trabajo sonde se utilizó la mutagénesis con este agente para caracterizar regiones reguladoras de algunos genes es el de Buck, et al., en 1985.

La mutagénesis del plásmido pCG29 se llevó a cabo de la siguiente forma:

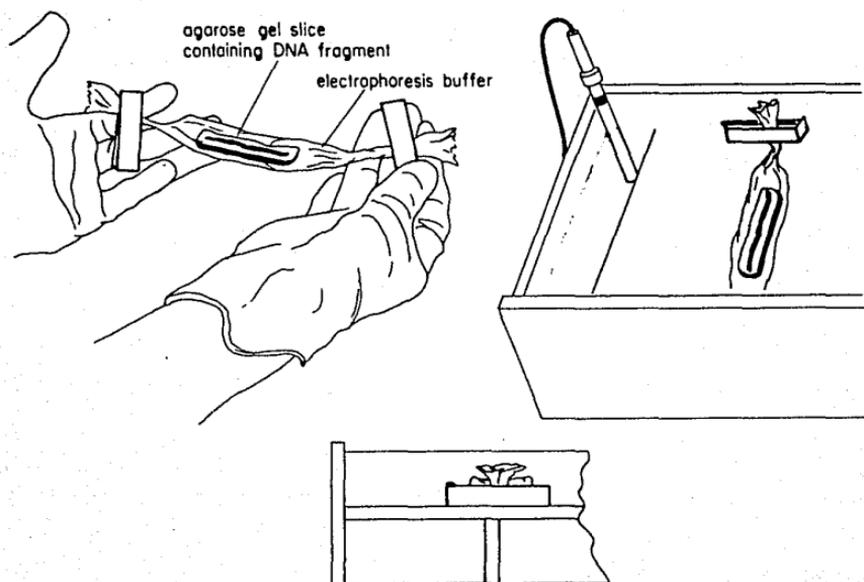


Figura 23. La técnica de electroelución fue implementada por Dornell en 1970. Consiste en cortar un fragmento de un gel de agarosa o acrilamida, introducirlo en una bolsa de diálisis y someter a electroforesis. El DNA sale del gel y queda resuspendido en el buffer de corrida. Después se colecta y se precipita.

1. Se incubaron 60-100 ng del plásmido en 20 ul de una solución de hidrocloreuro de hidroxilamina 0.5 M pH 6.9; fosfato de sodio pH 6.0, 0.1 M y EDTA 0.01 M durante 30 minutos a 75°C.

2. El DNA fue precipitado con acetato de sodio 3 M pH 4.8 y etanol absoluto; se lavó la pastilla con etanol al 80% varias veces, se secó y fue resuspendida en 20 ul de agua estéril.

3. Fue transformada la cepa MC1061 por el método de cloruro de calcio, espatulando sobre cajas de LB con ampicilina y Xgal, buscando mutantes.

4. Se purificó el plásmido mutado.

5. Fue digerido y se recuperó la banda que contenía los promotores y los primeros aminoácidos de ropH.

6. Este fragmento fue reclonado en un plásmido silvestre.

7. Fueron caracterizadas las mutantes dentro de la cepa MX614 y fueron secuenciadas.

TRANSFORMACION BACTERIANA POR EL METODO DE CLORURO DE CALCIO

Siempre que se quería introducir un plásmido a una cepa receptora, se utilizó el método de transformación que permeabiliza a las células por un tratamiento de cloruro de calcio.

1. Crecer las células hasta 40 u. Klett en medio rico.

2. Dejar el cultivo en hielo durante 10 minutos.

3. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos.

4. Guardar la pastilla celular y resuspendirla en la mitad del volumen de cloruro de calcio 100 mM estéril.

5. Incubar en hielo durante 30 minutos.

6. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos.

7. Guardar la pastilla y resuspenderla, con mucho cuidado, en la misma solución de cloruro de calcio (1/10 del volumen original).

8. Dividir en alícuotas de 200 μ l según los plásmidos a transformar; añadir de 20-50 ng de plásmido por alícuota y dejar en hielo durante una hora.

9. Dar un choque calórico de 2 minutos a 42°C.

10. Pasar a hielo, añadir 1 ml de LB a cada tubo de transformación.

11. Incubar a temperatura permisiva durante 30 minutos.

12) Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos y espatular la pastilla de bacterias en cajas con medio de selección.

SECUENCIACION DE DNA POR EL METODO DE SANGER

Una de las metodologías más importantes que se han desarrollado en Biología Molecular es la secuenciación de ácidos nucleicos. Existen varias maneras de secuenciar un fragmento de DNA y uno de los métodos más utilizados actualmente es el desarrollado por Sanger (1977) llamado comúnmente método por terminación de cadenas ó método de los dideoxi.

Esta técnica hace uso de la capacidad de la DNA polimerasa de sintetizar una copia radiactiva de un templado de DNA de cadena sencilla usando un fragmento de DNA como cebador o "primer" e incorporando en la reacción los diferentes desoxirribonucleótidos. La enzima incorpora también los 2',3' dideoxinucleótidos pero es entonces incapaz de continuar la reacción más allá de la entrada del análogo.

DONADO POR D. G. D. - B. C.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El fragmento mas grande de la DNA polimerasa (llamado fragmento Klenow) no tiene actividad de 5'-3' exonucleasa y se utiliza para sintetizar una copia complementaria a la cadena sencilla a partir de un híbrido entre la cadena sencilla en cuestión y un pequeño fragmento de restricción que es complementario a una parte (el "primer").

La síntesis de DNA se hace en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos pero uno o varios están marcados radiativamente con ^{32}P en la posición alfa; además, con cada uno de los cuatro análogos terminadores de cadena, los 2', 3' desoxirribonucleótidos, en cuatro incubaciones separadas. Entonces, en cada reacción hay una población de moléculas de DNA parcialmente sintetizadas y radiactivas, cada una teniendo un extremo común 5', pero variando cada una la longitud hacia el 3'.

Cuando se realiza una electroforesis paralela en geles desnaturalizantes y concentrados de acrilamida, de las cuatro reacciones se separan bandas que difieren entre sí en un solo nucleótido. El gel es fijado y revelado con una placa de rayos X. Así, por autorradiografía puede ser deducida la secuencia del DNA (ver figura 23).

El método es relativamente simple, pero tiene dos desventajas:

- 1) El DNA que se quiera secuenciar tendrá que estar purificado en forma de cadena sencilla

- 2) Para cada cierto número de bases (200-300) de una secuencia se requiere un "primer" complementario a por lo menos 20 bases del fragmento.

Para salvar éstas 2 dificultades se han aprovechado las características de un fago filamentoso, el M 13, para convertirlo en un vehículo de clonación; por otro lado, se han manipulado plásmidos clonando en ellos el origen de replicación del M 13. Estos últimos ofrecen la ventaja de ser pequeños y tener un alto número de copias por célula. Estos vectores tienen dos orígenes de replicación: el de pBR322 y el del fago M13, lo cual permite la purificación de cápsides de fago con cadenas sencillas del plásmido que nos interese secuenciar.

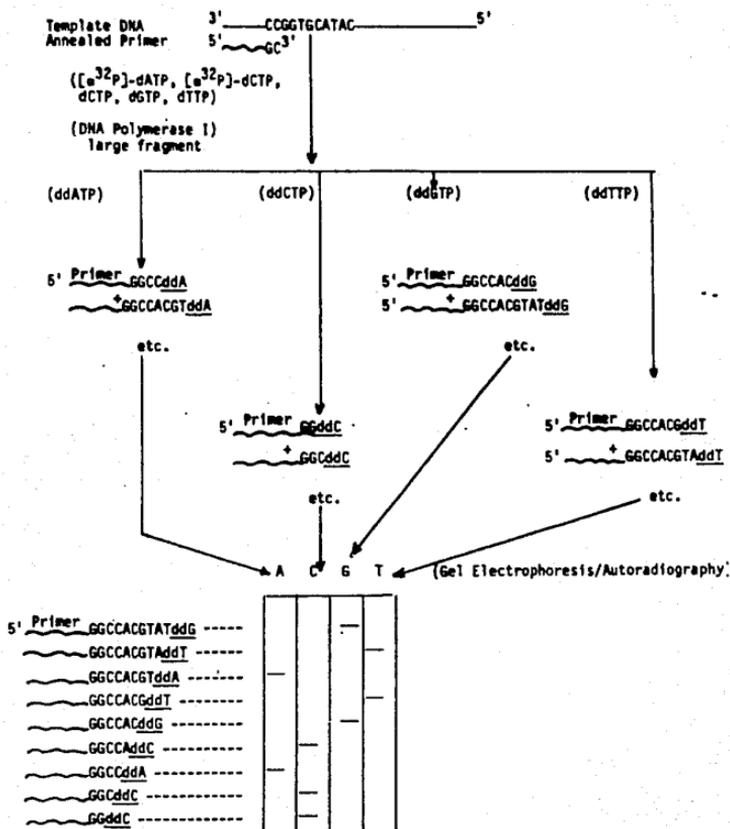


Figura 24. Método de Sanger para secuenciar DNA. Se le llama también método de los dideoxi o simplemente de los terminadores de cadena.

La estructura detallada del plásmido utilizado para secuenciar en esta tesis se encuentra en la figura 25. Puede apreciarse que el pTZ 18R mide aproximadamente 3kb, está completamente secuenciado. Contiene una secuencia de policlonación en el interior del fragmento alfa de la β -galactosidasa, que también está clonado.

Este vehículo se introduce en la cepa JM103, la cual lleva en un episoma el gene lacZ con la delección del segmento α . En condiciones normales, el péptido sintetizado por el plásmido complementa la mutación en el episoma, produciendo β -galactosidasa y por tanto, produciendo colonias azules en un medio con Xgal.

Quando se clona un fragmento de DNA en el sitio de policlonación del pTZ 18R, se interrumpe el péptido alfa y se pierde la capacidad de complementar la mutación en el F', dando colonias blancas en un medio indicador.

Una vez que se ha clonado el fragmento de interés, se infecta a la bacteria con el fago defectivo M13 K07. El M13 no lisa a la bacteria, sale al exterior en forma de agregados proteínicos que contienen la cadena sencilla codificante del DNA del fago. El M13 K07 tiene una mutación que permite la encapsidación de moléculas de DNA que sean circulares y que no provengan de él mismo. Así, se pueden purificar del sobrenadante de un cultivo cápsides con cadenas sencillas del pTZ 18R con el inserto para secuenciar. Ver figura 26.

La purificación de cadena sencilla se lleva a cabo de la siguiente manera:

PURIFICACION DE CADENA SENCILLA PARA SECUENCIA

1. Poner un precultivo con la cepa JM103 ó JM101 con el plásmido pTZ 18R que lleve clonado el inserto a secuenciar.
2. Inocular 2 ml de LB con ampicilina con 20 μ l del precultivo.

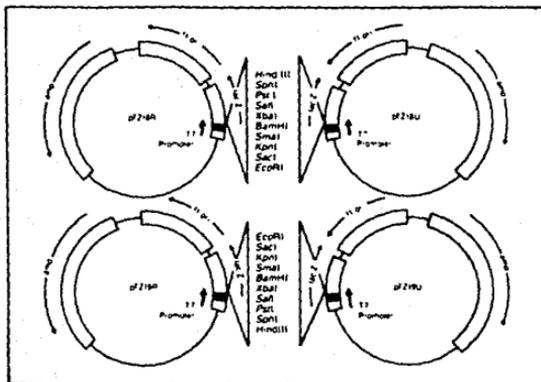


Figura 25. Esquema del pTZ 18R, vehiculo utilizado para la subclonación de fragmentos para secuencia.

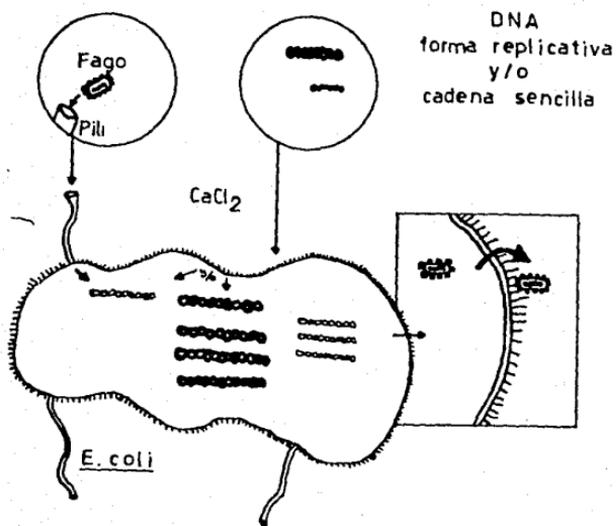


Figura 26. Ciclo de vida del fago M13. No lisa a la bacteria y son liberadas cápsides con cadena sencilla del DNA del bacteriofago. En el sistema con pT2, las cadenas sencillas encapsidadas son del plásmido con el inserto de interés. Tomado de García, M. 1988.

3. Crecer con agitación a 37°C hasta una D. O a 660nm de 0.3 a 0.6.

4. Agregar en ese momento 1x10⁸ fagos M13 K07

5. Dejar una hora a 37°C con fuerte agitación.

6. Tomar 100 ul e inocular 3 ml de LB con kanamicina y dejar con agitación fuerte (350-400 rpm) a 37°C toda la noche.

7. Centrifugar 1.5 ml del cultivo de toda la noche en un tubo eppendorf a 10 000 rpm 5 minutos, 2 veces.

8. Recoger, finalmente, 1.2 ml de sobrenadante.

9. Poner 0.3 ml de polietilén glicol y mezclar cuidadosamente. (El PEG se prepara en NaCl 2.5 M, a una concentración final de 20%).

10. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

11. Centrifugar a 14, 000 rpm durante 15 minutos.

12. Secar la pastilla perfectamente.

13. Resuspender en 200 ul de Tris-EDTA 10-1 mM pH 8.0

14. Extraer: 2 veces con fenol
1 vez con fenol-cloroformo 50:50 v/v
1 vez con cloroformo

15. Precipitar con 1/10 de Acetato de sodio 2M pH 4.8 y 2.5 vol. de etanol absoluto. Congelar.

16. Centrifugar 20 minutos en frío.

17. Secar y resuspender en 100 ul de Tris-EDTA 10-1 mM

18. Correr en un gel de agarosa al 1% y cuantificar.

19. Precipitar los 90 ul restantes 9 ul de acetato de sodio 2 M pH 4.8 y 225 ul de alcohol absoluto.

20) Congelar en hielo seco.

21. Centrifugar 20 minutos en frío.
22. Lavar dos veces con etanol al 70% colocando en hielo seco durante 30 minutos cada vez y centrifugando 10 minutos.
23. Secar y resuspender en 15 μ l de Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5
24. Guardar a -20°C y secuenciar 7 μ l.

Las reacciones para secuenciar el DNA clonado y purificado como cadena sencilla del pTZ 18R se llevan a cabo utilizando un "kit" comercial que contiene las soluciones de nucleótidos y dideoxinucleótidos, además de la enzima y los buffers necesarios. El utilizado aquí fue el paquete de "Sequenase" de la casa comercial Amersham.

Las muestras fueron corridas en geles de acrilamida al 4% y 6% con 50% de urea; a 2,000-2500 voltios.

Los geles se secaron a 60°C toda la noche antes de poner a exponer con una placa Kodack X-O mat K durante 24 horas; después de lo cual se leyeron las secuencias.

R E S U L T A D O S

I. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES PARA CONSTRUIR LAS FUSIONES: EL pKV3 Y SUS MENSAJEROS

Como ya se ha mencionado, el producto del gene *lppH* es esencial a temperaturas superiores a los 10°C, así que intentar obtener una fusión en el cromosoma no es una alternativa funcional. Se diseñaron varias estrategias para lograr la inserción de una secuencia que contuviera la actividad de β -galactosidasa en *lppH* utilizando una cepa merodiploide. Sin embargo, cuando las fusiones se hacen en monocopia (Gross et al., 1987) la actividad de β -gal es tan pequeña que tiene que detectarse con anticuerpos anti β -gal. Nosotros deseábamos un vehículo manejable y que ofreciera facilidades para medir la actividad enzimática. Se resolvió que una fusión en un plásmido multicopia tenía ventajas sobre las demás opciones.

Se solicitó al Dr. Takashi Yura el plásmido pKV3, descrito por él en 1985; éste plásmido derivado de pBR322, contiene un fragmento del minuto 76 del cromosoma de *E. coli* y se reportó que era capaz de complementar una mutación ámbar en el gene *lppH* (Yura et al., 1985).

Se procedió entonces a elaborar un mapa fino de restricción del pKV3 para ubicar los sitios de algunas enzimas importantes, EcoRI, HindIII, PstI, EcoRV, Hae III, Hinf I y HpaI. En la figura 27 se muestra una fotografía con una digestión representativa y un esquema del pKV3.

El plásmido de 4.0 kb contiene toda la región estructural del gene, incluyendo su terminador, pero carece del promotor más lejano. El sitio HindIII está localizado en la posición -130 y es el límite entre el plásmido pBR322 y la secuencia de *lppH*.

Antes de construir la fusión en este plásmido se probó que la transcripción a partir de los promotores clonados fuera regulada por calor.

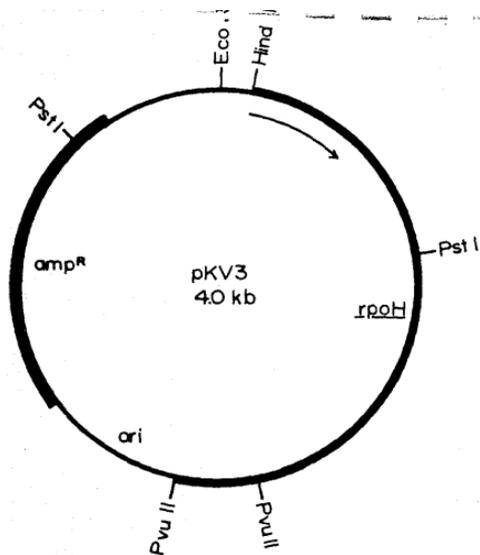


Figura 27. El plásmido pKV3 fue construido por Yura, 1985. Contiene la secuencia de la región estructural del gene *rpoH* y tres de los cuatro promotores funcionales. Es un derivado de pBR322 y la clonación sustituyó la resistencia a tetraciclina por un inserto de 3.0 kb proveniente del minuto 76 del cromosoma. Se hizo un mapeo de los sitios de restricción y se muestra un gel representativo (acrilamida 6%). Carriles del gel (1) pBR322+HaeIII, (2) pKV3+HaeIII, (3) pBR322+HaeIII+HindIII (4) pKV3+HaeIII+HindIII (5) pBR322+HpaII, (6) pKV3+HpaII, (7) pBR322+HinfI y (8) pKV3+HinfI.

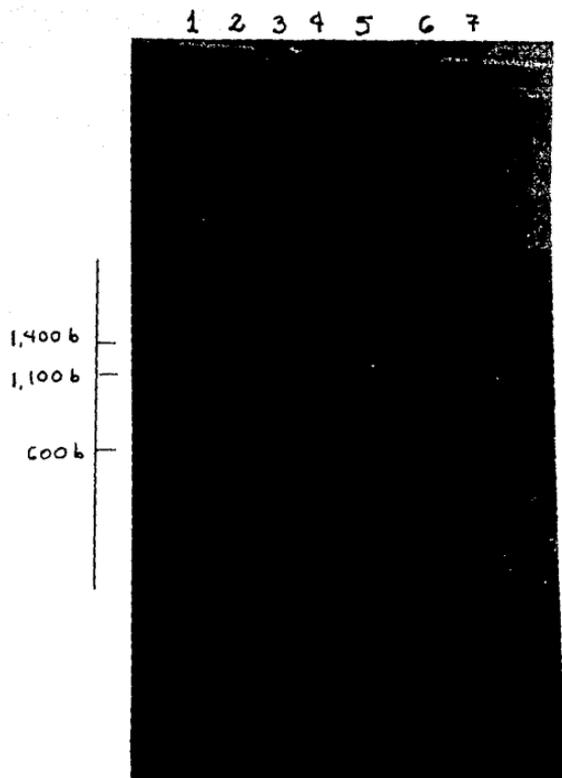


Figura 28. Experimento tipo Northern para comprobar la expresión del plásmido pKV3. Carriles (1) MX614 crecida a 30°C, (2) MX614 crecida a 42°C, (3) MX614/pKV3 crecida a 30°C, (4) MX614/pKV3 crecida a 42°C, (5) MX1231 a 30°C, (6) MX1231/pKV3 a 30°C y (7) MX1231/pKV3 a 42°C.

Procedimos a realizar hibridaciones DNA-RNA (Northern) para averiguar si se expresaba o no el gene ppcH clonado. Se muestra una autoradiografía representativa de los experimentos realizados en la figura 28; a partir del pKV3 se pueden sintetizar 3 de los cuatro mensajeros del gene. Si las extracciones de mRNA se realizaban a distintos tiempos de exposición a 42°C, era claro que los promotores se inducían en una forma dependiente del calor.

El plásmido pKV3 se utilizó como vehículo para obtener las fusiones porque 1) complementaba una mutación ámbar, lo que indicaba su funcionalidad, 2) poseía promotores inducible por calor (ver figura 28) y 3) no se había comprobado en ese entonces la expresión del gene a partir del promotor 1; hasta ahora, la evidencia apunta hacia que es constitutivo.

FUSIONES ppcH::lacZ EN EL pKV3 MEDIADAS POR LOS BACTERIOFAGOS placMu

Bremner et al., publicaron en 1980 el diseño de un vector derivado del bacteriófago λ mbda, que es capaz de insertarse en secuencias tanto cromosomales como plasmídicas fusionando una secuencia de β -galactosidasa (llevada por un MudI) con casi cualquier gene de E. coli. De esta forma, infectando una bacteria con este vehículo (placMu) era posible construir fusiones génicas que expresaran β -gal bajo las órdenes de cualquier promotor. Estos vectores ofrecen la ventaja de que una vez construidas, las fusiones pueden ser transferidas de una bacteria a otra por medio de una transducción mediada por λ mbda ó por transformación, si la fusión se lleva a cabo en un plásmido.

La cepa MX614/pKV3 fue infectada con los placMu 3 y 507.3, seleccionando aquellas que daban el fenotipo de inducción a 42°C (AmpR y Lac+ a 30°C y AmpR y Lac+ a 42°C).

Las cepas seleccionadas mostraron una segregación errónea del plásmido; esto es, cuando se purificaban por estria en cajas con indicadores para el fenotipo Lac, se obtenía siempre una mezcla de poblaciones: las inducibles y las que perdían la inducibilidad, que eran blancas tanto a 30 como a 42°C.

En varias ocasiones, cuando el fenotipo quería transferirse por transformación a otras cepas, también se obtuvieron mezclas que mostraban toda una gama de fenotipos. Al parecer, la inserción del fago se perdía dando origen a plásmidos sin fusión β -galactosidasa- σ 32, y era dependiente de la temperatura.

Se realizó una mutagénesis directa de los fagos (ver materiales y métodos) pero no se obtuvieron cepas estables.

Finalmente, se incubaron cepas inducibles a 42°C durante 5 horas y fueron espatuladas en medios selectivos a 30°C, haciéndose réplica en cajas de medio Mac Conkey para seleccionar las que aún conservaban inducibilidad. Se aislaron dos colonias inducibles y aparentemente estables, que fueron llamadas 2 y 8.

Estas presentaban diferencias en cuanto a la intensidad de la inducción, medida hasta este entonces por el color de la colonia en cajas con medio Mac Conkey a 30°C y 42°C. Los marcadores de Amp^R e inducción a 42°C eran cotransducibles más del 90%.

Se midió de manera cuantitativa la actividad de la β -galactosidasa en respuesta al calor en estas cepas. La primera vez, hubo que esperar 16 horas antes de observar algún cambio de color en el tubo de reacción, producido por la hidrólisis del ONPG.

Procedimos entonces a optimizar la medición de β -galactosidasa. Probamos distintas concentraciones de células, centrifugando el cultivo y resuspendiendo en un volumen menor. Todas las lecturas se hicieron con cultivos en fase exponencial temprana y en medio rico con ampicilina. Se ilustra el ejemplo de la cepa 2 en la figura 29.

Estandarizamos también la curva de hidrólisis del ONPG con respecto al tiempo, encontrando la fase lineal entre los 30 y 60 minutos de incubación a 28°C cuando concentrábamos 20 veces (figura 30).

Como cepa control, fue utilizada la KL16, una bacteria que tiene intacto el operón *lac* en su cromosoma. Esta no mostró ninguna inducción con respecto a la temperatura y una actividad específica 2,000 veces más alta que las fusiones (Datos no graficados).

Quando se hubieron estandarizado las condiciones, se midió actividad de β -gal en respuesta al aumento en temperatura a distintos tiempos. Cultivos de las cepas 2 y 8 se crecieron hasta fase exponencial temprana y después fueron incubados a 42°C, se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 5, 10, 20, 40, y 60 minutos después del cambio. Las actividades se encuentran graficadas en la figura 31.

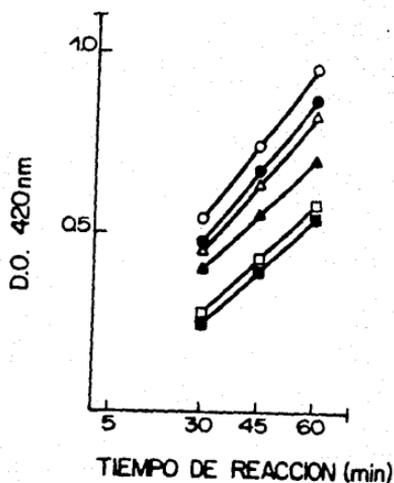
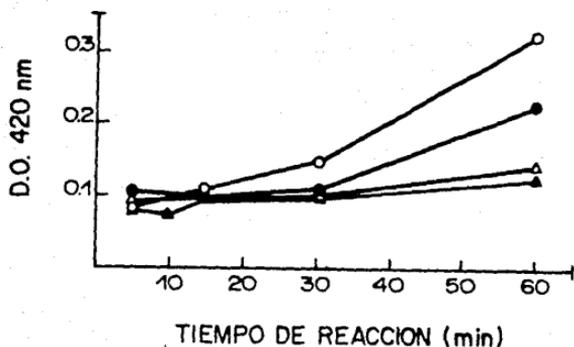
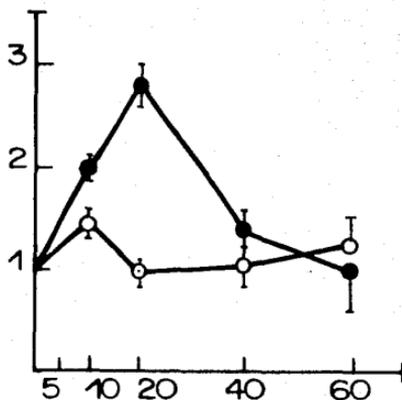


Figura 29. Fueron estandarizadas las condiciones para medir β -galactosidasa en las cepas con las fusiones 2 y 8. En la gráfica A se muestra la absorbancia a 420 nm (producida por la hidrólisis del ONPG) en muestras de la cepa 2 cuando era concentrada 2 (▲), 5 (△), 10 (●), y 15 (○) veces, habiendo crecido a 30°C.

En la figura 30, un cultivo de la cepa 2 fue concentrado 20 veces y se probó la linealidad de la reacción de hidrólisis de ONPG con respecto al tiempo de incubación a 28°C. Las muestras fueron tomadas a los tiempos 0 (■), 5 (□), 10 (▲), 20 (△), 40 (●) y 60 (○) minutos de exposición a 42°C. En ambos casos, las bacterias crecieron en medio rico hasta la fase exponencial temprana.

SINTESIS RELATIVA DE β GAL 42°/30°C



TIEMPO A 42°C (min).

Figura 31. Se muestra la inducción de la β -galactosidasa en las cepas 2 y 8 en respuesta a un cambio de temperatura, de 30°C a 42°C. La síntesis relativa de β -gal se calcula dividiendo la cantidad de β -gal a 42°C entre la obtenida a 30°C. Nótese que ambas fusiones se inducen, pero no en la misma magnitud ni al mismo tiempo. Los datos son el promedio de dos experimentos. (O) Fusión λ plasmid Mu2 y (•) λ plasmid MuB.

La cepa 8 tiene un máximo de inducción (casi tres veces) a los 20 minutos de exposición a 42°C. La número 2 no se induce en tal magnitud y su máximo se encuentra a los 10 minutos, para caer y volver a aumentar a los 60 minutos del cambio de temperatura.

Una vez caracterizadas cinéticamente fue necesario comprobar la presencia del plásmido con la fusión; el tamaño del plásmido es de +-75 kb, por lo que su purificación en cantidades suficientes para restricción o transformación se volvía una limitante. Además, la eficiencia de transformación era sumamente baja (menos de 100 transformantes por μ g de DNA).

Al probar otros inductores como etanol, se producía lisis en el cultivo de las dos cepas: los fagos resultantes daban una nueva mezcla de fenotipos.

Dada la poca utilidad que podían tener éstas fusiones para estudios posteriores, se decidió construir otra fusión: por inserción dirigida de un casete con actividad enzimática en un plásmido multicopia.

FUSION ropH::lacZ EN EL pKV3 POR INSERCIÓN DIRIGIDA

El pMC1871 (Casadaban, M., 1983) contiene un fragmento de 3 kb que codifica para la región estructural del gene lacZ, está flanqueado por dos sitios de policlonación y puede purificarse para realizar una inserción en otra secuencia que haya sido digerida con alguna enzima que deje extremos compatibles con los sitios de los "polilinkers".

Este gene no posee ninguna señal de inicio ni término de la transcripción o traducción.

De acuerdo con el mapa de restricción del pKV3, fue diseñada una estrategia para insertar, en fase con el marco de lectura de ropH, el fragmento de 3 kb del pMC1871 con el gene lacZ, ver la figura 32.

Fue digerido parcialmente el pKV3 con la endonucleasa PstI para obtener el plásmido lineal. Esto se logró realizando una cinética de digestión a tiempos cortos con cantidades limitantes de enzima. Se purificó por electroelución la banda de 4.0 kb y fue defosforilada.

Por otro lado, se obtuvo un fragmento de 3 kb del pMC1871 digerido con PstI.

Se transformó la cepa MX614 con la ligación y se obtuvo un plásmido con la inserción esperada. Fue caracterizado por restricción y llamado pCG27 (figura 33).

La actividad específica de la β -galactosidasa obtenida a partir de esta fusión genética era muy baja, así que hubo que estandarizar las condiciones de medición. Una vez logrado lo anterior, la cepa MX614/pCG27 fue crecida a 30°C en medio rico con ampicilina; cuando llegó a fase exponencial temprana se pasó a 42°C y fueron tomadas alicuotas para medir β -gal a los tiempos 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos de inducción.

En la figura 34 puede apreciarse que la fusión tiene un comportamiento oscilatorio con respecto al tiempo de incubación a 42°C. Otras fusiones en plásmidos multicopia (con galactocinasa, por ejemplo) se comportan del modo similar. En la figura 35 se grafican tanto el cambio en la actividad específica con distintos inductores (panel B), así como las variaciones en la cantidad de proteína en el cultivo (panel A).

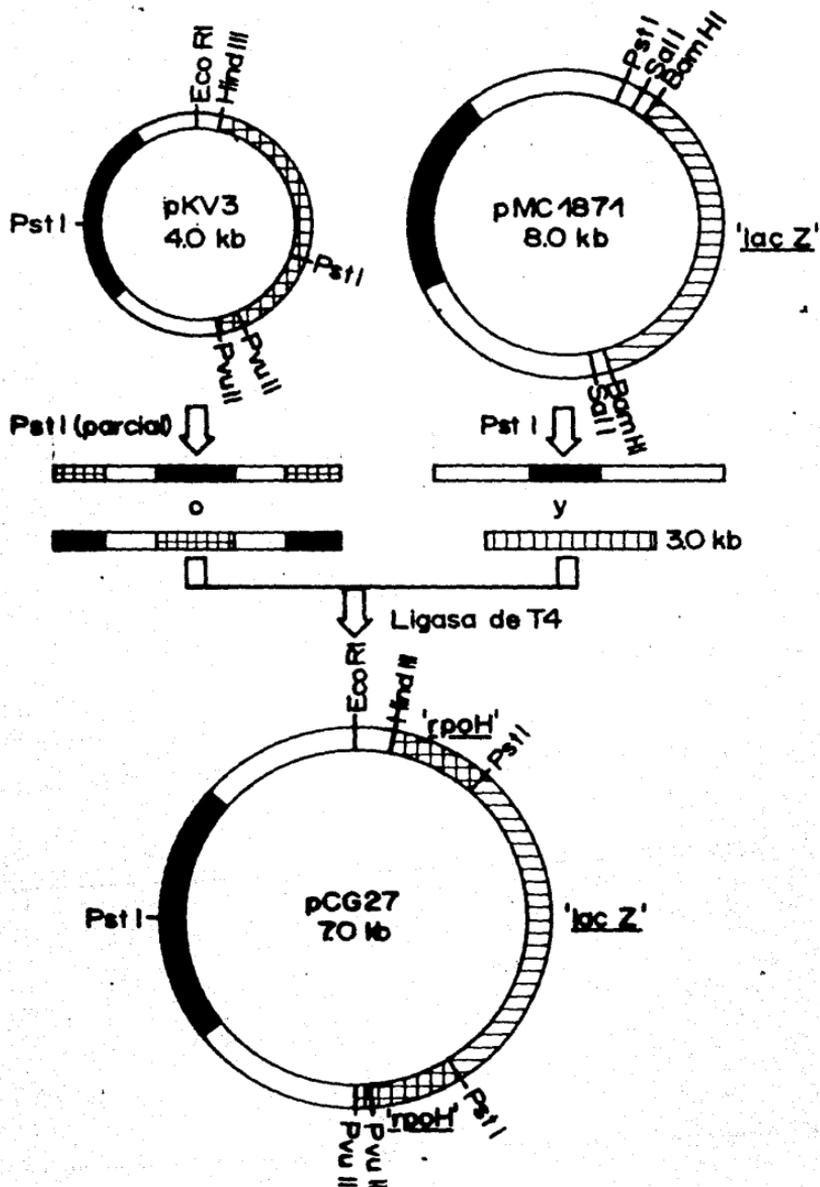


Figura 32. Esquema de construcción de una fusión σ^{32} - β gal en el plásmido pKV3 insertando un fragmento de 3kb del pMC1871 en el sitio PstI del pKV3.

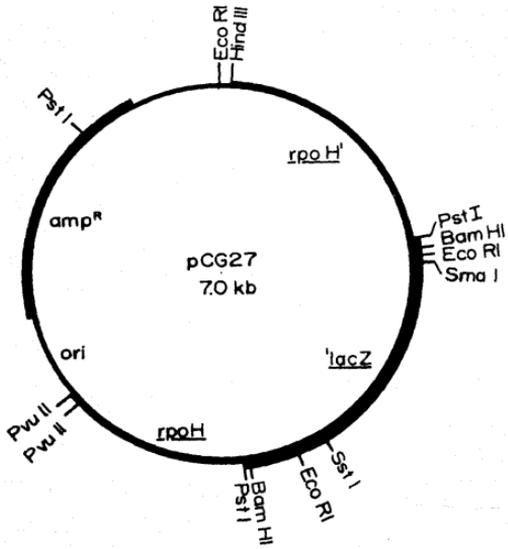
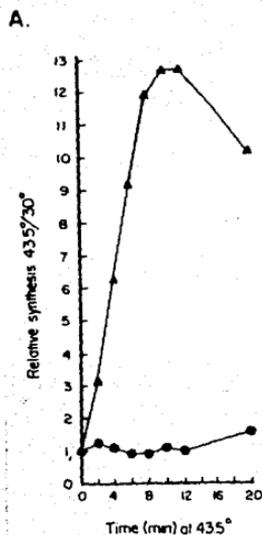
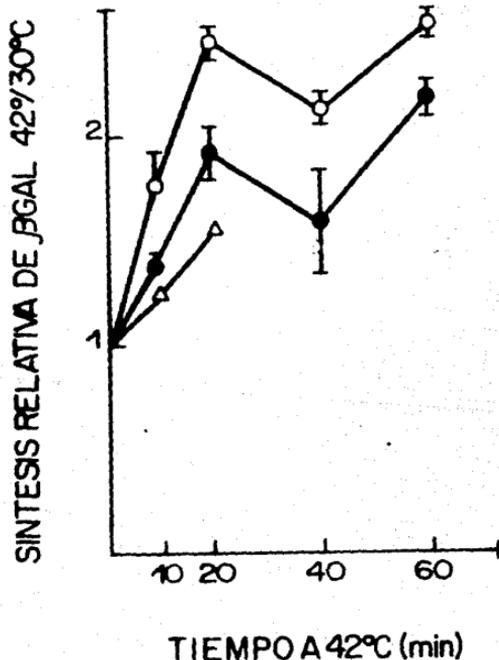


Figura 33. Estructura del pCG27. Se muestra una digestión representativa para comprobar la posición de los sitios de restricción. (1) λ +BstEII, (2) pCG27+HindIII, (3) pCG27+SmaI, (4) pCG27+EcoRI, (5) pCG27+PstI, X174+HaeIII, (6) pCG27+BamHI, (7) pCG27+EcoRI+HindIII.

Figura 34. A) Una fusión de σ^{32} con galactocinasa tiene una inducción oscilatoria con respecto al tiempo de incubación a 43.5°C (Erickson et al, 1987) (●). La inducción es mucho menor a la de la proteína DnaK (▲). En el panel B se muestra que la fusión hecha en el pCG27 tiene comportamiento oscilatorio y se induce en forma similar. (○) MX614/pCG27, (●) MX881/pCG27, CAG1400/pKP1 (▲).



B.



Se obtuvo una cinética de inducción muy similar a la reportada por Erickson y cols. en 1987 con una fusión del gene completo de pcgH con galactocinasa en un plásmido multicopia (figura 34b).

Sin embargo, la cantidad relativa de β -gal sintetizada a 42°C/ 30°C es mayor. Según nuestros datos, se induce 2.8 veces a los 20 minutos de exposición y no 1.4 veces, como la galactocinasa.

Dado que la de Erickson y la nuestra son fusiones con enzimas diferentes, la actividad enzimática en valores absolutos puede variar como consecuencia de los cambios de configuración que deben sufrir las enzimas al estar fusionadas con σ 32. Pero es importante hacer notar que el comportamiento de inducción con respecto al tiempo es muy similar.

Con los datos de cuantificación de σ 32 con anticuerpos obtenidos por Gross en 1987 (figura 19), se observa que la fusión no se incrementa tanto (2.8 veces vs 12 veces) ni en tan poco tiempo (20 minutos vs 7 minutos). Conserva, sin embargo, el carácter oscilatorio de la inducción, lo que quiere decir que si están operando los sistemas de control que modulan la cantidad y temporalidad de σ 32, pero no en el mismo grado que sobre la proteína silvestre y monocopia.

Realizamos mediciones de inducción con etanol al 5% a 30°C y los resultados pueden verse en la figura 35b; se observa que hay un incremento de actividad con respecto al tiempo de exposición al etanol que se mantiene pese a que la síntesis de proteínas sufre daños considerables (figura 35a). Esto podría indicar que también la proteína de fusión es estabilizada en condiciones de choque térmico, al igual que el σ 32 (Gross, 1987).

Cuando la fusión es introducida en una cepa reg A-, la actividad específica baja con respecto a una cepa silvestre, no así su comportamiento temporal (figura 36).

El pCG27 tiene una fusión inducible por los dos más estudiados inductores de la respuesta "heat-shock": temperatura y etanol; las desviaciones estándar de 4 experimentos hechos por separado se superponen en los valores de inducción, pero también puede observarse que el calor es el inductor más potente de la respuesta, siguiéndole el etanol (figura 37).

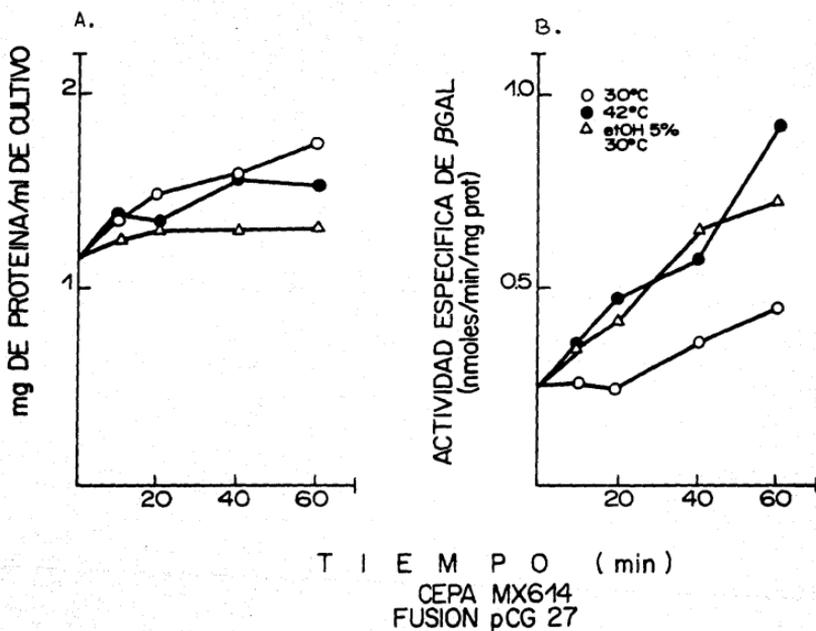


Figura 35. La cepa MX614 (silvestre), fue incubada a 30°C (○) en medio rico hasta fase exponencial temprana. Después de lo cual se incubó a 42°C (●) ó se añadió etanol (5% conc. final) (△). Se tomaron alicuotas a los tiempos señalados y se midió la cantidad de proteína por mililitro de cultivo [A]; además, se determinó la actividad específica de β -gal de las mismas muestras [B]. Se muestran los promedios de dos experimentos independientes.

Se obtuvo una cinética de inducción muy similar a la reportada por Erickson y cols. en 1987 con una fusión del gene completo de ppvH con galactocinasa en un plásmido multicopia (figura 34b).

Sin embargo, la cantidad relativa de β -gal sintetizada a 42°C/ 30°C es mayor. Según nuestros datos, se induce 2.8 veces a los 20 minutos de exposición y no 1.4 veces, como la galactocinasa.

Dado que la de Erickson y la nuestra son fusiones con enzimas diferentes, la actividad enzimática en valores absolutos puede variar como consecuencia de los cambios de configuración que deben sufrir las enzimas al estar fusionadas con σ 32. Pero es importante hacer notar que el comportamiento de inducción con respecto al tiempo es muy similar.

Con los datos de cuantificación de σ 32 con anticuerpos obtenidos por Gross en 1987 (figura 19), se observa que la fusión no se incrementa tanto (2.8 veces vs 12 veces) ni en tan poco tiempo (20 minutos vs 7 minutos). Conserva, sin embargo, el carácter oscilatorio de la inducción, lo que quiere decir que si están operando los sistemas de control que modulan la cantidad y temporalidad de σ 32, pero no en el mismo grado que sobre la proteína silvestre y monocopia.

Realizamos mediciones de inducción con etanol al 5% a 30°C y los resultados pueden verse en la figura 35b; se observa que hay un incremento de actividad con respecto al tiempo de exposición al etanol que se mantiene pese a que la síntesis de proteínas sufre daños considerables (figura 35a). Esto podría indicar que también la proteína de fusión es estabilizada en condiciones de choque térmico, al igual que el σ 32 (Gross, 1987).

Cuando la fusión es introducida en una cepa rec A-, la actividad específica baja con respecto a una cepa silvestre, no así su comportamiento temporal (figura 36).

El pCG27 tiene una fusión inducible por los dos más estudiados inductores de la respuesta "heat-shock": temperatura y etanol; las desviaciones estándar de 4 experimentos hechos por separado se sobreponen en los valores de inducción, pero también puede observarse que el calor es el inductor más potente de la respuesta, siguiéndole el etanol (figura 37).

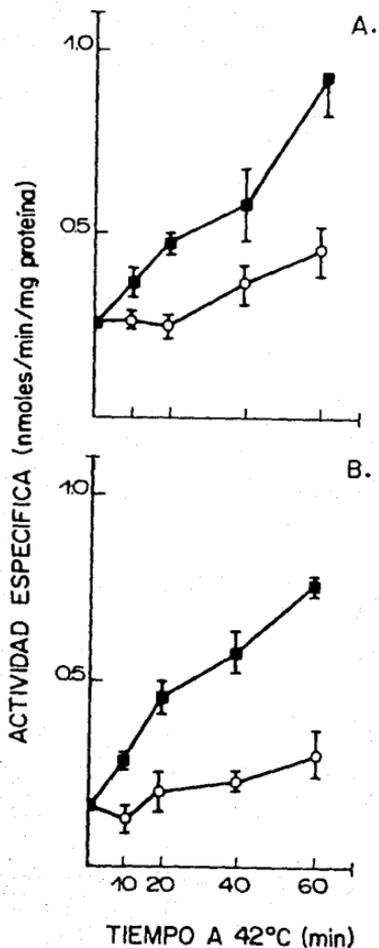


Figura 36. La cepa MX881 es lacZ^- . Cuando la fusi3n pCG27 se introdujo por transformaci3n y se midi3 actividad de β -gal (B), se observ3 que la actividad basal era ligeramente menor, y que la inducci3n era m3s notoria que en una cepa silvestre lacZ^+ [A], aunque los valores de actividad especifi3a eran inferiores. (O) 30°C, (●) 42°C. Se muestran valores promedio de 4 experimentos.

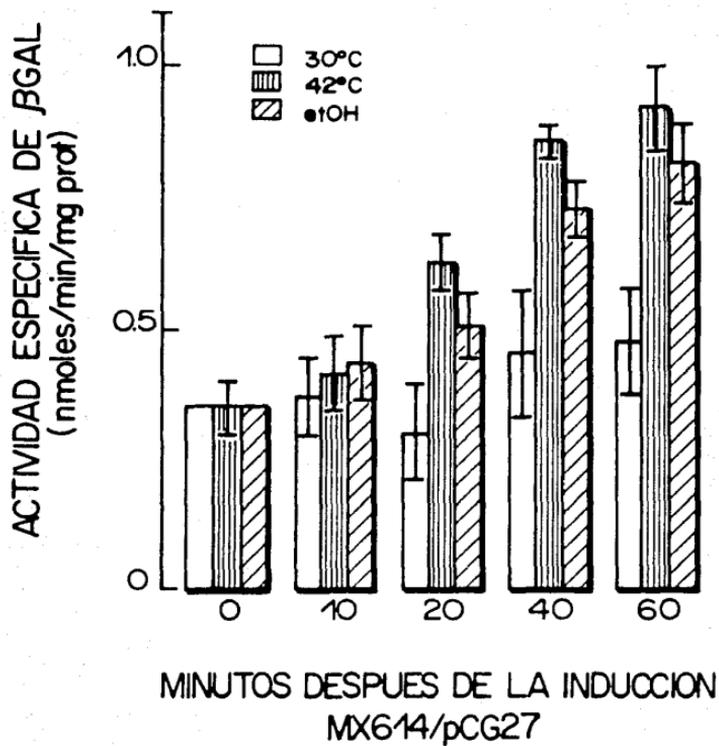


Figura 37. Actividades de la fusión pCG27.

No obstante que este plásmido permite estudiar la fisiología de la inducción de ppOH, tiene una actividad específica de 0.5 nmoles ONPG/min/mg de proteína, cantidad muy pequeña.

Para aislar mutantes en inducibilidad, se presentan dificultades en este plásmido, porque no presenta un fenotipo fácilmente detectable en cajas con Xgal. Únicamente cuando se incuba por tiempos prolongados logra observarse el color azul característico.

Se decidió construir entonces una fusión que no conservara ambos extremos del $\alpha 32$.

FUSION ppOH::lacZ EN EL pMC1403

El pMC1403 (Casadaban, 1983) es un plásmido derivado de pBR322, de 10 kb, que tiene clonado parte del operón lac de *E. coli*. Posee los genes lacY y lacA completos; lacZ tiene una delección del inicio de la traducción. Al principio de lacZ se encuentra un sitio de policlonación.

Fue construido el pCG29 según el esquema mostrado en la figura 38. El pKV3 se digirió con las enzimas EcoRI y Hae III, fue electroeluido un fragmento de aproximadamente 240 pb que contiene la región promotora de ppOH, 29 aminoácidos del gene estructural y un fragmento de 29pb del pBR322 (figura 39).

La ligación se llevó a cabo con el pMC1403 digerido con EcoRI y SmaI, después de defosforilarlo. Se transformó la cepa MX614 y se obtuvieron colonias con un fenotipo ligeramente inducible a 42°C.

La construcción correcta fue comprobada por restricción.

La actividad específica de β -gal de este nuevo plásmido fue mil veces más alta que la del pCG27. Se puede observar un aumento de actividad en respuesta a un incremento en la temperatura, pero no es coincidente con la cinética reportada ni con la obtenida con el pCG27 (figura 40).

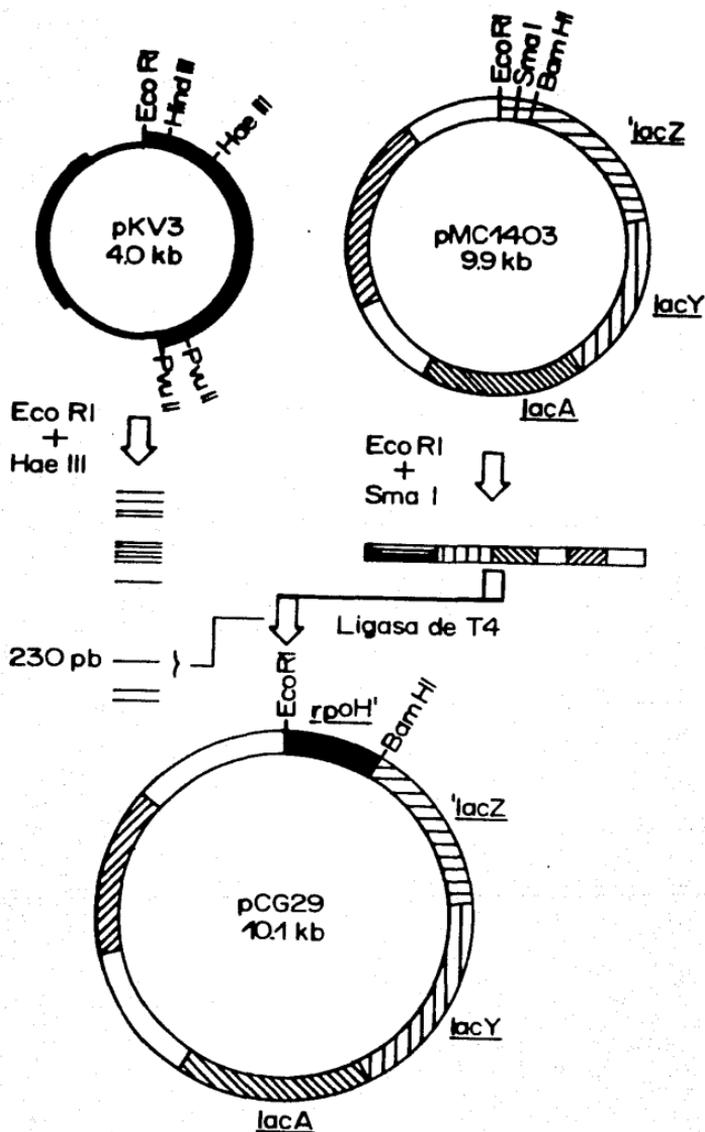


Figura 38. Esquema de construcción de la fusión pCG29. Se insertó un fragmento de 240 pb al pMC1403 para tener una proteína que ya no conservara el extremo carboxilo de σ_{32} y solo muy poco de su extremo amino terminal.

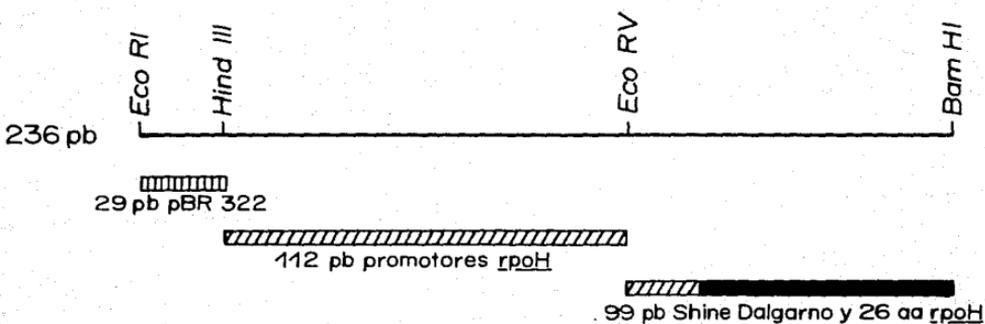


Figura 39. Fragmento de 236 pb insertado en el pCG29. Contiene secuencias de pBR322, la región promotora de rpoH, su Shine-Dalgrano y 26 aa del extremo amino terminal.

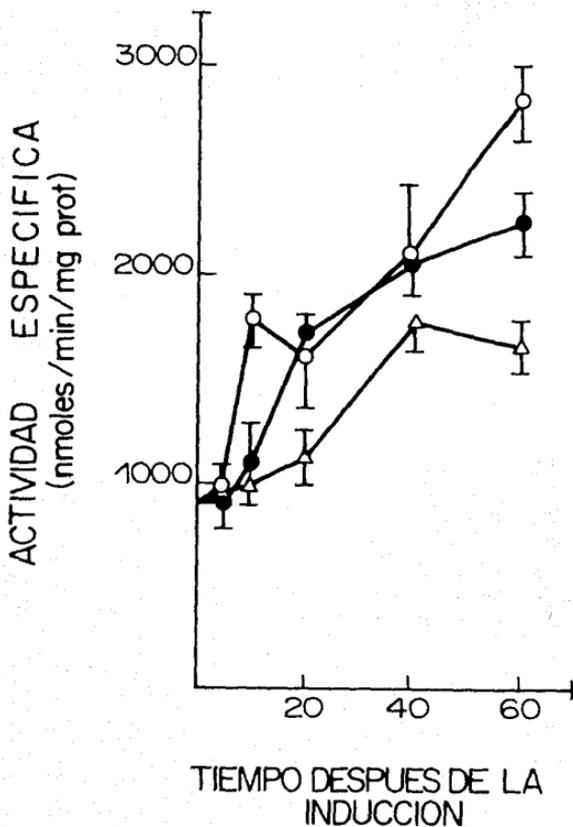


Figura 40. Se muestra la actividad específica de la fusión en el pCG29. Es mucho más alta que en el pCG27 y puede observarse una inducción específica a los 10 minutos de incubación a 42°C (○), también se induce con etanol (●), y la actividad basal a 30°C (△) es elevada. Se muestran datos de 4 experimentos. A los 20 minutos a 42°C, la actividad decrece.

Se observa un aumento drástico a los 10 minutos de exposición a 42°C, pero después decrece para volver a aumentar a los 60 minutos.

Desde luego, hay más actividad de β -gal con los inductores de "heat-shock" que sin ellos, pero el comportamiento temporal de la inducción no es el mismo.

Vale la pena preguntarse, por otro lado, si el incremento en la actividad basal de la fusión se debe a que ya no posee las secuencias de ppgH que afectaban la actividad enzimática en el pCG27 ó si ya no conserva los sitios de regulación postraduccionnal de la proteína σ_{32} , por lo tanto, su vida media es distinta y tal vez, su activación (si ésta existe).

Analizando el comportamiento de ésta fusión cabe preguntarse si el control transcripcional que se ejerce a nivel de los promotores del gene ppgH es el responsable de la cantidad de σ_{32} cuando hay un choque calórico, o si es un control traduccionnal o de proteólisis el más importante.

La fusión hecha en el pCG29 puede utilizarse para estudios que involucren el aislamiento de mutantes: su gran actividad específica permite que éstas sean fáciles de identificar por el color de las colonias a que da origen en un medio con Xgal.

Decidimos mutagenizar la región promotora y los primeros aminoácidos de ppgH clonados en el pCG27 según la estrategia descrita en la sección de materiales y métodos y mostrada en la figura 41.

MUTAGENESIS DE LA REGION REGULADORA DE ropH EN EL pCG29

Lo primero que se realizó fue tratar al pCG29 con 0.5M de hidroxilamina a 75°C durante 30 minutos y transformar a la cepa MC1061. Se seleccionaron las bacterias que presentaban un fenotipo anormal de inducción en cajas con medio mínimo con Xgal a 30°C y 42°C. Las mutaciones aisladas de ésta manera podían estar en cualquier parte del plásmido, así que se decidió subclonar el fragmento de 240 pb que contenía los promotores y las primeras bases del gene ropH cortando con las enzimas Eco RI y BamHI el plásmido mutado, y ligando con un pMC1403 completamente silvestre cortado con las mismas enzimas, para aislar solamente aquellas mutaciones que estuvieran en la región reguladora. Esta segunda transformación se hizo en la MX614.

Fueron seleccionadas 4 mutantes que presentaban un fenotipo de actividad muy disminuida y no inducible por calor; una de ellas tenía una ligera inducción con etanol.

Pueden verse en la figura 42 las actividades enzimáticas de los cuatro mutantes, que fueron llamadas pCG292, pCG297, pCG2912 y pCG2914. Resalta claramente la muy baja actividad específica que presentan, comparadas con el plásmido silvestre (de +- 1000 a 5 ó menos nmoles de ONPq/min/mg de proteína). Además es claro que sólo la mutante pCG297 presenta una inducción con calor superior a la inducción con etanol. Las demás han dejado de inducirse por calor y sólo aumentan su actividad cuando se trata a las células con etanol al 5%.

Hay que hacer notar, además, que la síntesis basal de β -galactosidasa, que normalmente se incrementa al aumentar la densidad celular (pCG27 y pCG29), no sufre en estas mutantes, ningún cambio significativo.

Los fragmentos de 240 pb fueron clonados en el plásmido pTZ 18R, digiriendo el pMC1403 con Eco RI y Bam HI; el pTZ 18R se digirió con las mismas enzimas.

Cada fragmento fue secuenciado por el método de Sanger (descrito someramente en la sección de materiales y métodos).

Ninguna de las mutantes tenía cambios en la zona de ropH que secuenciamos (figura 43).

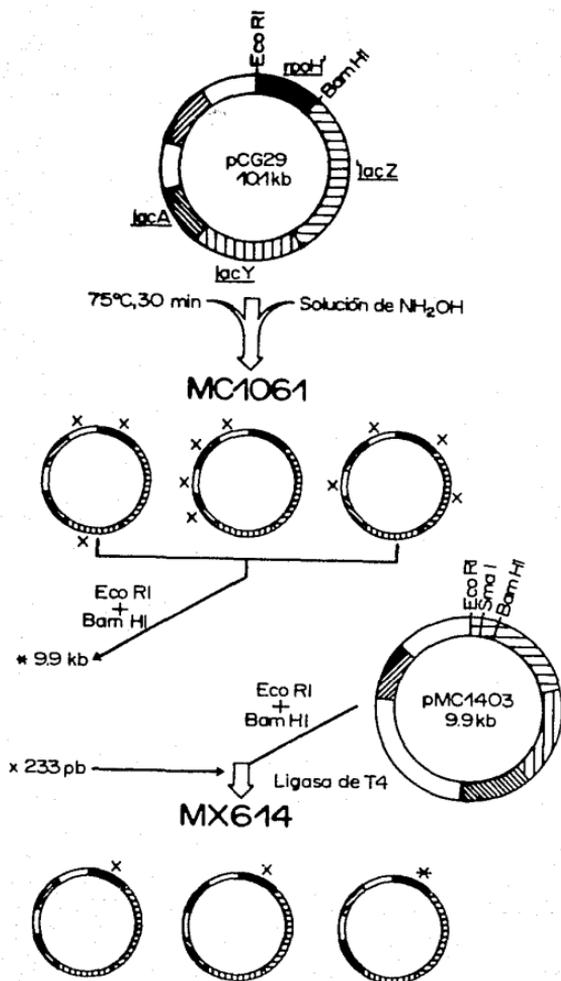


Figura 41. Estrategia de mutagénesis con hidroxilamina de la zona de promotores y primeros aminoácidos de *ppgH*. Se incubó el pCG29 con hidroxilamina y se transformó la cepa MC1061; se seleccionan mutantes que son digeridos con *EcoRI* y *BamHI* para reconstituir el fragmento de 240 pb en un pMC1403 que no haya sido mutagenizado. Las bacterias resultantes, deben contener mutaciones en la región de interés.

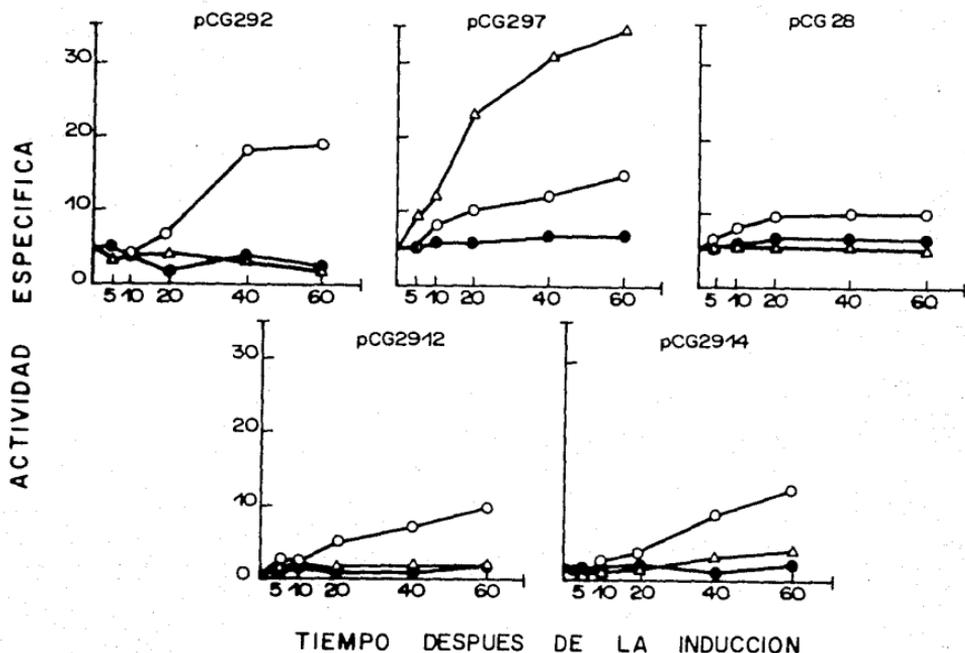


Figura 42. Fueron obtenidas 4 mutantes por tratamiento con hidroxilamina. Todas tienen una actividad baja comparada con la observada en la fusión silvestre. Sin embargo, es posible observar una inducción diferencial de la actividad en respuesta a calor y etanol 5%. (●) 30°C, (Δ) 42°C, (○) etanol 5%. Es observable que cuando aumenta el tiempo de incubación a 30°C no se manifiesta un aumento en la actividad basal, como en el caso de las fusiones pCG27 y pCG29. El pCG28 es una mutación espontánea.



Figura 43. Fueron clonados los fragmentos de 240 pb en el pTZ 18R para su secuencia. En la fotografía se muestra un gel representativo de secuencia. No se encontró ninguna mutación en la zona secuenciada de las mutantes.

Repetimos la subclonación de un fragmento silvestre en el pMC1403 y se observó que una de las enzimas utilizadas, BamHI, probablemente estaba contaminada con una endonucleasa: al incubar el plásmido silvestre con ésta enzima, se obtenían mutantes con fenotipos iguales a los que aislamos.

Las mutaciones obtenidas se encuentran entonces en alguna región de lacZYA u otra parte del plásmido que nosotros habíamos tomado como silvestre. Esto en cierto modo explica porqué la actividad tan baja en todas las mutantes. No secuenciamos los genes lacZYA para buscar las mutaciones.

Sin tomar por el momento en cuenta que no se obtuvieron mutaciones en la región regulatoria de ppcH, debe quedar claro que al parecer, fueron obtenidas mutaciones en una región estructural que semejan los efectos de inducibilidad diferencial, esperados para una mutante en la región de control.

En otro intento de obtener mutantes por hidroxilamina en esta zona, se aplicó el tratamiento mutagénico al plásmido pT2 con el fragmento de 240 pb del ppcH silvestre y se secuenciaron directamente las posibles mutantes para después reconstituirlas en el pCG29. Fueron secuenciadas 10 clonas y fue aislada una que al parecer tiene una inserción de TTT en el promotor no. 4, el más cercano al gene estructural y sensible a superenrollamiento. No se ha reconstituido en el plásmido silvestre para medir expresión porque aún hay dudas en su secuencia. En el análisis, no se encontraron mutaciones puntuales.

EL PLASMIDO pCG28 Y LA CEPA MX1231: LA TRADUCCION DURANTE UN CHOQUE TERMICO

Surgió en estos experimentos una mutación espontánea, que fue secuenciada (figura 44), hallándose que es una inserción de 211 pb, que interrumpe el codón 26 del gene ppcH clonado en el pCG27 y que tiene un codón sin sentido (UGA). Este plásmido no es inducible por choque calórico, pero sí por etanol (figuras 42 y 45).

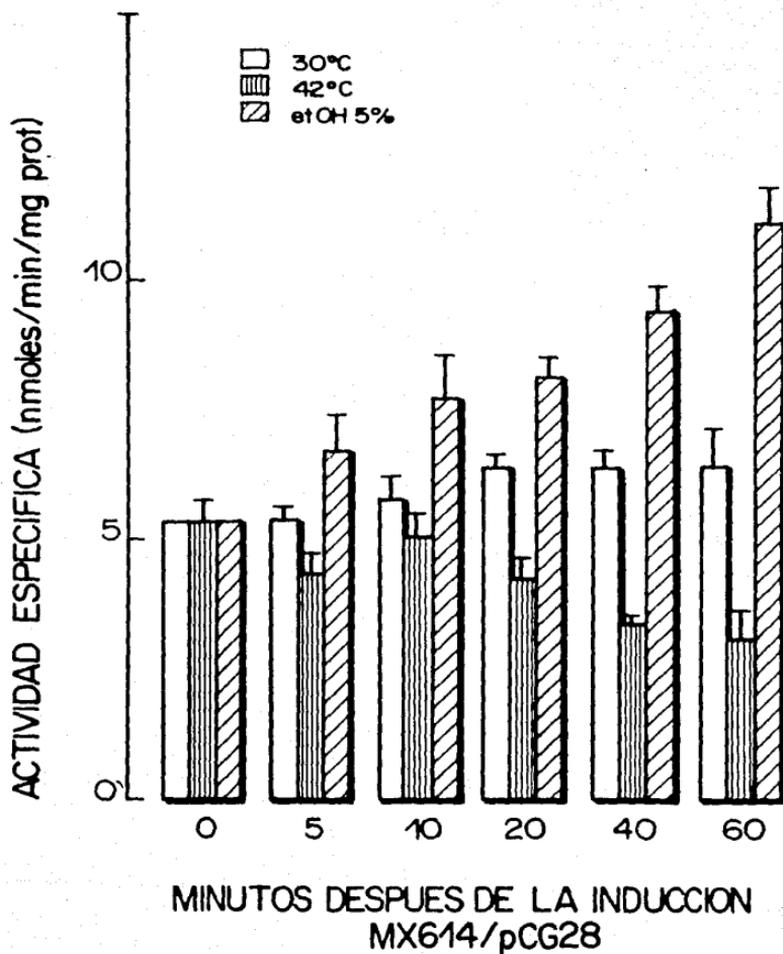


Figura 45. El pCG28 muestra un aumento de actividad enzimática cuando la bacteria es expuesta al etanol, pero no al calor. Si suponemos que la inducción aparente es por supresión fenotípica del codón ópalo, es obvio que a 42°C no se lleva a cabo. Datos de tres experimentos independientes.

El pCG28 es un monitor sencillo de usar para medir por actividad enzimática, la supresión fenotípica ocasionada por distintos agentes. Analizando el comportamiento de este plásmido mutante, parece que el choque calórico no induce errores en la lectura del código genético, ya que no hay aumento de β -gal cuando se transfiere de 30 a 42°C.

Gorini et al., en 1967 reportaron el "enmascaramiento fenotípico" de codones ámbar cuando se añadía etanol a un cultivo de bacterias.

El hecho de que a 42°C no hay supresión fenotípica es sugerido no solamente por el comportamiento del pCG28, que no se induce, sino también por el estudio de una mutante ámbar en ppqH. Esta cepa fue aislada por Yura (1966) y se llama KY1924.

En el laboratorio, fue realizada la siguiente transducción:

P1(KY1429) x MX1230 --->Asd+ [ts]

para tener la mutación ppqH6 en el fondo genético de la MX614, nuestra cepa silvestre. A esta nueva cepa se le llamó MX1231.

La mutación ts-6 de Yura es una mutación puntual en el codón número 75 del gene ppqH. Cambia el codón para el aminoácido glutamina CAG por el codón ámbar, UAG.

Aunque se ha reportado que las bacterias con una delección de ppqH no pueden vivir a temperaturas superiores a 10°C, la MX1231 crece igual que una silvestre a 30°C. Sin embargo, cuando se ha crecido hasta fase exponencial temprana y se le da un choque calórico a 42°C, la cepa sufre lisis celular dos horas después del cambio de temperatura (figura 46).

Cuando se añade etanol, no hay lisis celular, presumiblemente porque el codón ámbar es suprimido fenotípicamente, de la misma manera como ocurre la supresión del codón ópalo en el pCG28.

Aparentemente, hay suficiente supresión fenotípica a 30°C como para permitir que la MX1231 sobreviva y para detectar actividad de β -gal en el pCG28. Sin embargo, a 42°C es evidente que no hay supresión del codón ópalo (baja actividad de β -gal) y no hay σ 32 para que la mutante evite la lisis.

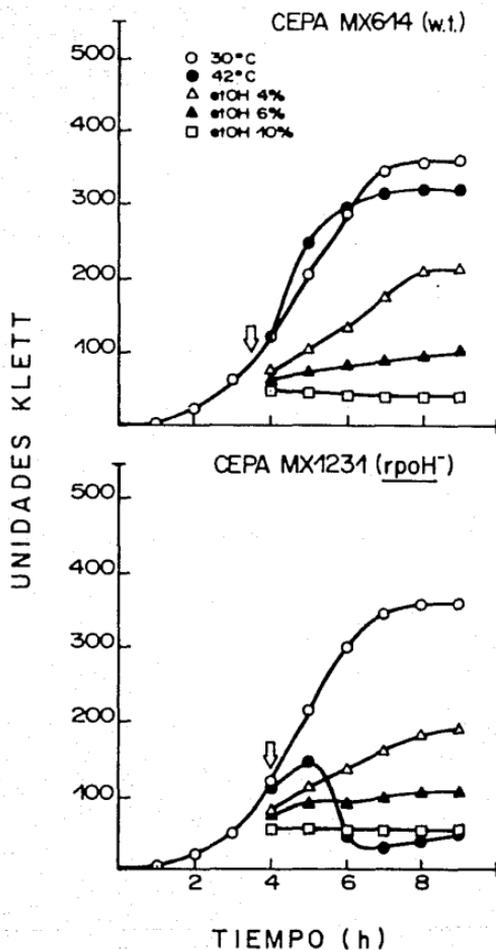


Figura 46. Cuando una cepa con un codón ámbar en rpoH (MX1231) es expuesta al calor, sufre lisis celular a las dos horas del cambio de temperatura. No así con etanol en varias concentraciones. Se muestran curvas de crecimiento y la flecha indica cuando se pasaron de 30° a 42°C las bacterias ó cuando se añadió etanol.

COMPLEMENTACION DE LA MX1231

Esta mutante no es complementada por el plásmido pKV3 (figura 47).

Cuando se transforma la cepa MX1231 con el plásmido pKV3, en medio LB con ampicilina a 30°C crece igual que una cepa silvestre. A pesar de tener clonado en multicopia el gene para el σ_{32} , un gene que es expresado (por lo menos se produce mensajero y las fusiones en él se expresan), la bacteria sufre lisis celular después de dos horas a 42°C, como si no lo tuviera. Estos resultados no son iguales a los reportados por Yura en 1985. La forma en que estos investigadores midieron complementación fue por cuenta viable a 30°C después de un choque de una hora a 42°C; nosotros realizamos una curva de crecimiento y al parecer, a largo plazo, el σ_{32} sintetizado a partir del plásmido no puede contender con el aumento en la temperatura.

Una bacteria silvestre (MX614) no sufre ninguna alteración aparente por la presencia del plásmido.

Como el pKV3 no lleva toda la región reguladora del gene ppgH (recordemos que falta el promotor más lejano), podría pensarse que el promotor 1 juega un papel esencial en la síntesis de σ_{32} y, por tanto, en la respuesta al calor. Pero también es posible que la mutación cromosomal sea dominante sobre el gene silvestre.

Fueron clonados los dos genes completos, tanto el de la MX614 como el de la MX1231.

La clonación se realizó utilizando el mapa físico del cromosoma de *E. coli* publicado por Kohara et al. en 1988. Están mapeados los sitios de 6 enzimas de restricción en todo el cromosoma de la bacteria, así que pudimos localizar un fragmento de 10 kb que contiene todo el gene ppgH, parte del gene ftsX y todo el gene livJ.

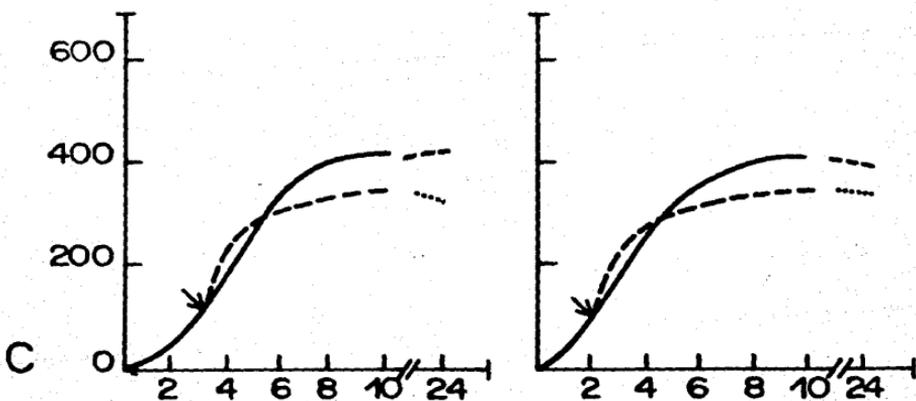
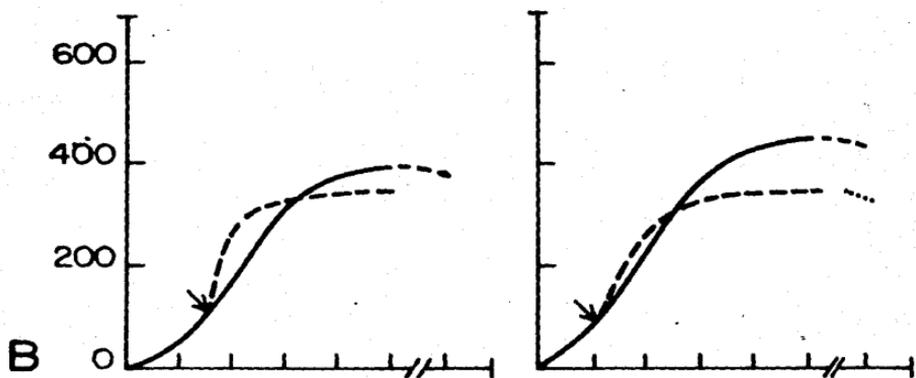
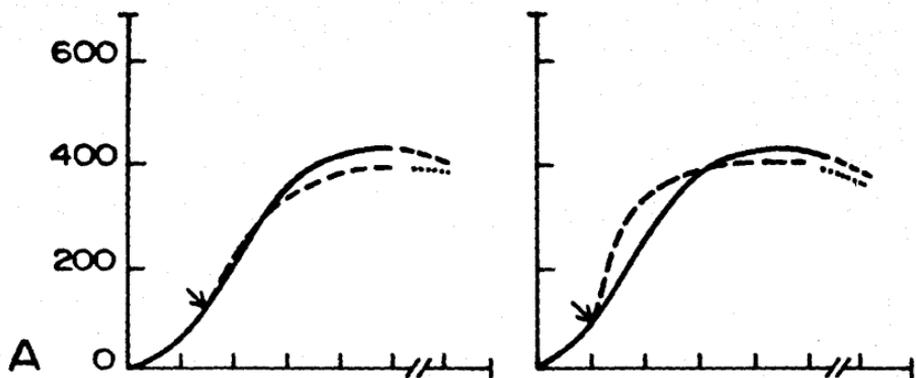
Este fragmento se obtiene al digerir todo el DNA cromosomal con la enzima Eco RI. Decidimos clonarlo en el sitio Eco RI del pTZ 18R.

Primero, se extrajo DNA cromosomal de las cepas MX614 y MX1231, que fue digerido con EcoRI. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% junto con un marcador de peso molecular. Fueron electroeluidos los fragmentos que tenían un tamaño de 8 y 11 kb.

Figura 47. Curvas de crecimiento de las cepas MX614 (48.1) y de la MX1231 (48.2). Crecidas a 30°C (gráficas del lado derecho) ó a 42°C (gráficas del lado izquierdo) hasta la fase exponencial temprana, donde el cultivo fue dividido en dos partes: una que siguió creciendo a 30°C (—) y otra que se incubó a 42°C (---). Los precultivos se incubaron a 30 o 42 según el experimento y el cambio de temperatura está señalado por la flecha negra. Se analizaron cepas sin transformar (A), transformadas con el pBR322 (B) y transformadas con el pKV3 (C). Nótese que la mutante MX1231 sufre una lisis después del choque pero crecen revertantes ó supresoras que son termorresistentes.

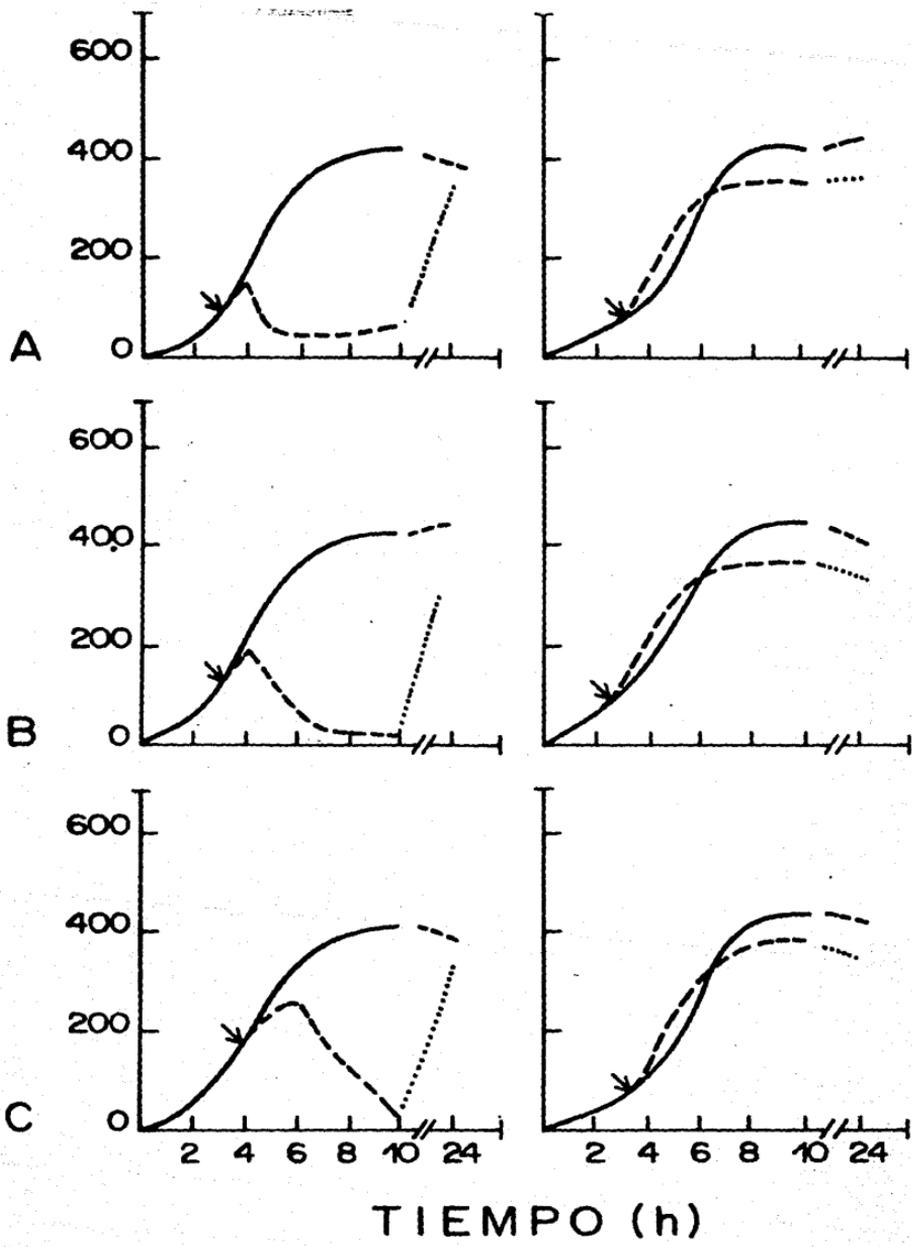
El pKV3 no complementa la mutación, no conocemos la naturaleza de la dominancia del fenotipo mutante sobre el silvestre.

U. KLETT



TIEMPO (h)

U. KLETT



Este DNA se ligó con pTZ 18R digerido con la misma enzima y defosforilado con BAP. Se transformó la cepa JM103, seleccionando las colonias blancas Amp^r en medio con Xgal, a 30°C.

Fueron obtenidas alrededor de 1,000 colonias blancas por cada minibiblioteca. Las transformantes se agruparon en conjuntos de 10 colonias cada uno y se hicieron extracciones de plásmido (minipreps).

Los plásmidos se gotearon en nitrocelulosa y se realizó una hibridación DNA-DNA (Southern 1975) utilizando como sonda el fragmento Hind III- Pvu II del pKV3. En la figura 4Ba se muestra un filtro representativo con muestras de plásmidos de las minibibliotecas.

Fueron seleccionados 2 lotes positivos y se extrajo plásmido nuevamente para repetir la hibridación que se observa en la figura 4Bb. En un gel de agarosa, éstos plásmidos muestran un gran tamaño, aún no han sido digeridos.

Se transformaron las cepas MX614 y MX1231 con los plásmidos que llevan el gene ppoh silvestre (pRPOH1) y mutante (pRPOH2); fueron parchadas en LB con ampicilina a 30°C y 42°C. Los resultados se encuentran en la tabla VIII.

CRECIMIENTO

C E P A	PLASMIDO	30°C	42°C
MX614		+	+
MX1231		+	-
MX614	pKV3	+	+
MX1231	pKV3	+	-
MX614	pRPOH1	+	++
MX1231	pRPOH1	+	-
MX614	pRPOH2	+	+
MX1231	pRPOH2	+	-

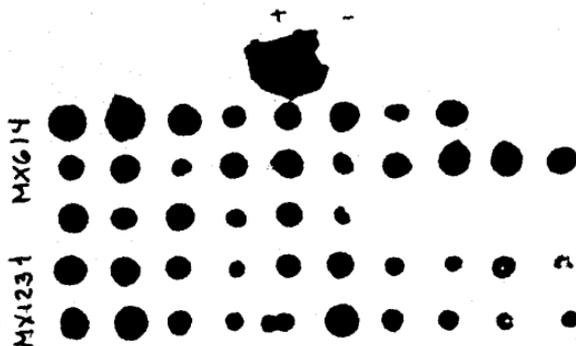
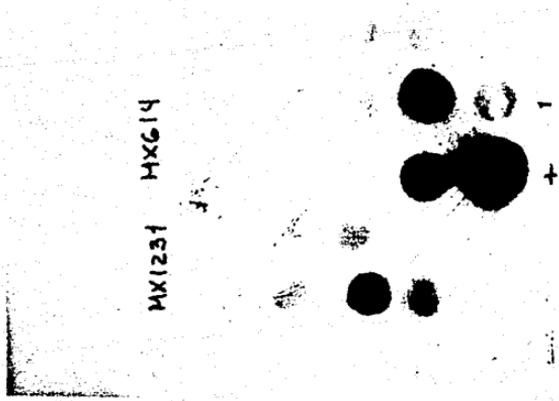


Figura 4B. A) Se construyeron minibibliotecas con los fragmentos de 8-11 kb del genoma total de la MX614 y la MX1231 digeridos con la enzima EcoRI. Para detectar las transformantes que llevaran el gene *rpoH* completo, se realizó una hibridación Southern de lotes de 10 transformantes cada uno.

B) Cuando se hubieron identificado lotes positivos, se repitió la hibridación para encontrar clonas individuales con los plásmidos deseados. Se obtuvieron los plásmidos pRPOH1, con el gene silvestre y el pRPOH2, con el mutante.



Esto parece indicar que la mutación que tiene la MX1231 es dominante sobre el gene silvestre, aún cuando presumiblemente se encuentre completo.

Cabe hacer notar que la cepa MX614 con el plásmido silvestre no crece muy bien a 42°C; no conocemos el efecto que pueda tener ppcH en multicopia con todos sus promotores funcionales clonados.

Decidimos probar si la mutación era dominante también sobre una sola copia del gene ppcH, introduciendo por conjugación un F' con la región del minuto 76 del cromosoma.

La cepa KL708 lleva un episoma (KLF41) que entre otros, lleva los genes ppcH y argG. Para estar seguros de que el episoma se encuentra en las cepas transconjugantes, se utilizan cepas Arg-, así el episoma complementa la mutación dando el fenotipo Arg+.

Se construyeron los derivados argG de la MX614 y la MX1231.

A partir de la cepa MX971 (argG) se pueden construir haciendo la siguiente transducción negativa:

P1 (MX971) x MX1231 ----> Arg-, [ts]

Para evitar este paso, se decidió realizar las siguientes transducciones:

P1 (CAG12153) x MX971 ----> Tet r [Arg-] (MX1084)

P1(MX1084) x MX1231 ----> Tet r [Arg-, ts] (MX1301)

Después se hizo la siguiente conjugación:

KL708 x MX1301 -----> Arg+, Tet r [30°C]

KL708 x MX1084 -----> Arg+, Tet r [30°C]

Cuando las exconjugantes se parcharon a 30° y 42°C, todas resultaron ser termosensibles. Los controles de las cepas sin conjugar, eran Arg-, pero termosensibles también.

No sabemos cual sea la relación entre la resistencia a tetraciclina y la termosensibilidad, pero es un evento altamente reproducible, incluso con cepas que tienen un Tn10 insertado en otras partes del cromosoma.

A la fecha, se realizan los preparativos para realizar la transducción negativa señalada anteriormente y poder efectuar la conjugación.

D I S C U S I O N

La variedad de tratamientos como un incremento en la temperatura, etanol, infección por fagos y otros que inducen la expresión de las proteínas de "heat-shock" sugiere que es posible disparar la respuesta por distintos mecanismos, resultando en una transcripción incrementada de uno o más promotores de *rrpH*.

Este efecto es observable en experimentos de Northern y mapeo por S1. *rrpH* es una unidad transcripcional como hay pocas en *E. coli*:

1) El promotor 1 (P1) y el promotor 4 (P4) se transcriben por $\sigma 70$ in vitro; no así el promotor 3 (P3) (Erickson et al. 1987).

2) Después de un aumento en la temperatura, el nivel de transcrito se incrementa con P2 y P3 aumentándose mucho más que los otros (Erickson et al, 1987).

3) La proteína Dna A que está involucrada en iniciación de la replicación del DNA regula la expresión de P3 y P4 (Wang et al., 1989).

La transcripción diferencial de los genes es, como ya revisamos, una de las estrategias más utilizadas para regular su expresión. Sin embargo, no es la única.

Al construir fusiones genéticas *rrpH::lacZ* utilizando los bacteriófagos λ placMu, obtuvimos dos fusiones que se comportaban de manera distinta en cuanto a su actividad específicas. Esto fue explicado suponiendo que las fusiones se encontraban a distintos niveles del gene y que la enzima tenía conformaciones diferentes. Sin embargo, también eran distintas en su inducción temporal.

Con la fusión en el pCG27, que tiene intervenido el gene *rrpH* con el gene *lacZ* construimos una proteína que conserva tanto el extremo amino como el carboxilo de $\sigma 32$. La actividad específica es baja y suponemos que se debe a la configuración del polipéptido híbrido. Este plásmido tiene una inducción máxima a los 20 minutos de exposición a los inductores de la respuesta calórica, al igual que la fusión λ placMu B.

Liberada del extremo carboxilo pero conservando el extremo amino (26 aa), la fusión en el pCG29 tiene una enorme actividad específica pero un máximo de inducción al mismo tiempo que la λ placMu 2 (10 minutos).

Si las fusiones pCG27 y pCG29 difirieran en su actividad enzimática pero fueran iguales en su cinética de inducción, podría pensarse que está operando el control transcripcional del gene, porque ambas fusiones están bajo el control de la misma región regulatoria.

Pero no solo son distintas en cuanto a su actividad, sino que también en su inducción temporal. Esto puede indicar que en el control de la cantidad de $\sigma 32$ pueden intervenir secuencias de la propia proteína, alterando, por ejemplo, su vida media.

Mientras muchos genes de *E. coli* se regulan a niveles transcripcionales y traduccionales, muchas de las proteínas hechas como resultado de esa inducción y represión son por sí mismas estables (Mosteller, R. D., 1980; Pine, 1970) y solo se pierden en la célula por dilución durante el crecimiento celular.

Un pequeño grupo de proteínas, sin embargo, 1) pueden ser degradadas más rápidamente bajo ciertas circunstancias o 2) son inestables por naturaleza (con vidas medias inferiores al tiempo de doblaje de las células). En el primer caso, la regulación de la degradación puede ser un buen "switch" regulatorio para la célula. En el segundo caso, el alto nivel de recambio constitutivo indica que la regulación a nivel de la síntesis puede cambiar rápidamente los niveles de proteína.

Estas dos posibilidades no son excluyentes: las proteínas inestables pueden ser estabilizadas en ciertas condiciones.

El gene *lon* codifica para una proteína de choque térmico cuya expresión aumenta a 42°C. Las células que no inducen "heat-shock" son deficientes en proteólisis.

El hallazgo de que el producto de *ropH* es por sí mismo inestable sugiere que esa inestabilidad puede ayudar a limitar las cantidades funcionales de RpoH.

El $\sigma 32$ no se estabiliza en mutantes *Lon-*, lo que indica que su proteólisis debe estar mediada por una proteasa diferente.

Se piensa que el choque calórico puede inducir además de *Lon*, otras proteasas, una de las cuales debe ser la encargada de degradar al $\sigma 32$.

Las secuencias de ppH unidas a β -gal podrían cambiar la estructura tridimensional de tal manera que la fusión fuera más o menos sensible a la proteasa específica de $\sigma 32$. Si esto fuera cierto, existiría un sistema de proteasas que también fuera inducido diferencialmente: una a los 10 minutos, que fuera la encargada de degradar a la fusión del pCG29, para que no siguiera aumentando, y otra a los 20 minutos, encargada de degradar a la fusión pCG27.

Estas proteasas deberían tener una inducción periódica también, dado que el pCG27 aumenta de nuevo a los 60 minutos, al igual que el pCG29.

De ser verdad lo anterior, uno de los blancos de los inductores de la respuesta pudiera ser este sistema proteolítico; y la cantidad de $\sigma 32$ en condiciones normales dentro de la célula sería modulado por una degradación eficiente en ciertos tiempos críticos.

Un tercer mecanismo que podría intervenir en la cantidad de $\sigma 32$ dentro de la célula podría actuar a nivel de la traducción.

Los mensajeros producidos provenientes de los distintos promotores, podrían ser diferencialmente traducidos en casos de estrés. Lo anterior estaría mediado por las secuencias líder de los mRNAs; recordemos que, por ejemplo el P1 lleva una región líder de por lo menos 200 pb con una estructura probable de tallo-asa (ver introducción). Por otro lado, muchos inductores de la respuesta actúan a nivel de la traducción: análogos de aminoácidos, puromicina, etanol, etc., pueden afectar la fidelidad; probablemente también puedan modificar al ribosoma para traducir preferencialmente algunos mensajeros.

El interés en lo anterior nos llevó a la mutagénesis con hidroxilamina de la fusión pCG29 para encontrar mutantes afectadas en inducibilidad y caracterizar el sitio donde se encontraban.

No obtuvimos ninguna mutación en la región de ppH, pero las mutantes (que deben estar en alguna parte de la zona estructural de la β -galactosidasa) tienen un fenotipo de inducibilidad diferencial, por lo menos con etanol y calor.

El hecho de que mutaciones en una región estructural parezcan afectadas en su regulación nos hace pensar que tal vez la parte amino terminal del σ_{32} tiene algún papel en la regulación temporal de la respuesta.

El nivel traduccional de control de la respuesta no está bien conocido en general, ni descrito para σ_{32} en particular.

Trabajo con la mutante MX1231, con un codón ámbar en el aminoácido 75 de ppqH y con el pCG28, una fusión β -gal con un codón ópalo, hacen relexionar sobre el papel que juega el aparato traduccional en la respuesta al etanol, por ejemplo.

Independientemente de lo que el solvente haga a nivel membranar, tiene un blanco observable en la estructura ribosomal, dando como consecuencia que baje la fidelidad de la lectura del código genético.

Por otro lado, dadas las dimensiones del ribosoma y los complejos agregados que forma para traducir (polisomas), un cambio en la temperatura podría ser sentido por él. Al parecer (ver gráfica con la actividad del pCG28), el choque térmico no provoca infidelidad de lectura del código. El etanol, sí lo hace.

Si un cambio en la temperatura modifica el arreglo de los ribosomas, no es relajando el sistema, pero puede hacerlo de otras maneras, por ejemplo, las bacterias sensibles a tetraciclina en presencia de dosis muy bajas del antibiótico (2-5 ug/ml) son más sensibles a 42°C que a 30°C (datos no mostrados). Desafortunadamente, probar que la maquinaria traduccional es blanco directo del choque calórico no es sencillo, ya que los antibióticos y solventes que lo afectan, actúan también a nivel de membrana plasmática, o sobre algunas vías metabólicas directamente.

LA SEÑAL INTRACELULAR DE LA RESPUESTA.

El pensar que una proteína específica pudiera ser la señal para aumentar la cantidad de σ_{32} es factible, dado que la fusión multicopia no es inducible a los mismos niveles que la proteína σ_{32} medida por anticuerpos específicos. Se puede suponer que se está titulando una proteína responsable de la inducción de ppqH.

Para estudiar esta posibilidad, las fusiones $ppqH::lacZ$ construidas serían útiles porque podría intentarse una mutagénesis generalizada de la bacteria que afectara la síntesis de β -gal. Sería fácilmente detectable por crecimiento en cajas con X-gal. El uso futuro de las fusiones genéticas abrirá seguramente nuevas interrogantes.

Vale la pena señalar que durante la redacción de esta tesis, Wang y Kaguni, (1989) publicaron un estudio donde se reporta la purificación de una nueva holoenzima de la RNA polimerasa; esta especie molecular tiene unida una nueva subunidad sigma de un peso molecular de 24,000 d. Esta podría ser la proteína que estamos titulando cuando se introduce un plásmido multicopia.

La subunidad σ 24 es capaz de unirse a la RNA polimerasa e iniciar la transcripción a partir del promotor 3 del gene $ppqH$ de una manera específica. Si recordamos que el F3 es inducible solo cuando la bacteria es incubada a 42°C y después de 10 minutos, es sencillo darse cuenta de la importancia del hallazgo.

Con la descripción de este nuevo σ , vuelve a tomarse el control transcripcional como uno de los más importantes en la inducción del gene.

Sin embargo, nuestros datos y los de Nagai (1989) apoyan la idea de que secuencias dentro de la propia proteína pueden regular la cantidad de σ 32 funcional dentro de la célula. La inducción a nivel de una traducción diferencial o más rápida, de una estabilización de la proteína o incluso de una activación del polipéptido podría explicar que la inducción fuera tan inmediata después de un choque calórico.

Se aprecia que la regulación del σ 32 es mucho más compleja de lo que se puede pensar. No es extraño, ya que se trata de un polipéptido que debe ser blanco de muchas señales. Un gene que modifica su actividad por superenrollamiento, dependiendo de una proteína que controla la división celular, que se induce con la respuesta estricta, del cual son sintetizados 4 mensajeros con regiones líderes que van desde 9 hasta 200 pb, cuya proteína es específicamente estabilizada a alta temperatura, y además tiene una subunidad sigma específica para uno de sus promotores nos está mostrando que hay suficientes puntos donde pueden actuar cada uno de los inductores afectando de manera distinta la concentración efectiva de σ 32 e inducir, por tanto, la respuesta calórica.

Un sistema como el descrito coloca a la señal intracelular como distinta según el estímulo ambiental, el blanco puede ser cualquier nivel que afecte a plazo largo, medio o corto la cantidad de σ^{32} en la bacteria.

Trabajo muy interesante sería el encontrar mutantes afectadas en la respuesta a un solo agente inductor. Tal vez las mutaciones no se encuentren en la región regulatoria (como sucedió con las mutantes aisladas en este trabajo), pero podría caracterizarse el sitio donde estuvieran para dar mayor información respecto al mecanismo de regulación.

CRONOLOGIA DE LA RESPUESTA CALORICA EN *E. coli*

1963. Ritossa describe que en respuesta a un cambio de temperatura (de 25 a 32°C) hay una formación de puffs en ciertas zonas específicas de los cromosomas politénicos de *D. melanogaster*, los correlaciona con una síntesis incrementada de RNA.

1969. Bridges descubre que al calentar el ácido desoxirribonucleico cambia su densidad igualmente que con radiación ultravioleta.

1974. Tissières y cols. describen la inducción de proteínas específicas en respuesta al heat-shock en *D. melanogaster*.

1975. Una mutación termosensible (k165) que afectaba la síntesis de muchas proteínas de *E. coli*, es descrita por Cooper y Ruettinger; el que una sola mutación ocasionara que dejaran de expresarse tantas proteínas daba indicios de que el gene mutado tenía un efecto pleiotrópico.

1980. Hightower demuestra que en cultivo de tejidos animales la respuesta al calor es igual a la observada cuando se añaden análogos de aminoácidos y puromicina.

1980. Haciendo geles tipo O'Farrel se descubre que hay una síntesis de proteínas específicas en *E. coli* en respuesta a un cambio de temperatura, Yamamori y Yura, en ese mismo estudio, dan evidencia del control transcripcional de la inducción e identifican algunas proteínas.

1981. Complementando con un banco genómico a la mutante k165 de Cooper y Ruettinger, Neidhardt y Van Bogelen describen un gene que codifica para el regulador positivo de las proteínas inducibles por calor. Se le denomina *htrR* por las iniciales en inglés de high temperature protein.

1982. Minton y colaboradores describen una estabilización de proteínas inestables *in vitro* cuando son incubadas en presencia de las proteínas de heat-shock, es el primer indicio de su posible función en la célula.

1982. Di Domenico y colaboradores, estudiando el fenómeno en D. melanogaster, encuentran que la respuesta al calor está regulada a nivel transcripcional y postranscripcional. Se utiliza por primera vez el término de "heat-shock response" y las proteínas inducidas son llamadas HSP's.

1982. Yamamori y Yura localizan la mutación k165 entre los minutos 63 y 76 del cromosoma bacteriano; demuestran la correlación entre el aumento del mRNA y la proteína GroE inducida por calor; localizan en un gel de doble dimensión al producto del gene htpR y demuestran que la exposición de las bacterias a 42°C tiene un efecto protector contra la muerte por calor, a 55°C.

1983. Neidhardt en geles de doble dimensión identifica y nombra a 13 polipeptidos producidos específicamente a temperatura alta. Se define el regulón HTP en E. coli. Clona el gene htpR, lo expresa y es calculado un tamaño de 33 000 d para la proteína codificada por éste (F33.4).

1983. Hall propone llamar a las proteínas de "heat-shock" simplemente proteínas de estrés, ya que en los estudios que realiza, hay una gran cantidad de compuestos que inducen la respuesta además del calor. Esta idea se generalizó pronto.

1983. Smith y Neidhardt proponen el término de estimulación para definir los genes inducibles por un estímulo ambiental determinado; en un trabajo con proteínas inducibles por aerobiosis y anaerobiosis.

1983. Lee y colaboradores proponen que moléculas pequeñas como nucleótidos tetrafosfatados pueden funcionar como alarmones del sistema HTP y de otros que pudieran involucrar la formación de radicales libres.

1983. Tilly y cols. encuentran que el producto del gene dnaK es un regulador negativo de la respuesta al calor en E. coli.

1984. Grossman y cols. prueban que el producto del gene htpR es un factor σ con un peso molecular de 32 000 d, el cual, al unirse a la enzima RNA polimerasa, le da una nueva especificidad: reconoce los promotores de los operones HTP. No se sabe si la inducción de la respuesta se deba a una activación de la proteína sintetizada dentro de la célula en condiciones normales.

1984. Tobe y cols. describen el aislamiento de una batería de mutantes afectadas en la inducción de las proteínas de choque calórico en E. coli. Algunas están afectadas en la síntesis del σ 32.

1984. Kruger y Walker demuestran que tanto groE como groK se inducen por radiación ultravioleta y ácido nalidixico usando una vía dependiente de htpR. Se inicia el estudio de una larga lista de inductores de la respuesta HTP en sistemas procariontes.

1984. Landick et al. secuencian el gene htpR encontrando enorme homología con el σ 70, el σ 32 conserva los dominios necesarios para reconocer a la RNA polimerasa y a los promotores de los operones HTP. Tiene en su región reguladora, un conjunto de siete secuencias posibles promotoras para σ 70. Con este trabajo, la respuesta a la pregunta del mecanismo de inducción parece recaer en el estudio de la expresión diferencial de los promotores del gene.

1985. Se describe la regulación genética por oxígeno en Salmonella thyphimurium, los radicales libres se proponen como posibles alarmones. Stranch y cols.

1985. Se obtiene la secuencia consenso de los promotores HTP, el recién descrito factor σ reconoce la secuencia TNTtCNCcCTTGAA en la posición de -35 y CCCCATtTa en -10. Según Cowing, el σ 32 reconoce casi exclusivamente la región de -10.

1985. Grossman y Gross prueban la primera interacción entre dos sistemas globales de regulación: la respuesta estricta induce la expresión e las proteínas HTP.

1985. Un inductor más se anade a la lista y se trata de un efecto metabólico importante: la producción de proteínas anormales en E. coli dispara la respuesta al calor. Goff et al.

1985. Una proteína del regulón HTP está codificada por el genoma mitocondrial de plantas superiores y tiene homología con las proteínas de E. coli, primer indicio de la conservación de la respuesta a lo largo de la escala finogenética. Sinibaldi, R. M.

1986. Como un primer intento de estudiar la regulación del gene htpR (ropH), Tilly et al. realizaron cinéticas de inducción del mRNA del σ 32. Describieron que existían dos mensajeros del gene pero que, en general, la expresión era constitutiva.

1986. En Tetrahymena thermophilus se descubre que una proteína de choque calórico se une a los ribosomas (Mc Mullin, et al. La relación entre la respuesta estricta y el choque térmico descrita anteriormente, parece tener como sustrato físico cambios en el aparato traduccional. Hasta ahora, aún no se demuestra definitivamente la existencia de ninguna proteína asociada a ribosomas durante la inducción dekl regulón HTP en E. coli, aunque GroEL se purificaba precipitando ribosomas (Subramanian, et al., 1976).

1986. Bloom y cols. llevan a cabo la primera síntesis in vitro de mRNA de cuatro proteínas de choque térmico con la RNA polimerasa y el $\sigma 32$ purificado.

1986. Wada encuentra que la replicación del plásmido F depende del $\sigma 32$. El papel de ésta proteína en condiciones de no inducción parece ser importante para algunas funciones celulares.

1986. Crickmore y Salmond encuentran que el gene rpoH está inmediatamente después y con la misma dirección de transcripción de un operón involucrado en división celular. Hasta ahora, no se ha demostrado que haya una continuidad en la transcripción de los genes del operón fts con rpoH.

1986. Aliabadi y cols. insertan Mud(Aplac) en el cromosoma de Salmonella thyphimurium definiendo los componentes del estímulo regulado por oxígeno. La estrategia de fusiones con β -galactosidasa comienza a ser utilizada en el estudio de los regulones.

1986. Koyasu et al. encuentran que en mamífero, dos proteínas inducibles por calor se unen específicamente a actina. Existe un pensamiento generalizado de que las proteínas inducibles con alta temperatura tienen funciones muy variadas para mantener la integridad celular.

1986. Mc. Mullin demuestra que la proteína de "heat shock" que se une a los ribosomas de Tetrahymena thermophilus tiene capacidad de fosforilar otras proteínas.

1986. Morgan y Ames demuestran el segundo ejemplo de solapamiento entre dos regulones: ésta vez las proteínas inducibles por calor y las inducibles por peróxido de hidrógeno. Los radicales libres vuelven a presentarse como alarmones, pero no hay pruebas contundentes como para ubicarlos como únicos inductores intracelulares de la respuesta.

1987. Yano, Imai y Yura utilizan por primera vez fusiones β -galactosidasa con genes del regulón HTP para estudiar su expresión. Son fusiones monocopia con dnak y groE. Demuestran que la actividad de β -gal se ve incrementada con calor y etanol 3-6% en una vía ppH dependiente.

1987. Wiederrrecht por medio de una columna de sefarosa a la que se le conjugó una secuencia de DNA consenso de σ 32, logró purificar el factor de transcripción para "heat-shock" (HTSF), de D. melanogaster y S. cerevisiae demostrando que eran iguales en tamaño y afinidad por la resina. El que en organismos tan diferentes se observara tanto parecido entre los HTSF hablaba de la enorme conservación de la respuesta.

1987. Como todas las mutaciones que afectaban la síntesis generalizada de las proteínas del regulón HTP estaban localizadas en el gene ppH, y se había demostrado que un aumento del σ 32 era equivalente a un aumento en las proteínas de choque calórico, la atención de los principales grupos de investigación se enfocó a estudiar la regulación del propio σ 32. Así, en mayo y junio de 1987 aparecieron dos artículos, el primero de Fujita e Ishihama donde describían dos mensajeros del gene ppH: el proveniente del promotor #2, el más cercano al gene estructural, era específicamente inducido cuando se daba un cambio de 30°C a 42°C a un cultivo de bacterias. En nuestro laboratorio, los datos con experimentos tipo Northern indicaban que eran cuatro los mensajeros del gene, el segundo se inducía con calor a los diez minutos de exposición a 42°C. El segundo artículo, publicado por Erickson et al., hacía un mapeo por S1 de la región de control del gene ppH. Eran, en efecto, 4 mensajeros. Fueron localizados los sitios de origen para cada uno y, con fusiones con galactocinasa demostraron que 3 eran constitutivos y uno inducible a 43.5°C. Postulan un control postraducciona del gene.

1987. Shearer demuestra que las proteínas de choque calórico inducen transiciones de micelio a levadura en Histoplasma capsulatum; la respuesta está relacionada entonces con aspectos importantes en diferenciación y morfogénesis.

1987. Bradwell y Craig encuentran que una proteína de choque calórico eucariota (de D. melanogaster), con peso molecular de 83 000 d es igual a una proteína del regulón HTP de E. coli codificada por el gene htpG.

1987. Straus et al., pensando en un control postraducciona! de la proteina $\sigma 32$ miden la vida media de ese polipeptido a 30°C y a 42°C, encontrando que durante el choque de temperatura el $\sigma 32$ pasa de una vida media de 1 min (30°) 5 min(42°). Evidentemente, la proteina est! siendo estabilizada o deja de ser degradada. Hay 50 mol!culas por c!lula a 30° y 3 000 mol!culas por c!lula a 42°C.

1987. Davis encuentra otro ejemplo de diferenciación celular ligado a la expresi3n de proteinas de choque t!rmico: Trypanosoma cruzi se diferencia cuando es sometido a un cambio de temperatura, dentro del huésped homeotermo.

1988. Tiempo ha que se habian reconocido las proteinas de "heat-shock" en par!sitos y su homología con las proteinas HSP en mamiferos y procariotas. Agabian publica una revisi3n sobre el naciente campo del choque cal3rico en par!sitos y sobre las posibles preguntas por contestar. A pesar de que las proteinas correspondientes al regul3n est!n enormemente conservadas, tambi!n son terriblemente inmunog!nicas.

1988. Estudios hechos por Deshaies y cols. demuestran el papel de la HSP70 (hom3logo al producto de dnak en E. coli), en la translocaci3n de proteinas a trav3s de membrana mitocondrial y de membrana lisosomal. Aparentemente, HSP 70 protege al polipeptido de la prote3lisis hasta que ha cruzado la membrana. El papel de "chaperonas" en las proteinas del regul3n parece mucho m!s claro que en 1982, con Kenneth W. Minton. La explicaci3n es aceptada para DnaK en E. coli, pero no se ha demostrado contundentemente.

1988. Young reporta que las proteinas hom3logas a DnaK y GroE en E. coli son blancos inmunol3gicos muy fuertes en lepra y tuberculosis. Adem!s de representar un dato importante para el estudio de la relaci3n huésped-par!sito, es cada vez m!s evidente que la respuesta al calor y sus proteinas son probablemente las m!s conservadas a lo largo de la escala filogen!tica.

1988. Hemmingsen estudia y compara las proteinas GroE de E. coli y de plantas. Las proteinas son estructuralmente casi id!nticas y en los dos organismos est!n involucradas en el correcto ensamble de proteinas oligom!ricas. Queda demostrado el papel de "chaperona" de GroE.

1988. Scherer describe que mutaciones en hipA, un gene que suprime los efectos letales de la inhibici3n de la sntesis de peptidoglicano, y que tambi!n suprime la letalidad en cepas mutantes en ropH de E. coli.

1988. Se aíslan y caracterizan mutantes que han perdido el σ_{32} , son incapaces de crecer a más de 20°C, tienen serios defectos en su morfología, no hay transcripción de los genes htpG, groESL ó dnaKJ, aunque algunas proteínas sí se producen en las mutantes, así que se propone que debe haber mecanismos adicionales que controlen las proteínas inducibles por calor. Zhou et. al.

1988. Skelly propone una interacción entre la proteína DnaK con la RNA polimerasa ya que un anticuerpo policlonal contra σ_{32} reacciona con DnaK y con preparaciones de RNA pol con σ_{70} ó σ_{32} .

1988. Keller et al., haciendo estudios de proteólisis en cepas silvestres, lon⁻ y dnaK⁻ proponen que:

- 1) DnaK tiene actividad proteolítica distinta a la proteasa lon, o bien
- 2) DnaK tiene la capacidad de disgregar complejos macromoleculares que precipitan cuando las proteínas tienen una conformación aberrante y consigue así exponerlos a la acción de proteasas.

1988. Se caracteriza el gene para el factor de transcripción de genes de choque calórico en levadura. Es un solo gene que da origen a una proteína de 93,218 daltones. Se une al DNA de E. coli en los promotores de "heat-shock". Sorger, et al.

1988. Se nombra HSF-1 al factor de transcripción para choque térmico en levadura, se demuestra que exhibe una fosforilación dependiente de temperatura. Wiederrecht, et al.,

1988. Liberek et al. estudian el papel de DnaK y DnaJ en la iniciación de la replicación del fago lambda. Se propone un elegante modelo de interacción de éstas proteínas.

1988. Se relacionan 3 sistemas de regulación global. Jenkins et al. encuentran que las células que crecen en glucosa o nitrógeno limitante quedan protegidas contra cambios de temperatura ó peróxido de hidrógeno.

1988 Lee et al. describen que Tsr, un receptor de serina y repelentes en E. coli también funciona como termorreceptor.

1989. Bhriain describe que hay un sobrelapamiento de las respuestas a choque osmótico y anaeróbico, menciona el superenrollamiento de DNA como responsable de la regulación coordinada de la expresión genética.

1989. Bukaw analiza mutantes que tienen una delección en dnkK y da un papel fisiológico a 30°C para ésta proteína.

1989. Mattews y Niedhardt intentan aclarar algunos eventos bioquímicos que ocurren en las células sometidas a un choque calórico. Descubren que existe un alto catabolismo de serina asociado al "heat-shock".

1989. Ueshima et al. demuestran que el superenrollamiento del DNA afecta la inducibilidad del promotor 2 del gene pppH.

1989. La síntesis de pppH parece estar ligada al ciclo celular de la bacteria. la proteína Dna A regula la expresión de los promotores 3 y 4 del gene. Wang y Kaguni.

1989. Nagai y Yura tienen datos que parecen indicar que hay una región en medio del gene estructural de pppH que está envuelta en la represión traduccional de la proteína a 30°C ó en la inducibilidad por calor.

1989. Wang y Kaguni describen la purificación de un nuevo σ en E. coli encargado de transcribir preferencialmente a partir del promotor 3 del gene pppH. El control transcripcional del gene adquiere nuevamente importancia. Este es el quinto sigma descrito en la bacteria. No se sabe su posición en el mapa ni se conoce su regulación.

1989. Analizando el comportamiento de dos fusiones de β -galactosidasa con el gene pppH en vehículos multicopia, hay evidencia de que:

- 1) El inductor intracelular de la respuesta es titulable por el alto número de copias de las fusiones, por lo tanto, es factible que se trate de una proteína o de un factor que se encuentre en cantidades limitantes, tal vez regulado incluso por ciclo celular o por calor.
- 2) La magnitud de la respuesta está dada por un control que opera a nivel transcripcional del gene pppH. Pero la temporalidad de la respuesta está regulada por un control traduccional que reside en la propia estructura de la proteína σ_{32} . Esta Tesis.

Así pues, la pregunta del mecanismo molecular de la inducción está recayendo mas que en un solo elemento, en un complejo sistema de control que modifica las cantidades de σ_{32} dentro de la célula.

El estudio futuro tendrá que basarse en el análisis de mutantes que tengan afectada solamente la inducibilidad de la respuesta con un inductor, para lo cual, un eficiente sistema de selección de tales mutantes será, sin duda, la construcción de fusiones genéticas con actividades enzimáticas fácilmente identificables.

R E F E R E N C I A S

- Aliabadi, Z., Warren, F., Mya, S., Foster, J. W., 1986. *Journal of Bacteriology* 165:780-786
- Ang, D. and Georgopoulos, C., 1987. *Journal of Bacteriology* 171:2748-2755
- Arrhenius, S. 1889. *Z. Phys. Chem.* 4:226-248
- Ashburner, M. 1970. *Chromosoma* 31:356-376
- Baer, S. H., Blascheck, P.H. and Smith, T. L. 1987. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2854-2861
- Bahl, H., and Georgopoulos, C., 1987. *Genes and Development* 1:57-64
- Belasco, J. G. and Higgins C. F., 1988. *Gene* 72:15-13
- Bernstein, C. and Johns, V., 1989. *Journal of Bacteriology* 171:1893-1897
- Bhriain, N. N., Dorman, C. J. and Higgins, C. F., 1989. *Molecular Microbiology* 3:933-942
- Bloom, M., Skelly, S., Van Bogelen, R., Neidhardt, R., Brot, N., Weissbach, H., 1986. *Journal of Bacteriology* 166:380-384
- Bradwell, J. C. A. and Craig, E. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5177-5118
- Bremmer, E. et al., 1984. *Journal of Bacteriology* 158:1084-1093
- Bridges, B. A., et al, 1969. *Journal of General Microbiology* 58:115-124
- Buck, M., Ames, B. N. 1984. *Cell* 36:523-531
- Buck, M., Khan, H., and Dixon, R., 1985. *Nucleic Acid Research* 13:7621-7638
- Bukaw, B. and Walker, G. C. 1989. *Journal of Bacteriology* 171:2337-2346
- Casadaban, M. J. and Cohen, S., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:4530-4533
- Casadaban, M. J. et al., 1983. *Methods in Enzymology* 100:293-308

Casadaban, M. J. and Chou, J., 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:535-539

Chappell, T. G., et al,

Chirico, W. J., Walter, M. G., Blobel, G. 1988. Nature 332:805-810

Chung, C. H., and Goldberg, A. L. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4931-4935

Clarke, L., and Carbon, J. 1976. Cell 9:91-99

Cooper, S., Ruettinger, T. 1975. Mol. Gen. Genet. 139:167-176

Cowing, D. W., 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2679-2683

Craig, E. A. et al, 1979. Cell 16:575-88

Crickmore, N. and Salmond, G. P. C., 1986. Molecular and General Genetics 205:535-539

Davis, Ch. E., et al 1987. En "Molecular strategies of parasitic invasion", pp 169-179. Alan R. Liss, Inc.

Davis, Ch. E., Guiney, D. G., and Colmenauer, M. E. M., 1987. En "Molecular Strategies for parasitic invasion" pp. 169-179 Alan R. Liss, Inc.

de Mendoza, D., and J. E. Cronan, Jr. 1983. Trends Biochem. Sci. 8:49-52

Desahies, R. J. et al., 1988. Nature 332:800-805

Desahies, R. J., Koch, B. D., Schekman, R., 1988. TIBS 13:384-388

Di Domenico B.J., et al. 1982. Cell 31:593-603

Donnelly, C. E., and Walker, G. C., 1989. In Cold Spring Harbor lab. pp 9

Edelman, P., and Gallant, J. 1977. Cell 10:131-137

Edelman, P., and Gallant, J., 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3396-3398

Erickson, J. W., Vaughn, V., Walter, W. A., Neidhardt, F. C., Gross, C. A. 1987. Genes and Development 1:419-432

Finley, et al, 1984

Frazier, M. W. and Mosig, G., 1988. Journal of Bacteriology 170: 1384-1388

Friedman, D.I. and Gottesman, M. (1983). En "Lambda II". Hendrix, Roberts, Stahl and Weisberg eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp.21-51.

Fujita, N., and Ishihama, A., 1987. Molecfular and General Genetics 210:10-15

Gallant, J., Palmer, L., Chu Pao Ch., 1977. Cell 11:181-185

García, M., 1988. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M.

Garsia, R. J., et al, 1989. Infection and Immunity 57:204-212

Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Kaiser, A. D., Wood, W. B. 1972. Nature 239:38-41

Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., and Kaiser, A. D. 1973. J. Mol. Biol. 76: 45-60

Georgopoulos, C., P., and Eisen, H. 1974. J. Supramol. Struct. 2:349-359

Georgopoulos, C. P. 1977. Mol. Gen. Genet. 151:35-39

Georgopoulos, C. P. and Hohn, B. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:131-135

Georgopoulos, C., Tilly K., Drahos, D., Hendrix R. 1982. J. Bacteriol. 149:1175-1177.

Goff, S. A., Goldberg, A. L., 1985. Cell 41:587-595

Goff, S. A., Casson, L. P., Goldberg, A. L. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6647-6651

Goldberger, R. F. "Biological Regulation and Development" vol 1 (Gene Expression). Plenum Press Ed. 1980

Gorini, L., Rosset, R., and Zimmerman, R. A. 1967. Science, 157:1314-1317

Gottesman, S., Gottesman, M., Shaw, J. E., and Pearson, M. L. 1981. Cell 24:225-233

Gross, C. A., Grossman, A. D., Liebke, H., Walten, W., and Burgess. 1984. J. Mol. Biol. 172:283-300

Grossman, A. D., Erickson, J.W., and Gross, C. A. 1984. Cell 38:383-390

Grossman, A. D. and Gross, C. A. 1985. Journal of Molecular Biology 186:357-365

Guidon, P. T. Jr., Hightower, L. E. 1985. J. Cell Biol.

99:454a (parte 2).

- Guttman, S. D., Gorovsky, M. A. 1979. Cell 17:305-17
- Hall, B. G. 1983. Journal of Bacteriology 156:1363-1365
- Helling, R. B., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. 1974. Journal of Virology. 14:1235-1239
- Hemmingsen, S. M., et al., 1988. Nature 333:330-334
- Herendeen, S. L., R. A. Van Bogelen, and F. C. Neidhardt. 1979. Journal of Bacteriology 139:185-194.
- Hightower et al., 1984. Cell 36:361-369.
- Herskowitz, I., 1987. Nature 327: 219-222
- Hirshfield, I. N., Tenreiro, N. R., Van Bogelen, R. A., and Neidhardt, F. 1984. Journal of Bacteriology 158:615-620
- Hoek, J. B., and Tarashi, T. F., 1988. TIBS 13:269-274
- Hollberg, R.L. and Wilson, P. G. 1981. Cell 26:47-56
- Hua, S. S., and Markovitz, A., 1972. Journal of Bacteriology, 110:1089-1099
- Ignolia, T.D., et al 1980. Cell 21:669-76
- Ignolia, T. D., Craig, E. A., 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:525-529
- Imlay, J. A. and Linn, S., 1987. Journal of Bacteriology 167:2967-2976
- Imperiale, M. J., et al 1984. Mol. Cell Biol. 4:667-74
- Itikawa, H., and Ryu, J. I., 1979. Journal of Bacteriology 138:339-344
- Jenkins, D. E., Schultz, J. E. and Martin, A., 1988. Journal of Bacteriology 170:3910-3914
- Jones, P. G., Van Bogelen, R., and Neidhardt, F. C., 1987. Journal of Bacteriology J. Bact. 167:2092-2095
- Keller, J. A. and Simon, L. D., 1988. Molecular Microbiology 2:31-41.
- Kelly, P. M., Schlesinger, M. J. 1982. Cell 15:1277-86
- Koyasu, S. et al., 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8054-8058

- Krueger, J. H., and Walker, G. C. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1499-1503
- Landick, R., et al., 1984. Cell 38:175-182
- La Thangé, N. B., 1984. EMBO J. 3:1871-79
- Lee, L., Mizuno, T. Imae, Y., 1988. Journal of Bacteriology 170:4769-4774
- Lee, P. C., Bochner, B. R., and Ames, B. N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7496-7500
- Leenders, H. J., Berendes H. D., 1972. Chromosoma 37:434-44
- Lemaux, P. G., Herendeen, S. L., Bloch, P. L., and Neidhardt, F. C. 1978, Cell 13:427-434
- Li, G. C., Hahn, G. M. 1978. Nature 274:699-701
- Li, C., Boileau, J. A., Kung, C. and Adler, J. , 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9451-9455
- Liberek, K., Georgopoulos, C. and Zylicz M., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:6632-6636
- Lindquist, S. 1986. Ann. Rev. Biochem. 55:1151-91
- Livak, K. J., et al, 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5613
- Loomis, W. F. et al 1982. Mol. Cell. Biol. 2:484-89
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982. En "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Eds. N. Y.
- Manseu, L. J., Bradwell, J. C. A., 1982. En "Heat-Shock from bacteria to man" pp. 11-16 C.S.H., N.Y.
- Marr, A. G., et al., 1962. J. Bact. 97:1245-1249.
- Martin, R., et al, 1989. Molecular and General Genetics 217:411-418
- Matthews, R. G. and Neidhardt, F. C. 1989. Journal of Bacteriology 171:2619-2625
- Mc. Donnell, M. W., Simon, M. N. and Studier, F. W. 1977. Journal of Molecular Biology 110:119-123
- Mc Mullin, T. W. and Hallberg, R. L., 1986. Molecular and Cellular Biology, 6:2527-2535
- Miller, D., 1989. New Scientist 1:45-50

Miller, J. H., 1972. "Assay of β -galactosidase" in "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor Lab.

Miller, M. J., et al, 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:522-26

Minton, K. W. et al. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7107-7111

Mitchell, J. J., and Lucas-Lenard, J. 1980. J. Biol. Chem. 255:6307-6313

Mizusawa, S., and Gottesman, S., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:358-362.

Morgan, R. W. and Ames, B. N. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8059-8053

Mosteller, R. D., Goldstein, R. V., and Nishimoto, K. R., 1980. J. Biol. Chem. 255:2524-2532

Nagai, H. and Yura, T., 1989. Cold Spring Harbor . pp 121

Neidhardt, F. C., and Van Bogelen, R.A. 1981. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100:894-900

Neidhardt, F. C. et al 1983. Journal of Bacteriology 153:597-603

Neidhardt, F. C., Van Bogelen, R. A., and Vaughn, V., 1985. Ann. Rev. Genet. 18:295-329.

Newport, G., Culpepper, J., and Agabian, N., 1988. Parasitology Today, 4:303-312

Nishihara, M., M. Ishinaga, M. Kato, and M. Kito. 1976. Biochim. Biophys. Acta 431:54-61

Parker, C. S., Topol, J., 1984. Cell 36:357-69

Pelham, H. R. 1982. Cell 30:517-28

Pine, M. J., 1967. Journal of Bacteriology 93:1527-1533

Pine, M. J., 1970. Journal of Bacteriology 103: 207-215

Polla, B. S. 1988. Immunology Today, 9:134-137.

Privalle, Ch. and Fridovich, I. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2723-2726

Richman, S. J. et al., 1989. The journal of Immunology 143:299-308

Ritossa, F. 1962. Experientia 18:571-73

- Ritossa, F., 1964. Exp. Cell Res. 35:601-607
- Ritossa, F. 1964. Exp. Cell Res. 36:515-23
- Ron, E. Z., Shani, M. 1971. J. Bact. 107:397-400
- Ronson, C. W., Nixon, T. B., Ausbel, M. F., 1987. Cell 49:579-581
- Salto, H., and Uchida, H., 1978. Mol. Gen. Genet. 164:1-8
- Sauer, R. T., Yocum, R. R., Doolittle, R. F., Lewis, M., and Pabo, C. O. (1982). Nature, 299: 447-451
- Selkirk, M. E. et al., 1989. The journal of Immunology 143 299-308
- Scheerer, G., 1987. Journal of General Microbiology 133:3375-3382
- Schedl, P. et al, 1978. Cell 14:921-29
- Shaw, M. K., A. G. Marr, and J. L. Ingraham. 1971. Journal of Bacteriology. 105:683-684.
- Shearer, G., 1987. J. Gen. Microbiol. 133:3375-3382
- Sherrer, R. and Moyed, H., 1988. Journal of Bacteriology 170:3321-3326
- Schnier, J. 1987. Journal of General Microbiology 133:3151-3158
- Schofl, F., et al., 1989. Molecular and General Genetics 217:246-253
- Shapira, M. et al, 1988. EMBO J. 7:2895-2901
- Shine, J., and Dalgarno, L. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346
- Silhavy, T. J., Berman, M. L., Enquist, L. W., 1984. "Isolating lac fusions by genetic transposition" en "Experiments with gene fusions" Cold Spring Harbor lab.
- Silhavy, T. J. and Beckwith, J. R., 1985. Microbiological Reviews 49:398-418
- Sinibaldi, F. M. and Turpen, T. 1985. 260:15382-15385
- Skelly, S., Coleman, T., Fu, Ch., Broth, N. and Weissbach, H., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8365-8369
- Skelly, S. et al., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5497-5501

- Smith, M. W., and Neidhardt, F. C. 1983. J. Bact. 154:336-343
- Smith, M. W., and Neidhardt, F. C. 1983. J. Bact. 154:344-350
- Sokolovic, Z., and Goebel, W., 1989. Infection and Immunity 57:295-298
- Sorger, P. K. and Peham, R. B., 1988. Cell 54:855-864
- Storz, G., et al 1989. Journal of Bacteriology 171:2049-2055
- Strauch, K. L. et al 1985. Journal of Bacteriology 161:673-680
- Straus, D. B., Walter, W. A., Gross, C. A., 1987. Nature 329:348-351
- Subjeck, J. R., et al 1985. Int. J. Radiat. Biol. 47:275-84
- Subramanian, R., et al., 1976. J. Biochem. 67:591-601.
- Sugino, A., Goodman, H. M., Heyneker, H. L., Shine, J., Boyer, H. W., and Cozzarelli, N. R., 1977. J. Biol. Chem. 252:3987-3997
- Takano, T., and Kafefuda, T., 1972. Nature (London) New Biol. 239:34-37
- Tilly, K. N., et al., 1983. Cell 34:641-646
- Tilly, K., Ban Bogelen, R. A., Georgopoulos, C., and Neidhardt, F. C., 1983. Journal of Bacteriology 154:1505-1507
- Tilly, K., Erickson, J., Sanjeev, S. and Georgopoulos, C., 1986. J. Bact. 160:1155-1158
- Tissieres, A. et al. 1974. J. Mol. Biol. 84:389-98
- Tobe, E., Ito, K., and Yura, T. 1984. Molecular and General Genetics 125:10-16
- Tobe, T., Kusakawa, N., Yura, T 1987. Journal of Bacteriology 169:4128-4134
- Trempey, J. E., and Gottesman, S. 1989. J. Bact. 171:3348-3353
- Ueshima, R., Fujita, N. and Ishihama, A., 1989. Mol. Gen. Genet. 215:185-189
- Vodkin, M. H., and Williams, J., 1988. Journal of Bacteriology 170: 1227-1234
- Wada, M., and Itikawa, H., 1984. Journal of Bacteriology 157:674-676

- Wada, Ch., Akiyama, Y., Ito, K., Yura, T., 1986. Molecular and General Genetics 209: 208-213
- Wada, Ch., Imai, M., Yura, T., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8849-8853
- Wang, C., Lazarides, E. 1984. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119:735-43
- Welch, W. J., Feramisco, J. R. 1985. Mol. Cell. Biol. 5:1229-37.
- Wiederrecht, G., et al., 1987. Cell 48:507-515
- Wiederrecht, G., Seto, D. and Parker, C. S., 1988. Cell 54:841-853
- Winkelman, J. W. and Clarck, D. P. 1986. Journal of Bacteriology 167:362-367
- Wu, C. et al, 1979. Cell 16:807-814
- Yamamori, T., and Yura, T. 1980. Journal of Bacteriology 142:843-851
- Yamamori, T., and T. Yura. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:860-864
- Yamamori, T., and Yura, T. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:860-864
- Yano, R., Imai M., Yura T. 1986. Molecular and General Genetics 207:24-28
- Young, D., et al., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4267-4270
- Zengel, J. M. and Lindahl, L. 1985. Journal of Bacteriology 163:140-147
- Zhou, Y. N., Kusakawa, N., Erickson, J. W., Gross, C. A., and Yura, T., 1988. Journal of Bacteriology 170:3640-3649
- Zylicz, M., LeBowitz, J., Mc. Macken, R., and Georgopoulos, C., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6431-6435