

00562

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

RECIBO
1995
MAY 11
10:30 AM
SECRETARIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE QUIMICA**

**ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES DEL GENE DE
ESTRES CALORICO *rpoH* Y DEL OPERON *groES-groEL*
Y SU RELACION CON EL GRADO DE
SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA), PRESENTA:**

FERNANDO LOPEZ SANCHEZ.

México, D.F.

1995.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM

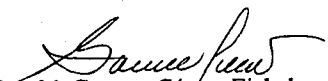


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso


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.



Dra. M. Carmen Gómez Eichelmann
Director de tesis



Q.F.B. Fernando López Sánchez

Lugar de realización de la tesis: Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Jurado asignado:

Dr. Fernando Montiel

Dra. Alicia González

Dr. Luis Servín

Dra. Laura Camarena

Dr. Jesús Aguirre

INDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCION	1
Superenrollamiento del DNA.	1
El nucleoide bacteriano.	3
Proteínas del nucleoide bacteriano.	4
Topoisomerasas de DNA.	7
Topoisomerasa I.	8
Topoisomerasa III.	9
Topoisomerasa II (Girasa).	10
Topoisomera IV.	11
Superenrollamiento del DNA y Expresión genética.	15
Respuesta celular a estrés por calor.	19
Regulón de σ^{32} de la respuesta a estrés por calor.	25
Superenrollamiento del DNA y genes de estrés calórico.	32
OBJETIVOS.	35
MATERIAL.	36
Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plásmidos.	36
Medios de cultivo.	36
Soluciones y amortiguadores.	37
Inhibidores de girasa.	40
Enzimas de restricción.	40
METODOS.	40
Transformación de cepas.	40
Purificación de plásmidos.	41
Electroforesis de topoisómeros.	41

Purificación de la sonda de DNA en geles de bajo punto de fusión.	41
Marcaje radioactivo de la sonda de DNA.	42
Purificación de RNA total.	42
Fijación del RNA en ranura.	43
Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes.	43
Transferencia del RNA a papel de nitrocelulosa.	43
Hibridación de la sonda de DNA.	44
Marcaje radioactivo de proteínas y su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida.	44
RESULTADOS	45
Efecto de la novobiocina en la curva de crecimiento y en el superenrollamiento de un plásmido reportero en <i>E. coli</i>.	45
Efecto de la novobiocina en la transcripción <i>in vivo</i> del gene regulador de la respuesta a estrés calórico <i>rpoH</i>.	47
Efecto de la novobiocina en la transcripción <i>in vivo</i> de los genes de estrés calórico <i>groEL</i> y <i>groES</i>	56
Efecto de los inhibidores de girasa en la traducción <i>in vivo</i> de las "HPS" y en la respuesta a estrés por calor.	60
DISCUSION.	68
CONCLUSIONES.	75
BIBLIOGRAFIA.	77

RESUMEN

El DNA se encuentra como una doble hélice que puede formar estructuras de orden mayor como el superenrollamiento (SE). El SE es una propiedad del DNA que juega un papel importante en la expresión de los genes. Por ejemplo, *gyrA* y *gyrB* se expresan mejor en un DNA relajado. El SE del DNA del nucleoide bacteriano puede modificarse *in vivo* por cambios en la oxigenación, osmolaridad o temperatura del medio de cultivo. Sin embargo el SE se mantiene en equilibrio por acción de las DNA topoisomerasas. En *Escherichia coli* estas enzimas son la: DNA topoisomerasa I y la DNA topoisomerasa II o girasa.

Durante un estrés por calor se incrementa la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de "heat-shock" (HSP). La mayoría de los genes de "heat-shock" son regulados positivamente por la proteína σ^{32} , que es codificada por el gene *rpoH*. A la fecha se han descrito aproximadamente 26 genes del regulón de σ^{32} . Existe controversia en la literatura acerca de la actividad *in vitro* de 4 promotores descritos para *rpoH* y su relación con el SE. Un grupo encontró que los promotores P1 y P4 modifican su expresión en DNA lineal o SE. Otro grupo describe que únicamente el promotor P4 responde a SE.

Por lo anterior los objetivos de este trabajo fueron: Determinar si *in vivo* el SE modificaba la transcripción de *rpoH*.

- Identificar los promotores que respondieran a SE.
- Determinar si la modificación en la concentración del mensajero *rpoH* afecta la respuesta celular al estrés por calor.
- Determinar la transcripción del operón *groES-groEL* en DNA superenrollado y relajado y comparar esta transcripción con la que se obtiene al inducir este operón por calor.
- Determinar si la respuesta a estrés por calor se modifica al cambiar el grado de SE del DNA en células tratadas con inhibidores de girasa.

Los resultados obtenidos, demuestran que de los dos transcritos de *rpoH* que se identificaron por experimentos tipo "Northern", el transcrito pequeño disminuyó y el transcrito grande aumentó su concentración cuando se usa novobiocina como inhibidor de girasa. Por lo que se sugiere que posiblemente los promotores P1 y P4 de *rpoH*, responden al grado de SE. Sin embargo hace falta determinar si los mensajeros que se detectan provienen realmente de estos dos promotores. Para esto, se hará una hibridación con un oligo específico o experimentos de tipo "primer extension" para identificarlos.

Se analizó la expresión del operón *groES-groEL* en DNA con diferente grado de SE. Se vió que la expresión de este operón aumenta considerablemente cuando el DNA está relajado, se sugiere que el operón *groES-groEL* tiene cuando menos un promotor que responde a SE del DNA.

Por otra parte, los experimentos realizados para ver el posible efecto de la modificación en la concentración del mensajero de *rpoH* en la respuesta por estrés a calor, demostraron que esta respuesta es similar en células control y células tratadas con novobiocina, ácido nalidixico y coumesticina. Estos resultados sugieren que las células pueden contender con el estrés a pesar de la modificación en la concentración de los mensajeros de *rpoH* inducida por estos inhibidores de girasa.

INTRODUCCION

SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA.

El DNA es una doble hélice en la cual las dos cadenas nucleotídicas complementarias se enrollan una sobre la otra. Esta doble hélice puede doblarse en el espacio para formar una estructura de orden mayor (super vueltas) si la doble cadena de DNA es una molécula circular cerrada. En consideración a la estructura del DNA, es conveniente definir un eje como una línea imaginaria que pasa por el centro de la doble hélice del DNA. Así, el superenrollamiento que se refiere a la rotación en el espacio del eje de la doble hélice se denomina plectonómico, mientras que el superenrollamiento ejemplificado por el enrollamiento del DNA alrededor de las histonas (centro cilíndrico) se denomina toroidal (Fig. 1) (Bauer et al 1980).

Esta tensión estructural o superenrollamiento es una propiedad del DNA y su topología está definida por la relación $W = L - T$, donde W es el "writhe number" y representa la torsión geométrica del eje de la hélice o supervueltas. L que es el "linking number", es un concepto topológico y representa el número de veces que una hebra de DNA cruza sobre la otra en la molécula de DNA que tiene supervueltas. T es el "twist number" que es el número de veces

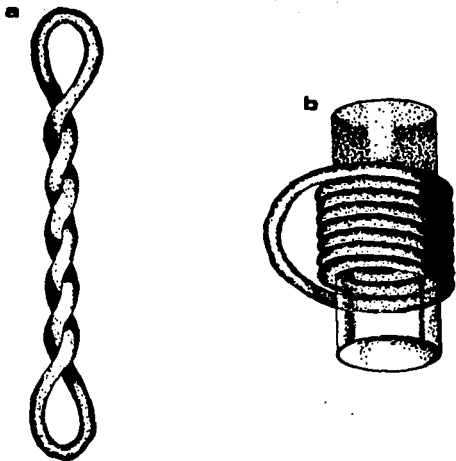


Figura 1. Superenrollamiento: a) Plectonémico; b) Toroidal.

que una hebra del DNA pasa sobre la otra cuando la molécula circular está en un plano; es decir, cuando la molécula está relajada. Esta tensión estructural o superenrollamiento es un valor intuitivo de W , cuando L es diferente de T ; sin embargo W y T no pueden ser medidos, por lo que el superenrollamiento se describe mejor por la relación: $\tau = L - L_0$, donde τ es el número de supervueltas que pueden determinarse experimentalmente en el DNA. Lo cual representa el número de veces que una hebra cruza a otra en la molécula relajada de DNA y es igual, para el DNA-B, al número de pares de bases de la molécula entre 10. El parámetro L es un número topológico que no puede obtenerse experimentalmente y representa el número de veces que una hebra cruza a la otra en la molécula superenrollada. Este parámetro se calcula a partir de L_0 y τ (Drlica 1984).

EL NUCLEOIDE BACTERIANO

El DNA del genoma de las bacterias se encuentra por lo general como una molécula circular cerrada; sin embargo también se puede encontrar como una molécula lineal y su tamaño puede variar entre 585 kilopares de bases (Kpb) en el género *Mycoplasma* y 5700 Kpb en *Bacillus cereus* hasta 6400 Kpb en *Anabena sp* (Krawiec et al 1990). En *E. coli* el cromosoma mide 4700 Kpb y se encuentra como una molécula circular cerrada de una longitud de

aproximadamente 1mm. Ya que la longitud el material genético es de un tamaño muy grande en relación al volúmen que ocupa en la célula, el DNA se organiza de manera de lograr un grado de compactación muy alto (Krawiec et al 1990, Schmid 1988). Esta molécula de DNA se encuentra dentro de la célula formando parte de una estructura muy compacta llamada nucleoide; la cual es un complejo compuesto de DNA, RNA y proteína (Krawiec et al 1990). En el nucleoide el DNA está organizado en aproximadamente 50 dominios topológicamente independientes de aproximadamente 100 Kpb cada uno. El DNA de cada topodominio se encuentran bajo superenrollamiento negativo (Schmid 1988) (Fig. 2).

Proteínas del nucleoide bacteriano.

Como se mencionó anteriormente, en el nucleoide de *E. coli* se encuentran proteínas tipo histona (histone-like). Por lo general, estas son proteínas básicas que se unen al DNA pero no forman estructuras regulares y compactas como lo hacen las histonas en los nucleosomas en la cromatina de las células eucariontes, sino que presentan una organización menos compleja y se disocian más fácilmente del DNA.

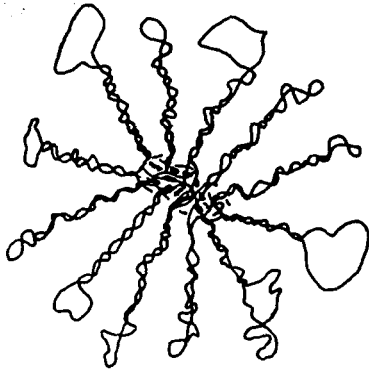


Figura 2. Estructura del DNA en el nucleoside. El DNA de cada topodominio se encuentra bajo superenrollamiento negativo.

La unión de las proteínas "histone-like" como son: la proteína HU (HU-1 y HU-2), la proteína IHF, la proteína HI (HN-S), la proteína HLP1 y la proteína H contribuyen a compactar y a organizar al DNA en el nucleóide (Schmid 1988, Pettijohn 1988).

La proteína HU es un heterodímero de dos proteínas básicas muy similares, HU-1 y HU-2, de 9.5 kDa cada una. Estas proteínas se encuentran en aproximadamente 60,000 copias por célula. En muchas bacterias de diferentes géneros se han identificado proteínas similares a la HU de *E. coli*. La proteína HU se une al DNA como tetrámero, cubre aproximadamente 58 pb, cambia el número de pares de bases (pb) por vuelta de 10 pb a 8.5 pb y puede introducir supervueltas negativas en un DNA relajado (Schmid 1988).

La proteína HU tiene un papel importante en el enrollamiento de secuencias específicas del DNA en diferentes regiones del cromosoma. Esta proteína HU puede estar involucrada también en diferentes funciones que requieren de interacciones proteína-DNA con cierto grado de tensión estructural (Schmid 1988).

La proteína HI o HN-S de 15.5 kDa es una proteína neutra que tiene aproximadamente 20,000 copias por células y se une fuertemente al DNA de doble cadena. La unión de esta proteína al DNA es poco específica en cuanto a

su secuencia, sin embargo se une con gran especificidad a DNA con curvaturas. Esta proteína juega un papel importante en la compactación de DNA y en la transcripción de varios genes (Schmid 1988, Schmid 1990).

En el nucleóide también se encuentran la proteína IHF, la cual es un heterodímero formado por una proteína IHF α de 11.2 kDa y una IHF β de 10.6 kDa (Schmid 1990). El número de copias de estas proteínas no se ha determinado. La proteína IHF se une a secuencias específicas, a diferencia de la proteína HU. Esta proteína se requiere para eventos de recombinación sitio específicos así, como para la expresión de algunos genes (Pettijohn 1988).

TOPOISOMERASAS DE DNA.

El DNA está sujeto a modificación de su estructura no solamente por la unión de cierto tipo de proteínas sino también por la acción de las DNA topoisomerasas (Drlica 1984). Estas enzimas, presentes en todos los organismos, son capaces de catalizar cambios en la estructura del DNA tanto *in vivo* como *in vitro* por medio del corte reversible de una o doble cadena y requieren iones magnesio para llevar a cabo esta actividad. Estas enzimas se unen covalentemente al DNA en el sitio de corte por medio de una unión fosfodiéster entre un grupo fosforilo del DNA y una tirosina de la topoisomerasa (Drlica 1992).

Las topoisomerasas se clasifican en topoisomerasas tipo I y tipo II. Las topoisomerasas de tipo I son endonucleasas que no requieren ATP, interaccionan con DNA superenrollado y catalizan su relajación en la cual el "linking number" L cambia por medio del corte de una de las dos cadenas de DNA. Las enzimas de tipo II son endonucleasas que interaccionan preferentemente con DNA relajado, hidrolizan ATP e introducen supervueltas en el DNA por el corte de doble cadena. Los dos tipos de topoisomerasas ligan al DNA después de cortarlo, sin embargo lo hacen en una posición topológicamente diferente a la posición original (Wang 1982).

En *E. coli*, se han identificado cuatro topoisomerasas: dos de tipo I que son la topoisomerasa I y la topoisomerasa III y dos del tipo II que son la topoisomerasa II (girasa) y topoisomerasa IV. Solamente la girasa puede introducir superenrollamiento en moléculas circulares de DNA por lo que esta enzima es la principal fuente del superenrollamiento de estas moléculas (Drlica 1992).

Topoisomerasa I.

La topoisomerasa I es una proteína de 102 kDa, codificada por el gene *topA* que se localiza en el minuto 28 del mapa genético de *E. coli* (Drlica 1992, Wang 1985). La topoisomerasa I es una enzima que corta una cadena de

DNA y se une covalentemente a un residuo fosfato del extremo 5' de la cadena cortada, posteriormente se liga la cadena de DNA y se obtiene integro el DNA y la enzima funcional. No se han descubierto inhibidores para topoisomerasa I, sin embargo esta actividad es eliminada por mutaciones en el gene *topA* (Drlica 1984).

Las mutaciones en el gene de la topoisomerasa I (*topA*) inducen niveles elevados de SE, por lo que es posible que esta enzima impida el exceso de superenrollamiento. Las células mutantes afectadas en el gene *topA*, crecen pobremente. Sin embargo, existen mutaciones compensatorias generalmente en los genes de la girasa (*gyrA*, *gyrB*) para mantener el nivel normal de superenrollamiento. Los estudios de estas mutaciones enfatizan la importancia del superenrollamiento en el crecimiento celular y al mismo tiempo establecen que un crecimiento rápido es posible dentro de un rango de cambio de $\pm 15\%$ de superenrollamiento (Drlica 1992).

Topoisomerasa III.

La topoisomerasa III (Top III), es una enzima de tipo I de 75 kDa codificada por el gene *topB*, que se localiza en el minuto 38.7 del mapa genético de *E. coli*. Esta enzima presenta una actividad tipo Top I, no requiere ATP, corta sólo una de las cadenas y requieren magnesio y potasio. En la célula

unicamente hay de 1 a 10 moléculas de Top III. Esta topoisomerasa ha sido poco estudiada (Drlica 1992). Recientemente se reportó que las mutaciones en el gene *mutR*, que se identificó posteriormente como el gene *topB*, causan un incremento en la generación de mutaciones por pérdida de DNA (Schofield et al 1992).

Topoisomerasa II (Girasa).

La DNA girasa fué descubierta en 1976 por Gellert y col. quienes intentaban establecer los factores de *E. coli* que se requieren para la integración sitio-específica del fago lambda (λ). Uno de estos factores resultó ser una enzima dependiente de ATP capaz de introducir superenrollamiento negativo al DNA (Reece et al 1991).

La DNA girasa es un heterotetrámero formado de dos subunidades A y dos subunidades B, las cuales son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. El gene *gyrA* está localizado en el minuto 48 y codifica para una proteína de 97,000 Da. El gene *gyrB* está localizado en el minuto 83 y codifica para una proteína de 90,000 Da. (Reece et al 1991).

La proteína A está involucrada en el corte y unión de las cadenas de DNA y probablemente juega un papel en la transducción de energía durante el superenrollamiento del DNA, mientras que la subunidad B tiene la actividad de

ATPasa. Para que la girasa lleve a cabo su actividad requiere de hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico. El número de super vueltas introducidas en el DNA relajado se ha calculado que es aproximadamente igual al número de moléculas de ATP que hidroliza la girasa. Por ciclo de reacción de la girasa se hidrolizan dos moléculas de ATP y el "linking number" (L) cambia en -2 (Fig. 3) (Reece 1991).

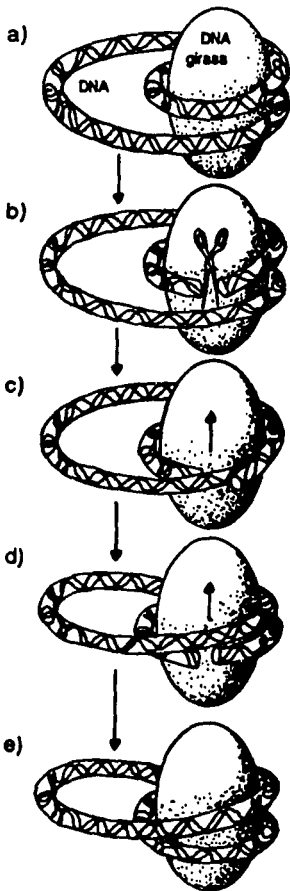
Existen varios inhibidores de girasa como son: coumermicina, novobiocina y clorobiocina, que pertenecen al grupo de las coumarinas. Estos inhibidores compiten por el sitio de unión del ATP, en la subunidad B de la girasa (Fig 4).

Las quinolonas son otro grupo de inhibidores de la girasa y en este grupo estan el ácido nalidíxico, el ácido oxolínico, la ciprofloxacina y la norfloxacina. Las quinolonas inhiben la subunidad A de la girasa y así no se lleva a cabo la unión de la cadena de DNA que ha sido cortada (Fig 5) (Reece 1991).

Topoisomerasa IV.

La Topoisomerasa IV es una enzima tipo II, producto de los genes *parC* y *parE* que se encuentra contiguos en el minuto 65 del mapa genético de *E coli*.

La topoisomerasa IV es una enzima tetramérica formada por dos



La doble cadena de DNA se enrolla en la girasa con sentido a la derecha.

La girasa hace un corte de doble cadena al DNA.

El duplex de DNA pasa a través del corte hecho por la girasa.

La girasa une los extremos libres del DNA. Como resultado, el DNA gira

negativamente y el "linking number" (L) disminuye en dos unidades.

Figura 3. Mecanismo de la DNA girasa.

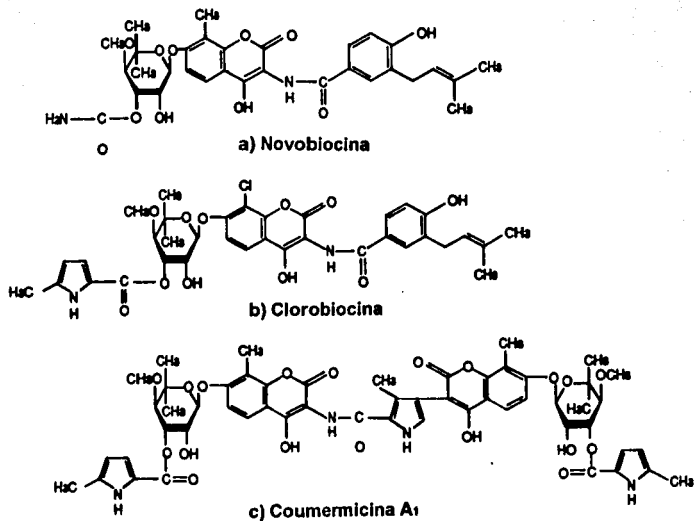
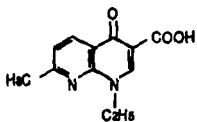
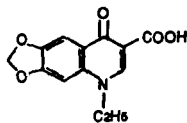


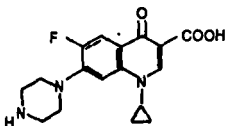
Figura 4. Inhibidores de girasa (Coumarinas).



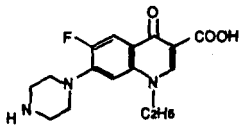
a) Acido nalidixico



b) Acido oxolinico



d) Norfloxacin



c) Ciprofloxacin

Figura 5. Inhibidores de girasa (quinolonas).

subunidades ParE y dos subunidades ParC. La proteína ParE es de 70 kDa y la proteína ParC es de 75 kDa. Esta enzima requiere ATP y corta las dos hebras de DNA y puede suprimir mutaciones en *topA*. La topoisomerasas IV y la girasa están involucradas en desencadenar las copias del cromosoma al final de la replicación (Kato et al 1990, Kato et al 1992).

SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA Y EXPRESION GENETICA.

El SE negativo del DNA es importante para una gran variedad de procesos biológicos. La energía libre de este SE ayuda en procesos que requieren separar las cadenas de DNA como replicación y transcripción (Pruss 1989). El SE favorece la función de las polimerasas, helicasas, proteínas de unión a cadena sencilla de DNA y otras proteínas accesorias. Los estudios recientes de recombinación sitio-específica y transposición sugieren que el SE del DNA juega un importante papel en el alineamiento de secuencias y unión de proteínas y otros ligandos al DNA (Drlica 1984). Se ha demostrado también que el SE es importante en la activación de varios promotores los cuales son sensibles a los cambios en la estructura del DNA, tal es el caso de la expresión de los genes que codifican a la girasa y a la topoisomerasa I. Los inhibidores de girasa causan relajación del DNA y asociado con esta relajación hay un incremento en la expresión de los genes *gvrA* y *gvrB* así como un decremento

en la expresión de *topA*. Un aumento en el nivel de SE, a su vez, induce un incremento en la expresión de *topA* (Pruss 1989).

Otros genes que son sensibles a SE son *proU* y *tonB* (Higgins 1990). El gene *proU* codifica para un sistema de transporte de prolina y glicinbetaina. Cuando las células crecen en un medio con alta osmolaridad, el DNA se encuentra más SE y la transcripción de *proU* se activa y aumenta 100 veces. Esta transcripción disminuye en DNA relajado (Pruss 1989). El gene *tonB* codifica para una proteína de membrana y se induce durante el crecimiento aeróbico y se reprime durante el crecimiento anaeróbico, su promotor es muy sensible a SE y es inducido por DNA relajado.

Otra evidencia que apoya la idea de que el grado de SE modifica la transcripción de un buen número de genes son los estudios realizados en fagos mutantes en los que se compara la transcripción de DNA relajado y de DNA superenrollado. Durante la infección de los fagos, Φ X174 o S13, el DNA entra a la célula como círculos de cadena simple, después se sintetiza la cadena complementaria. Una poza de DNA superenrollado por la girasa y DNA relajado por cortes producidos por el producto del gene A del fago, sirven como templado para la transcripción de RNA mensajero del fago. En mutantes

del gene A, la transcripción se incrementa de 4 a 5 veces en comparación a células infectadas con fagos silvestres (Drlica 1984).

Por otra parte, cuando se usan antibióticos inhibidores de girasa o mutantes sensibles a temperatura, afectadas en los genes *gyr*, se modifican la concentración de algunos RNAs *in vivo*. Las células tratadas con estos inhibidores o las mutantes *gyr* muestran una expresión menor de algunos genes, expresión mayor de otros genes y mantiene sin cambio la expresión de otros. (Drlica 1984) (Tabla 1).

El SE del DNA también juega un papel importante en la regulación de un conjunto de genes que se relacionan con la respuesta celular a diferentes condiciones de estrés (Drlica 1992).

El grado de SE del DNA es diferente en células que crecen en condiciones distintas; por ejemplo, en alta osmolaridad se ve que se incrementa

**TABLA NO. 1 EFECTO DEL SUPERENROLLAMIENTO
DEL DNA EN LA EXPRESION DE ALGUNOS GENES.**

Genes cuya expresión se reduce:

cys JIH, gal, rrnB, LacZ.

malE, malF, malK, lamB, malP, malQ.

Genes tardíos de T7

Genes que aumentan su expresión:

gyrA, gyrB, lacZ-UV, lacI^Q

Genes que no modifican su expresión:

cysE, bla, thrA, trp, cysE

el grado de SE. Un aumento similar se observa en DNA aislado de células que crecen en anaerobiosis comparado con DNA de células que crecen bajo condiciones aeróbicas. El grado de SE varía también de acuerdo a la fase de crecimiento y con la temperatura (Drlica 1992).

En el caso del estrés calórico se sabe que los nucleoides aislados de células sin calentar tienen un coeficiente de sedimentación de 1800-1900S; en cambio los nucleoides aislados de células calentadas a 50°C por 5 minutos tienen un coeficiente de sedimentación de 500-900S. La disminución en la velocidad de sedimentación de los nucleoides refleja un número de alteraciones estructurales tales como desplegamiento del DNA ó corte del mismo, lo cual da como resultado la disminución del grado de superenrollamiento (Pellon et al 1982).

RESPUESTA CELULAR A ESTRES POR CALOR.

Todos los organismos responden a nivel celular a condiciones de estrés por un incremento rápido y transitorio en la expresión de un número específico de genes. Las células pueden estar expuestas a diferentes condiciones de estrés tales como: calor, pH, cambios de osmolaridad, radiación ultra violeta, etanol, inhibidores de grasa, metales pesados, agentes que dañan al DNA, limitación

de fuentes de carbono y aminoácidos, estrés oxidativo e infecciones virales (Gross et al 1991).

Un estímulo está formado por una red compleja de genes que responden a un estímulo determinado. Un regulón es un grupo de operones y genes aislados controlados de manera coordinada a través de un regulador común. Este regulador es por lo general una proteína; represor o activador, que reconoce una secuencia específica localizada en la región reguladora de los genes que controla (Neidhard 1987).

Cualquiera que sea la naturaleza del estímulo que induce un regulón, los cambios deben ser captados por la célula y después convertidos en una señal bioquímica que es interpretado por la célula. El receptor de los estímulos puede ser una estructura celular que sufre daños (DNA, membrana o proteínas) o puede ser un proceso celular que se ve afectado (función de ribosomas o transporte de fosfato). En algunos sistemas bien estudiados, la naturaleza del receptor que capta la señal no se ha establecido de manera definitiva, como en la respuesta a estrés por calor y el de limitación de fosfatos (Neidhard 1987).

La respuesta a estrés por calor (respuesta "heat shock") es una respuesta importante de los organismos a incrementos bruscos de temperatura en la cual un conjunto de genes se activan. En *E. coli* estos genes definen el estímulo de

heat shock. Los genes del estímulo involucran a genes que codifican para chaperonas, proteínas que protegen otras proteínas de la desnaturalización por calor y proteasas que degradan proteínas dañadas en la célula. Se conocen más de 40 genes de "heat shock" de los cuales 15 han sido estudiados funcionalmente (Chuang 1993). La mayoría de estos genes constituyen el regulón de σ^{32} en el cual este factor constituye el regulador positivo. Las proteínas de "heat shock" se clasifican en 4 familias : i) las proteínas de alto peso molecular de 83-90kD; ii) la familia hsp70 de 66-78kD; iii) la familia hsp60, presente en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, y iv) pequeñas proteínas de "heat shock" de aproximadamente 15-30kD (Hendrick 1993). Las proteínas de "heat shock" parecen tener diversas funciones tales como: unión a otros polipéptidos para permitir que estos lleguen a su destino correcto dentro de la célula, transporte de proteínas a través de la membrana y prevención de un plegamiento incorrecto de las proteínas (Hendrick 1993, Marimoto et al 1991).

En *E. coli* las proteínas de heat shock más estudiadas son: DnaK, DnaJ, GrpE GroEL y GroES. Los genes *dnaK*, *dnaJ* y *grpE* fueron originalmente descubiertos porque mutaciones en estos genes bloqueaban la replicación de fago λ *in vivo* (Marimoto et al 1991). Las células mutantes en estos genes

presentan defectos en la síntesis de DNA, RNA, división celular, proteólisis y sobreproducción de proteínas de heat shock. Los miembros de la familia hsp70 son de aproximadamente 70 KDa y se encuentran presentes en todos los organismos. *E. coli* tiene una copia de hsp70 llamada DnaK; esta proteína se expresa en condiciones normales y aumenta su síntesis en presencia de calor y de otros inductores. Todos los miembros de la familia hsp70 tienen un dominio conservado de unión a ATP, seguido por una región hacia el carboxilo terminal menos conservado, la cual tiene el sitio de unión a péptidos (Hendrick 1993). La proteína DnaK de *E. coli*, sufre un cambio conformacional con la unión del ATP, este cambio conformacional posiblemente se relaciona con su especificidad por polipéptidos desplegados (Hendrick 1993, Marimoto 1991).

Se ha demostrado que DnaK y DnaJ juntas, pueden llevar a cabo *in vivo* la translocación del precursor de la fosfatasa alcalina a través de la membrana plasmática de *E. coli* y que la sobreproducción de DnaK y DnaJ puede compensar por la pérdida de la chaperona SecB.

Muchas de las funciones de DnaK son potenciadas por la cooperación de DnaJ y GrpE. Los genes *dnaK* y *dnaJ* constituyen un operón. La proteína DnaJ es activa como un homodímero de 41KDa y estimula la hidrólisis del ATP por

DnaK. Esto incrementa la concentración de ADP-DnaK, la cual se une al sustrato con mayor afinidad.

El gene *grpE* de *E. coli* codifica para una proteína de estrés a calor de 22KDa que es esencial para la replicación del fago λ y para el crecimiento bacteriano a altas temperaturas. GrpE también estimula el intercambio de ADP-ATP por DnaK. El efecto combinado de DnaJ y GrpE da como resultado el incremento por más de 50 veces de la hidrólisis del ATP por DnaK (Hendrick 1993).

Los genes *groES* y *groEL* de *E. coli* originalmente se descubrieron porque las mutaciones en estos genes bloquean la propagación del fago λ así como el crecimiento a altas temperaturas (Marimoto 1991). Estos dos genes se encuentran formando el operón *groESL*. GroES es una proteína de 10.4 KDa y GroEL es una proteína de 57.3 KDa. El complejo funcional de la chaperonina GroE está compuesto por 7 subunidades de la proteína GroES y 14 subunidades de la proteína GroEL. Una gran fracción de las proteínas desnaturalizadas de *E. coli* forman complejos con GroEL que puede ser disueltos con la adición de ATP, esto lleva a sugerir que el plegamiento de las proteínas en general ocurre en asociación con la chaperonina. Por ejemplo, la pre- β -lactamasa y la cloramfenicol-acetiltransferasa se encuentran en complejo

con GroEL inmediatamente después de su síntesis (Hendrick 1993). La mioglobina desnaturalizada por calor puede desplazar a las proteínas unidas a GroEL lo que indica la capacidad de GroEL para unir cualquier proteína desnaturalizada. También facilita el transporte a través de la membrana (Marimoto 1991).

La proteína GroEL posee una débil actividad de ATPasa, dependiente de potasio y contiene 14 sitios de unión para el ATP. Con la adición de magnesio y ATP al complejo GroEL se propicia la salida de la proteína en su estado plegado, por lo que el plegamiento correcto de proteínas unidas a GroEL requiere la adición de ATP y de GroES. El papel de GroES al modular la función de GroEL es poco entendida. La unión del ATP y su hidrólisis por GroEL son procesos cooperativos y GroES incrementa esta cooperatividad. En la ausencia de GroES, la salida de las proteínas no se lleva a cabo con eficiencia (Hendrick 1993).

La hsp60 mitocondrial forma complejos con un número de proteínas de los organelos en condiciones de estrés por calor y previene la inactivación térmica *in vivo* de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Hendrick 1993).

Cuando las células bacterianas son sometidas a estrés por calor, las proteínas GroEL y GroES protegen a la célula evitando que se formen

agregados insolubles de proteínas y que estas se desactiven por acción del calor. Por ejemplo, a una temperatura intermedia de 40°C, GroEL/GroES y ATP pueden mantener a la DHFR en un estado activo, mientras que en ausencia de chaperonina la proteína es inactiva.

En *E. coli* la respuesta al cambio de temperatura de 30 a 42°C se caracteriza por: i) un período de inducción donde la velocidad de síntesis de HSP se incrementa rápidamente, segundos después del cambio de temperatura y ii) un período de adaptación donde la síntesis de proteínas disminuye hasta un nuevo estado basal.

REGULON DE σ^{32} DE LA RESPUESTA A ESTRES POR CALOR.

En *E. coli* el regulón de sigma 32 (σ^{32}) está comprendido por el gene regulador *rpoH* y sus genes regulados. El gene *rpoH* se localiza en el minuto 76 del cromosoma de *E. coli* (Neidhardt 1987) y está situado entre los genes *ftsX* y *livJ*, (Fig 6) (Erickson et al 1987).

El producto del gene *rpoH*, una proteína de 32 Kda, es un factor sigma (σ), el cual le confiere a la RNA polimerasa especificidad a ciertos promotores los cuales son reconocidos solamente por la RNA polimerasa acoplada al factor

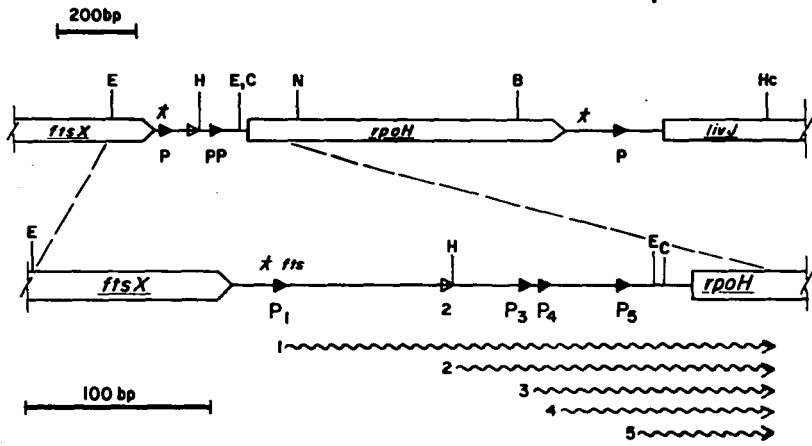


Figura 6. Localización del gene *rpoH* y su región promotora. Sitios de restricción de las enzimas: E, *EcoRV*; H, *HindIII*; C, *Clal*; N, *NcoI*; Hc, *HincII*; B, *BssHII*.

σ^{32} . Estos promotores difieren substancialmente de los promotores regulares con respecto a la región -35, la región -10 y el tamaño del espaciador entre ambas regiones (Bukau 1993).

Sin embargo, no todas las proteínas de *E. coli* inducidas por estrés por calor forman parte del regulón controlado por σ^{32} . El factor σ^{24} recientemente descubierto, es activo a altas temperaturas y controla la expresión de genes de "heat shock" independientes de σ^{32} , lo cual sugiere la existencia de un segundo regulón de estrés a calor.

El papel de sigma 24 (σ^{24}) no es bien conocido, sin embargo se conocen dos genes que son transcritos por σ^{24} : *rpoH* y *htrA*. Lipinska y col. secuenciaron la región promotora de *htrA* y notaron que esta secuencia es parecida a la secuencia del promotor P3 de *rpoH* (un promotor de σ^{24}) por lo que se propuso que *htrA* podría ser transcrito por σ^{24} . Erickson y col. demostraron que el promotor de *htrA* es reconocido por σ^{24} y que su transcripción es inducida después del cambio de temperatura de 30°C a 50°C, además la transcripción de este gene es independiente de sigma 70 (σ^{70}).

En la caracterización del gene *rpoH* se detectaron 2 RNA mensajeros (mRNA) provenientes de *rpoH* de aproximadamente 1200 y 1400 nucleótidos. También se determinó la cantidad de estos dos transcritos antes y después del

estrés por calor. Se vió un incremento de 5 veces en la concentración de estos transcritos entre los 4 y 10 minutos después del cambio de temperatura (Tilly et al 1986).

En experimentos de mapeo por S1 de los promotores de *rpoH* se detectaron cuando menos cinco promotores para el gene *rpoH*: P1, P2, P3, P4 y P5. Estos promotores son los responsables de la expresión de este gene; sin embargo, un aspecto importante de estos promotores en el control de la transcripción de *rpoH* es su activación con temperatura. En condiciones de crecimiento a 30°C, los promotores P1 y P4 son los que se mantienen activos y transcriben el 90% del total del mRNA de *rpoH*; el promotor P1 es el más fuerte de los dos (Erickson et al 1987).

Cuando hay un cambio de temperatura de 30°C a 43.5°C, la transcripción se incrementa a partir de los promotores P1 y P4; sin embargo, también se empieza a activar la transcripción a partir del promotor P3 la cual aumenta dentro de los primeros 4 minutos del cambio de temperatura. Al aumentar la temperatura a 50°C, la transcripción de los promotores P1 y P4 disminuye gradualmente dentro de los 30 minutos después del cambio de temperatura y P3 mantiene la transcripción del gene por lo menos por 85 minutos. La transcripción de *rpoH* a partir de los promotores P1, P4 y P5 se lleva a cabo

por el factor σ^{70} . A altas temperaturas la transcripción de *rpoH* es principalmente a partir del promotor P3 y se propone que ésta depende del factor σ^{24} (Erickson et al 1987).

También se han descrito dos controles adicionales para la transcripción de *rpoH* que están relacionados con otros niveles de regulación. Primero, la transcripción de P5 requiere para su activación del complejo CRP-AMPc. Una secuencia de unión para CRP (TGTGGATAAAATCACG) se localizó a 38 o 39pb en el extremo 5' del inicio de la transcripción (Nagai et al 1990, Bukau 1993).

Se ha visto también que la transcripción a partir del promotor P5 con CRP-AMPc se acompaña de una disminución en la transcripción a partir del promotor P4, sugiriendo una interferencia por parte de este complejo en la activación de este promotor. Por otra parte las mutantes en *crp* producen poco o ningún transcrito del promotor P5. Este control de la transcripción del promotor P5 por represión catabólica (CRP-AMPc) es el responsable de aumentar el nivel de RNA mensajero de 2 a 3 veces en condiciones de crecimiento sin glucosa (Nagai et al 1990).

Delaney en una serie de experimentos con cepas de *E. coli* tipo silvestre y mutantes en el gene que codifica la enzima adenilato ciclasa (*cya*) demostró

que en estas mutantes no se presentaba el HS. Estas dos cepas muestra un patrón de proteínas similar a 30°C; sin embargo a 42°C únicamente en la cepa silvestre se inducen unas proteínas de estrés calórico. Dos proteínas son particularmente evidentes en este patrón, las cuales tienen pesos moleculares de 70 y 63KDa respectivamente por lo que se piensa que son DnaK y GroEL. En mutantes *cya* el patrón de proteínas después del estrés por calor es diferente al patrón de proteínas de células silvestres. Según Delaney estas células mutantes no muestran una respuesta típica porque las proteínas de 70, 63 KDa y otras no son inducidas. La proteína de 70 KDa (DnaK) parece mantenerse a un nivel basal durante la exposición a calor (Delaney 1990).

Sin embargo, se observó que en cepas CA8000 *Cya*⁺, CA8306 *Cya*⁻, W3110 *Cya*⁺ y MK1010 *Cya*⁻ que crecen a 30°C y después se exponen a 42°C y 47°C en diferentes medios de cultivo (medio Luria, medio Hersey's con y sin glucosa al 0.2% y medio mínimo suplementado con aminoácidos y glucosa o glicerol) ambas cepas presentaron una clara inducción de las proteínas por estrés a calor, como es el caso de las proteínas DnaK y GroE, por lo que la inducción del regulón de estrés por calor se lleva a cabo aún en ausencia de AMPc. Estos resultados sugieren que los promotores alternativos de *rpOH*

aseguran la expresión de este gene y que la respuesta HS se da en presencia o ausencia de AMPc (Lee et al 1994).

Se han propuesto dos sitios de unión para la proteína DnaA en el extremo 5' de *rpoH*. Los ensayos de transcripción tipo "Run-off" se llevaron a cabo para determinar la importancia de la proteína DnaA en la transcripción de *rpoH*. La transcripción a partir del promotor P4 se inhibe por esta proteína y de manera semejante la transcripción del promotor P3 también se inhibe. La transcripción del promotor P1 no se ve afectada por la presencia de la proteína DnaA en la región de los promotores P3 y P4. Existe la posibilidad que la expresión de *rpoH* esté acoplada al control de la proteína DnaA y al ciclo celular. Por lo que respecta al promotor P2, este se identificó únicamente en una cepa (Wang et al 1989).

En una serie de estudios realizados por Fujita et al en 1987 se identificaron 3 promotores (P1, P2 y P2*). El promotor que P2 aumentó su expresión con el cambio de temperatura hasta 5 veces, mientras que el promotor P1 no modificó su expresión con la temperatura. El tercer promotor descrito es el promotor P2*, el cual fluctuó considerablemente de experimento a experimento; sin embargo, éste parece aumentar también con el cambio de la temperatura. Como se puede apreciar se han utilizado dos nomenclaturas

diferentes para los promotores del gene *rpoH* (Fujita et al 1987). Un análisis de la secuencia de la región reguladora de *rpoH* muestra la siguiente equivalencia de los promotores de los grupos de Erickson y Ueshima, respectivamente: P1=P1, P3=P2* y P4=P2. Es importante notar que mientras el grupo de Erickson et al identificó al P3 (P2*) como el promotor que responde a temperatura, el grupo de Fujita et al propone que es el promotor P2 (P4) el que se activa con calor.

SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA Y GENES DE ESTRES CALORICO.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los genes de algunos sistemas globales de regulación, se modifica con el cambio en la estructura del DNA. Travers en su trabajo (1982) reporta que los agentes que alteran el grado de SE del DNA como la coumermicina (un inhibidor de la subunidad B de la girasa), induce la síntesis de varias proteínas de estrés calórico y se propone que el cambio en la estructura del DNA es la señal de la inducción de los genes de estrés calórico. Este autor concluye que la síntesis de las principales proteínas de estrés calórico, GroE y DnaK se incrementa por la disminución en el grado del SE del DNA y que la síntesis de estas proteínas es importante en la

protección de la célula contra los efectos del calor sobre el SE del DNA (Travers 1982).

Además de estos estudios sobre el efecto del cambio del SE del DNA en la expresión de genes de estrés calórico, existen reportes sobre la expresión *in vitro* del gene regulador *rpoH*. Estos estudios se hicieron utilizando DNA lineal (relajado) y DNA SE (Ueshima et al., 1989). El grupo de Carol A. Gross reportó (en datos no mostrados; Erickson et al 1987) que existe diferencia en la actividad de los promotores P1 y P4 en DNA lineal y superenrollado. Estos datos sugieren que estos dos promotores responden a cambios en el SE del DNA. Por otra parte el grupo de Ueshima, también en estudios *in vitro*, reportó que en DNA lineal y en DNA SE la actividad del promotor P1 es similar y la actividad del promotor P2 que corresponde al P4 en la nomenclatura propuesta por Carol A. Gross, es mayor en DNA SE que en DNA lineal. Los estudios de estos dos grupos muestran que sus datos no coinciden en cuanto a la dependencia del SE del DNA del promotor P1 ya que el grupo de Carol A. Gross reporta que este promotor es dependiente del grado de SE del DNA mientras que para el grupo de Ueshima el promotor que responde al grado de SE es el promotor P2 (P4).

En resumen, los experimentos llevados a cabo para ver la dependencia del grado de SE del DNA sobre los promotores del gene *rpoH* son experimentos que se hicieron *in vitro*. Para ver la activación de la transcripción de *rpoH* y la dependencia de los promotores de este gene al grado de SE del DNA se hicieron construcciones de *rpoH* en plásmidos y se ensayaron en sistemas de transcripción *in vitro* (Erickson et al 1987). El gene *rpoH* tiene uno o dos promotores cuya actividad depende del grado de SE del DNA y cuando menos dos de los principales genes regulados por *rpoH* (*groE* y *dnaK*) se expresan mejor en DNA relajado.

Sin embargo, como ya se mencionó, existe controversia respecto a cuales son los promotores de *rpoH* que modifican su expresión de acuerdo al grado de SE del DNA.

OBJETIVOS

Como se mencionó, el SE del DNA tiene un papel importante en la regulación de la expresión genética. Hay genes que responden al grado de SE del DNA y modifican su expresión de acuerdo a éste. Sin embargo, otros genes se expresan de manera independiente del grado de SE del DNA.

Se ha propuesto que la expresión de los genes de estrés calórico y del regulador *rpoH* responden a cambios en el grado de SE del DNA y que por otra parte, es posible que durante el estrés por calor el DNA sufra cambios en su estructura. Por lo anterior, los objetivos de este trabajo son:

- 1.-) Determinar si la expresión del gene *rpoH* (σ^{32}) *in vivo* depende del grado de superenrollamiento del DNA.
- 2.-) En caso afirmativo, identificar el o los promotores de *rpoH* que modifican su actividad al cambiar el grado de superenrollamiento del DNA.
- 3.-) Determinar si la respuesta a estrés por calor se modifica, al cambiar el grado del superenrollamiento del DNA en células tratadas con inhibidores de girasa.
- 4.-) Determinar la transcripción del operón *groES-groEL* en DNA superenrollado y relajado y comparar esta transcripción con la que se obtiene al inducir este operón con calor.

MATERIAL

1. CEPA DE *Escherichia coli* Y PLASMIDOS USADOS EN ESTE TRABAJO.

CEPA	Características
W3110	Prototrofa F-
PLASMIDOS	
pBR322	Ap ^r Tc ^r (Balbas et al 1986).
pLN44	Ap ^r Tc ^r <i>groES-groEL</i> derivado de pBR325 (Fayet et al 1986).
pKV3	Ap ^r <i>rpoH</i> derivado de pBR322 (Tobe et al 1984).
pMS01	Ap ^r Tc ^s derivado de pBR322

2. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 110°C, a 15 libras de presión y durante 25 minutos.

-MEDIO LURIA (LB)

Bacto triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Timina	0.002g
NaOH 2.5 M	1 ml
Agua desionizada	1000 ml
Medio mínimo (M1)	
NH ₄ Cl	1g
K ₃ PO ₄	3g

Na₃PO₄	6g
NaCl	0.5g
Bacto agar	20g
Dextrosa al 20%	10 ml
MgSO₄ al 25%	1 ml
Vitamina B1 al 0.1%	0.16ml
Agua desionizada	1000ml

-MEDIO EN PLACA CON AGAR SEMISOLIDO (L1)

Medio LB	1000ml
Bacto agar	20g

-MEDIO EN PLACA McCONKEY

Medio McConkey	50g
Agua destilada	1000ml

-MEDIOS EN PLACA CON ANTIBIOTICOS

Despues de la esterilización del medio de cultivo L1 se adicionó el antibiótico requerido a las siguientes concentraciones:

Ampicilina	200 µg/ml
Cloramfenicol	25 µg/ml
Espectinomicina	25 µg/ml
Estreptomocina	50 µg/ml
Kanamicina	25 µg/ml
Tetraciclina	25 µg/ml

3. SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES.

-AMORTIGUADOR TBE 10X (pH 8.3)

Trizma-base	0.90M
Acido bórico	0.90M

EDTA 0.10M

-AMORTIGUADOR A (pH 8)

Hepes 0.5 M

EDTA 0.01M

-AMORTIGUADOR PARA ELECTROFORESIS EN GELES

DESNATURALIZANTES DE AGAROSA (pH 7.8)

Solución amortiguadora A (pH 8) 1X

Formaldehido 6%

-SOLUCION DE SSC 20X (pH 7)

Cloruro de sodio 3M

Citrato de sodio 0.3M

-SOLUCION DE FORMALDEHIDO/FORMAMIDA

Formaldehido (37%) 89 μ l

Formamida 250 μ l

-SOLUCION I

Glucosa 20% 4.5ml

Tris-HCl 1M pH 8 2.5ml

EDTA 0.25M pH 8 4.0ml

Agua desionizada 89 ml

-SOLUCION II

NaOH 1N 20ml

SDS 10% 10ml

Agua desionizada 70ml

-SOLUCION III

Acetato de potasio 3M

Acido acético glacial 11.5ml

-SOLUCION TSS 2X (pH 6.5)

Polietilenglicol	10%
Dimetil sulfóxido	5%
MgCl ₂	50mM
-SOLUCION TNE 10X (pH 8)	
Tris	1M
NaCl	5M
EDTA	0.5M

-SOLUCION (HM-50) DE PREHIBRIDACION.

SSC 20X	250ml
SDS 10%	20ml
Formamida 50%	500ml
Polivinilpirrolidona (PVP-360)	0.2g
Ficoll (tipo 400)	0.2g
Albúmina de suero bovino	0.2g
DNA de timo de temera (10mg/ml)	50ml
Agua desionizada	160ml

-SOLUCION DE HIBRIDACION

La solución de hibridación es la misma que la solución de prehibridación sólo que a ésta no se le adicionó DNA de timo de temera.

-SOLUCIONES DE LAVADO.

- SSC 0.1X y SDS 0.5%
- SSC 2X y SDS 0.5%
- SSC 2X y SDS 0.1%
- SSC 0.1X

-SOLUCION DE ACRILAMIDA 30% Y BIS-ACRILAMIDA 0.8%

Acrilamida 30g

Bis-acrilamida 0.8g

Agua desionizada 100ml

-SOLUCION DE PERSULFATO DE AMONIO 10%

Persulfato de amonio 100mg

Agua desionizada 1ml

4. INHIBIDORES DE GIRASA.

Los antibióticos inhibidores de girasa que se usaron en este trabajo fueron:

Antibiótico	Concentración
Novobiocina (Nov)	60, 80 y 600 $\mu\text{g/ml}$
Coumermicina (Cou)	60 $\mu\text{g/ml}$
Acido nalidixico (Nal)	60 $\mu\text{g/ml}$

5. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las enzimas de restricción (GIBCO BRL) que se usaron en este trabajo fueron: *Hind*III, *Pvu*II, *Sma*I, *Kps*I.

*Hind*III-*Pvu*II para obtener la sonda *rpoH*.

*Sma*I-*Kps*I para obtener la sonda *groES-groEL*.

METODOS

1. TRANSFORMACION DE CEPAS.

La cepa W3110 se transformó con los plásmidos pLN44 y pKV3 a partir de cultivos en medio Luria la fase media exponencial. Se tomaron 0.5 ml del

cultivo, se les adicionó 0.5ml de TSS 2X y el DNA (1 μ g). Las células se incubaron a 43°C por 5 minutos, se les agregó medio de cultivo nuevo (LB) y se incubaron a 37°C por dos horas.

Posteriormente de este cultivo se tomaron 100 μ l y se sembraron en cajas con medio LB con el antibiótico. El resto del cultivo se dejó toda la noche y de este se sembraron 100 μ l en cajas con el antibiótico.

2. PURIFICACION DE PLASMIDOS.

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo por gradientes de CsCl a 80,000 rpm, rotor NVT 90. Las cepas se crecieron en medio Luria con ampicilina (200 μ g/ml) y en agitación por toda la noche. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos y se lisaron por el método de lisis alcalina (Sambrook et al 1989).

3. ELECTROFORESIS DE TOPOISOMEROS.

El DNA de los plásmidos se obtuvo a partir de 10ml de un cultivo en la fase media exponencial por el método de lisis alcalina (Sambrook et al 1989). Los topoisómeros del plásmido reportero pMS01 se separaron en geles de agarosa en presencia de cloroquina a 10 μ g/ml en amortiguador TBE a 25 volts por 20 horas. Los geles se incubaron en agua por un mínimo de 6 horas para eliminar la cloroquina y después se tiñeron con bromuro de etidio a 10 μ g/ml, las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se fotografiaron.

4. PURIFICACION DE LA SONDA DE DNA EN GELES DE BAJO PUNTO DE FUSION.

Después de haber cortado los plásmidos con las enzimas de restricción, el DNA se corrió en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. La

electroforesis se corrió a 80 volts hasta que el colorante del frente llegó a la mitad del gel, después el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (5µg/ml) y se cortó la banda de DNA deseada.

La agarosa que contiene el fragmento de DNA se fundió a 65°C y se le agregó una solución de TNE 2X. El DNA se extrajo con fenol dos veces y posteriormente con eter para extraer el fenol (Sambrook et al 1989).

5. MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA DE DNA.

Las sondas del DNA que se utilizaron para llevar a cabo la hibridación se marcaron por el método de "Random primer" (Amersham). Se tomó aproximadamente 1 µg de DNA y se hirvió por 5 minutos. A la solución de DNA se le adicionó una mezcla de oligonucleótidos con secuencias al azar, GTP, CTP, TTP y [α -³²P]ATP (50µCi) y la enzima DNA polimerasa I (Fragmento Klenow). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 1 hora. Después la mezcla radioactiva se pasó por una columna de Sephadex G-50 para separar la marca radioactiva no incorporada.

6. PURIFICACION DE RNA TOTAL.

El RNA total se obtuvo de la cepa *E. coli* W3110 y se purificó por el método de fenol caliente, con algunas modificaciones. Las células se crecieron en medio LB o en M1 hasta la fase media exponencial. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm.

Inmediatamente se le agregó 1ml de fenol caliente a 65°C mas 1ml de agua filtrada y estéril. Las fases se mezclan por 10 minutos y la operación se repitió por dos ocasiones más. Posteriormente el RNA se precipitó con acetato de sodio 3M (0.3 molar concentración final) y etanol absoluto (2.5 veces el

volumen). La mezcla de precipitación se incubó a -20°C por 12-16 horas y finalmente se centrifugó a 5000rpm por 10 minutos.

La pastilla de RNA se secó, se resuspendió en 500 ml agua y se extrajo con eter para quitar el exceso de fenol. Posteriormente se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm en la solución de RNA, esta relación debe estar entre 2 y 2.2. Una unidad de absorbancia a 260 corresponde aproximadamente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA.

7. FIJACION DEL RNA EN RANURA.

El RNA se fijó en filtros de Nylon Zeta-probe de BIO-RAD de 9×12 cm, el cual se montó en el aparato de "slot-blot" (BIO-RAD. Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus, Instruction Manual, Cat. No. 170-6542, 170-6543). El RNA se puso previamente en 500 μl de una solución fría de NaOH 10 mM y EDTA 1mM, después se colocó en la ranura. Las muestras de RNA se fijaron al filtro con luz ultravioleta.

8. ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DESNATURALIZANTES.

El RNA se corrió en geles de agarosa al 1.5% con formaldehído (Sambrook et al 1989). Previó al corrimiento en estos geles, el RNA se mezcló con amortiguador A (Hepes/ EDTA), formaldehído/formamida y colorante (amortiguador de corrida). Las muestras se incubaron por 10 minutos a 60°C y el RNA se separó en un gel de agarosa por electroforesis a 25volts por 16-18 hrs hasta que el colorante del frente corrió aproximadamente tres cuartas partes del gel.

9. TRANSFERENCIA DEL RNA A PAPEL DE NITROCELULOSA.

El RNA se transfirió a papel de nitrocelulosa de 0.45 μ m de Schleicher & Schuell. La transferencia se llevó a cabo en presencia de un amortiguador de alta sal (SSC 20X), por aproximadamente 15 horas con varios cambios de papel absorbente (Sambrook et al 1989).

10. HIBRIDACION DE LA SONDA DE DNA.

El filtro en el cual está el RNA se puso en una bolsa especial de nylon y se prehibridó con la solución de HM-50 por 4 horas. Después se le cambió esta solución y se le puso solución nueva de hibridación HM-50 con la sonda radioactiva y se incubó a 42°C por 20 horas. Después se lavó el filtro con diferentes soluciones de SSC y SDS. El primer lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 minutos con una solución de SSC 2X y SDS 0.5%. El segundo lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente por 15 minutos con una solución de SSC 2X y SDS 0.1%. El tercer lavado se llevó a cabo a 57°C por 2 horas con una solución de SSC 0.1X y SDS 0.5% y el cuarto lavado se llevó a cabo a 57°C con una solución de SSC 0.1X por 30 minutos con agitación lenta. Todos los lavados se llevaron a cabo con agitación lenta.

11. MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEINAS Y SU SEPARACION POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Las proteínas se marcaron con [³⁵S-Metionina], 10 μ Ci por ml de medio mínimo. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 11 % (Laemmli 1970). Los geles que contenían las proteínas marcadas se secaron y expusieron en placas de rayos X de KODAK X-OMAT. Las placas se revelaron según recomendaciones de Kodak.

RESULTADOS

EFEECTO DE LA NOVIOBIOCINA EN EL CRECIMIENTO DE *E. coli* Y EN EL SUPERENROLLAMIENTO DE UN PLÁSMIDO REPORTERO.

Para estudiar el efecto del superenrollamiento (SE) del DNA en la expresión de los genes *rpoH* y *groES-groEL* se requiere tener dos niveles diferentes de SE del DNA. Para esto se utilizó un inhibidor de girasa como la novobiocina (Nov). Para determinar la concentración de Nov adecuada, se analizó primero su efecto fisiológico general en la curva de crecimiento y posteriormente su efecto en el grado del SE por medio de un plásmido reportero. Las concentraciones de Nov que se usaron fueron: 60µg/ml, 80µg/ml y 100µg/ml. Las células se pusieron en presencia de estas diferentes concentraciones de Nov desde el inicio de la curva de crecimiento.

La cepa de *E. coli* W3110 se transformó con el plásmido pMS01, el cual sirvió como plásmido reportero del SE del DNA. Las células se crecieron a una DO 550 de 0.4 y la Nov se adicionó al medio de cultivo por 10 minutos durante la fase media exponencial. Las células se cosecharon, el plásmido se purificó y sus topoisómeros se separaron en geles de agarosa en presencia de cloroquina (Material y métodos). Estos experimentos se repitieron varias veces en medio Luria y medio mínimo.

Como se puede ver en la figura 1, en la cual están representadas solamente las curvas de crecimiento en medio Luria con y sin Nov (100µg/ml), la curva de crecimiento en presencia de 100µg/ml de Nov es similar a la curva de crecimiento sin el antibiótico, en consecuencia esta concentración de Nov no modificó la fisiología celular de manera importante.

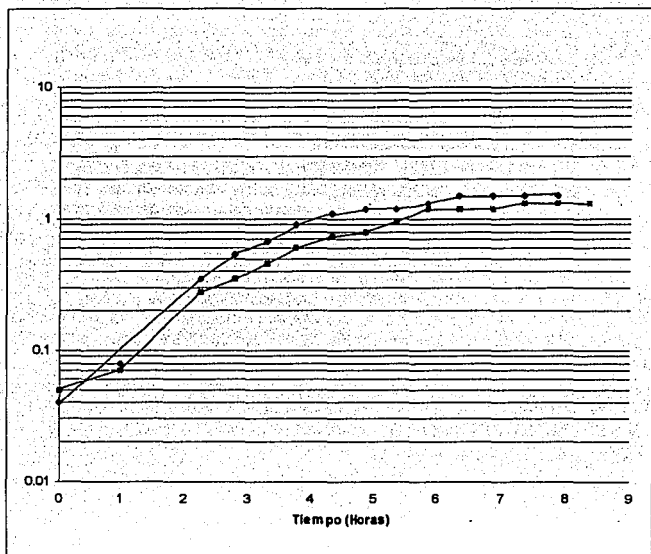


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* W3110. La cepa W3110 se creció en medio Luria a 30°C en presencia de novobiocina, 100 µg/ml (⊠) y en ausencia de novobiocina (◆).

En la figura 2 se puede observar que cuando las células son expuestas en medio Luria por 10 minutos a Nov 60µg/ml, 80µg/ml y 600µg/ml, los topoisómeros del plásmido reportero se encuentran recorridos hacia arriba respecto al control de células sin Nov a 30°C. Los resultados muestran que en medio Luria la Nov a 60µg/ml, 80µg/ml y 600µg/ml induce una relajación similar en el grado de SE del plásmido reportero. Estos experimentos se realizaron también en medio mínimo y se vió el mismo efecto de la Nov sobre el SE del DNA de los plásmidos reporteros.

Como se mencionó, se usaron diferentes concentraciones de Nov para ver su efecto sobre en la curva de crecimiento y en el grado de SE del DNA. La curva de crecimiento no se altera significativamente, sin embargo existe una relajación de los topoisómeros del plásmido reportero. Por lo anterior, se decidió usar las concentraciones de Nov (60, 80 y 600µg/ml) en experimentos posteriores.

EFFECTO DE LA NOVOBIOCINA EN LA TRANSCRIPCION *in vivo* DEL GENE REGULADOR DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO *rpoH*.

Para evaluar *in vivo* el efecto del SE en la transcripción de *rpoH* y conocer si la expresión de este gene es sensible a cambios en la estructura del DNA, se modificó el grado de SE por medio de la Nov y se realizó un experimento de hibridización RNA-DNA tipo "slot-blot".

El RNA total se aisló de células creciendo a 30°C todo el tiempo, de células a 30°C en la fase media exponencial a las cuales se les dió un estrés por calor de 43°C y 50°C por 10 minutos y de células a 30°C creciendo en la fase media exponencial a las cuales se les añadió Nov (60 µg/ml y 600 µg/ml) por 10 minutos. Estos experimentos se realizaron en medio Luria y en medio mínimo varias veces. Se verificó que el RNA estuviera íntegro en geles de

Novobiocina ($\mu\text{g/ml}$)

0 60 80 600

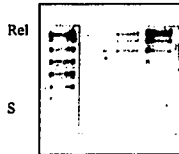


Figura 2. Topoisómeros del plásmido pMSO1. Las células se cultivaron a 30°C en medio Luria. Los plásmidos se extrajeron y se separaron en geles de agarosa en presencia de cloroquina.

agarosa. La presencia de las bandas de los RNAs ribosomales 23S, 16S, 5S, RNA de transferencia y de los precursores de estos RNAs confirma que el RNA no está degradado (Fig 3). Es importante que en los experimentos de "slot-blot" el RNA esté íntegro para que la cuantificación de los mensajeros sea correcta.

El RNA se cuantificó por medio de densidad óptica a 260 nm y por visualización en geles de agarosa. Después el RNA se fijó en membranas de nylon con luz ultravioleta. Para llevar a cabo el experimento de hibridización se usó como sonda de *rpoH*, el fragmento *HindIII-PvuII* del plásmido pKV3. Esta sonda contiene parte de la región promotora y el gene estructural de *rpoH* (Fig 4). La sonda se marcó radioactivamente por el método de "random primer" (Material y métodos).

Los experimentos que se llevaron a cabo para ver el efecto *in vivo* de la modificación de la estructura del DNA sobre la transcripción de *rpoH* fueron:

a.-) Estrés de temperatura a 43°C y 50°C. Como control se usó el RNA total que se extrajo de células las cuales se sometieron a estrés por calor a 43°C y 50°C por 10 minutos. En estas condiciones el RNA mensajero de *rpoH* incrementa su síntesis de 2 a 5 veces (Tilly et al 1986, Erickson et al 1987). Como se puede ver en la figura 5A carriles 6 y 7, cuando las células se someten a estrés por temperatura, existe un incremento en la cantidad del mensajero de *rpoH* como era de esperarse. Este incremento es mayor cuando el estrés fue de 50°C (Fig 5A carril 7) que cuando fue de 43°C (Fig 5A carril 6).

b.-) En presencia de novobiocina. Las células se crecieron hasta la fase media exponencial y se les añadió Nov durante 10 minutos en medio Luria y en medio mínimo. En la figura 5A carriles 2, 3, 4 y 5 se puede ver el efecto de la Nov (60µg/ml y 600µg/ml) en la transcripción de *rpoH*. En medio Luria no se aprecian cambios significativos en la concentración del mensajero de *rpoH*

PRECURSORES DE RNA-
RNA 23 S-
RNA 16 S-
tRNA y RNA 5S-



FIGURA 3. Separación de RNA total en geles de agarosa. Las células se crecieron a 30°C en medio Luria y se les extrajó el RNA por el método de fenol caliente (Material y métodos). El RNA se separó en geles de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz ultravioleta.

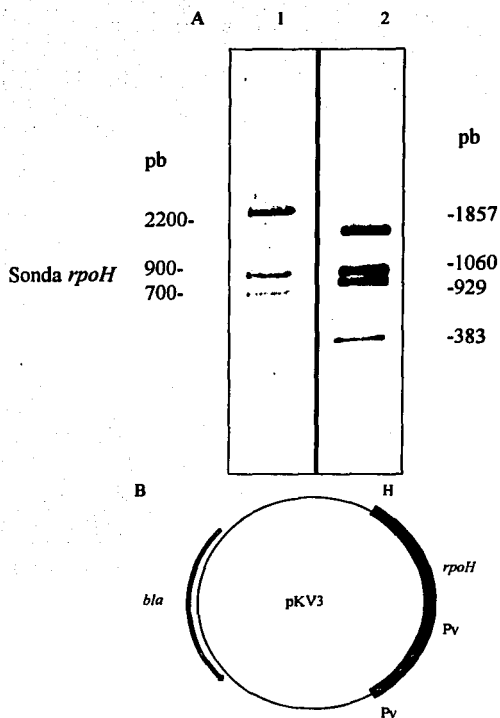


FIGURA 4. Patrón y mapa de restricción del plásmido pKV3.

A) Patrón de restricción del plásmido pKV3. Carril 1 pKV3 digerido con *Hind*III y *Pvu*II. Carril 2 control de peso molecular: pBR322 digerido con *Bst*II. B) Mapa de restricción del plásmido pKV3. H, *Hind*III; Pv, *Pvu*II. Sonda *rpoH*

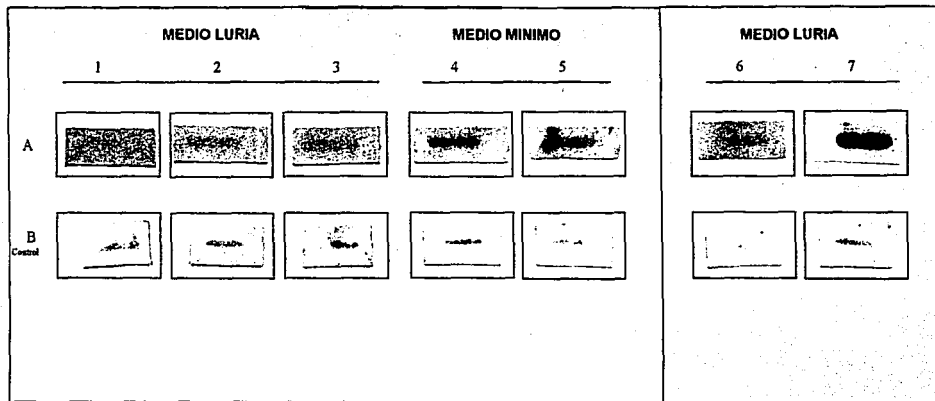


Figura 5. Expresión del gene *rpoH* y su relación con el superenrollamiento del DNA.

El RNA total se fijó a membranas de nylon y se hibridó (A) con la sonda *rpoH*. Este filtro se lavó y se rehidró con DNA total (B). 1.) Células a 30 °C, 2.-) Células a 30°C, Nov 60 µg/ml, 10 minutos, 3.-) Células a 30°C, Nov 600µg/ml, 10 minutos, 4.-) Células a 30 °C, 5.-) Células 30°C, Nov 60µg/ml, 6.-) Células a 30°C y cambiadas a 43°C 10 minutos, 7.-) Células a 30°C y cambiadas a 50°C 10 minutos.

cuando el grado de SE del DNA se modifica con Nov respecto a su control a 30°C sin Nov (Fig 5A carriles 2 y 3). En los experimentos realizados en medio mínimo figura 5A carriles 4 y 5 se observa el mismo efecto que en medio Luria: no hay cambios significativos en la concentración del mensajero de *rpoH*.

Como control de la concentración de RNA, se marco radioactivamente el DNA total de la capa W3110, el cual se hibridó con el RNA contenido en el filtro.

De acuerdo a los resultados obtenidos por el método de hibridación tipo "slot-blot", no se detectan cambios en la concentración del mensajero de *rpoH*. Sin embargo, este método es poco sensible y no permite ver cambios pequeños en la concentración del mensajero de *rpoH*. Por esta razón se probó un método más sensible que permite detectar cambios pequeños en el RNA mensajero de *rpoH*. Como se mencionó anteriormente, el gene *rpoH* tiene dos promotores, P1 y P4, los cuales son activos a 30°C. Es posible que estos promotores afecten su actividad de manera contraria, al relajarse el DNA con Nov. Si esto fuera así, entonces podría ocurrir que la cantidad total de RNA mensajero no cambiara, pero que sin embargo este gene tuviera promotores sensibles al grado del SE del DNA.

Para ver *in vivo* el efecto de la modificación del grado de SE del DNA y su importancia sobre la activación de la transcripción de los promotores de *rpoH*, se llevó a cabo un experimento tipo "Northern blot" (hibridación RNA-DNA).

Como ya se mencionó, el gene *rpoH* tiene 4 promotores P1, P3, P4 y P5. Los promotores P1 y P4 son activos a 30°C. El promotor P3 es activo durante el estrés calórico y el promotor P5 es activo cuando las células están creciendo en ausencia de glucosa y tienen una concentración adecuada de AMPc.

En experimentos tipo "Northern blot" no es posible separar los RNA mensajeros que corresponden a los promotores P3, P4 y P5 porque la diferencia entre el número de bases de estos RNA mensajeros es muy pequeña. La diferencia del número de bases entre el RNA mensajero del promotor P1 y el promotor P4 es de 138 bases; mientras que entre el promotor P3 y el promotor P4 es de 6 bases. Entre el promotor P4 y el promotor P5 es de 21 bases.

Como se mencionó anteriormente, en estudios realizados *in vitro* para ver el efecto del SE en la actividad de los promotores de *rpoH*, el promotor P1 se mantiene sin cambio en DNA relajado y superenrollado, mientras que el promotor P4 disminuye su expresión en DNA relajado (Ueshima et al 1989). Sin embargo hay reportes en los cuales se menciona que ambos promotores modifican su expresión en DNA lineal o superenrollado (Erickson et al 1987).

Las células se crecieron en medio Luria y medio mínimo, con 0.2% de glucosa, a 30°C en agitación en presencia o ausencia de novobiocina. El RNA total (Material y métodos) se purificó y se corrió en geles desnaturizantes de agarosa. La cantidad de RNA que se corrió fué de 30µg y después se llevó a cabo una transferencia a papel de nitrocelulosa y se hibridó contra la sonda de *rpoH* (*Hind*III-*Pvu*II).

Como se puede ver en la figura 6, se distinguen 2 bandas a 30°C en presencia y ausencia de Nov a una concentración de 600 µg/ml por 10 minutos. En presencia de Nov el mensajero mas largo (A) aumenta en concentración aproximadamente 2-3 veces y el mensajero más corto (B) disminuye un poco su concentración.

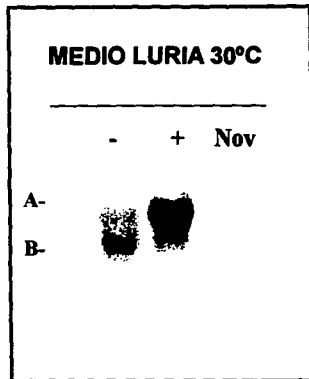


Figura 6. Actividad de los promotores de *rpoH* y su relación con el grado de superenrollamiento del DNA. El RNA total se aisló de células en presencia o ausencia de Nov 600 $\mu\text{g/ml}$ y se separó en geles desnaturalizantes de agarosa, se transfirió a papel de nitrocelulosa y se hibridó con la sonda de *rpoH*.

De acuerdo con las condiciones experimentales; medio Luria o medio mínimo con 0.2% de glucosa y 30°C, se esperan 2 transcritos provenientes de los promotores P1 y P4, ya que el promotor P3 sólo se activa a altas temperaturas y el promotor P5 se activa en presencia de CRP-AMPc. Sin embargo, es importante identificar cada uno de estos mensajeros y los promotores de los cuales provienen.

Estos resultados muestran que cuando el DNA se relaja, la concentración del RNA mensajero que corresponde probablemente al promotor P1 de *rpoH* aumenta su concentración de 2 a 3 veces aproximadamente, mientras el que corresponde posiblemente al promotor P4 disminuye ligeramente. Ya que en las condiciones experimentales utilizadas; se espera que únicamente los promotores P1 y P4 estén activos.

Si efectivamente el RNA mensajero más largo corresponde al promotor P1 y el más corto a P4 se puede concluir que la actividad de estos dos promotores del gene *rpoH* se modifica con el grado de SE del DNA. En otras palabras, el promotor P1 es más activo en DNA relajado y el P4 es más activo en DNA superenrollado.

Estos resultados obtenidos en experimentos *in vivo* confirman lo reportado por el grupo de Ueshima y col. respecto al promotor P4 en experimentos *in vitro*. Sin embargo, mientras este grupo encontró que *in vitro* el promotor P1 no responde al grado de SE del DNA, los resultados que se presentan en esta tesis sugieren fuertemente que este promotor si responde *in vivo* al SE del DNA.

EFFECTO DE LA NOVOBIOCINA EN LA TRANSCRIPCION *in vivo* DE LOS GENES DE ESTRES CALORICO *groEL* Y *groES*.

Cuando las células son expuestas a temperaturas elevadas, estas responden con un incremento de la síntesis de un grupo de proteínas llamadas

proteínas de "heat-shock" (HSP). Entre las proteínas que aumentan su síntesis están GroEL y GroES, las cuales son codificadas por el operón *groES-groEL*. Este operón forma parte del regulón de σ 32.

Travers (1982) publicó que cuando las células de *E. coli* son expuestas a coumermicina (inhibidor de girasa), se incrementa la síntesis de varias proteínas de HS. Travers sugiere que cuando se altera la estructura del cromosoma bacteriano, se induce la expresión de este grupo de proteínas.

Con el fin de tener un control adicional en los experimentos de hibridación RNA-DNA y verificar a nivel de RNA mensajero los datos de Travers, se llevaron a cabo los experimentos de hibridación tipo "slot-blot" con los genes *groES-groEL*. Se aisló el fragmento SacII-SmaI del plásmido pLN44 (Fig. 7), el cual tiene el operón *groES-groEL* completo. Este fragmento se marcó y se hibridó contra el RNA fijado en la misma membrana de nylon que se utilizó para el experimento con la sonda *rpoH* (Fig 5).

Los experimentos de "slot-blot" que se realizaron para ver el efecto *in vivo* de la modificación de la estructura de DNA sobre la transcripción de *groES-groEL* fueron los mismos descritos para estudiar la transcripción de *rpoH* :

a.-) Estrés por calor a 43°C y 50°C. Los experimentos de hibridación que se describieron con temperatura para el gene *rpoH* se llevaron a cabo para el operón *groES-groEL*. En la figura 8A carriles 6 y 7 se puede ver el efecto de la temperatura en la transcripción del operón *groES-groEL*. Cuando las células se exponen a 43°C por 10 minutos se ve un aumento en la concentración del mensajero de *groES-groEL*, que es aún mayor cuando el estrés es de 50°C por 10 minutos.

b.-) Novobiocina. Las células se crecieron en presencia de Nov por 10 minutos en medio Luria (60µg/ml y 600µg/ml) y en medio mínimo (60µg/ml). Como se

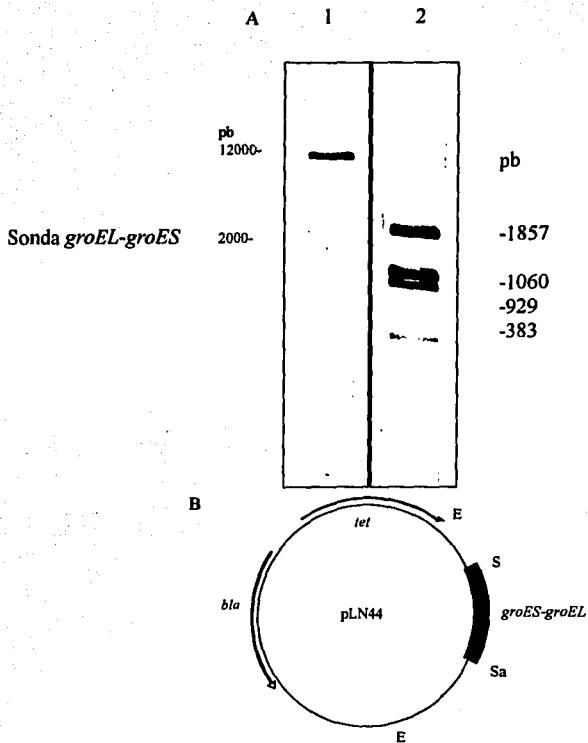



FIGURA 7. Patrón y mapa de restricción del plásmido pLN44. A) Patrón de restricción del plásmido pLN44. Carril, 1 pLN44 digerido con *SmaI* y *SacII*. Carril, 2 control de peso molecular: pBR322 digerido con *BstNI*. B) Mapa de restricción del plásmido pLN44. E, *EcoRI*; S, *SmaI*; Sa, *SacII*.  Sonda *groEL-groES*.

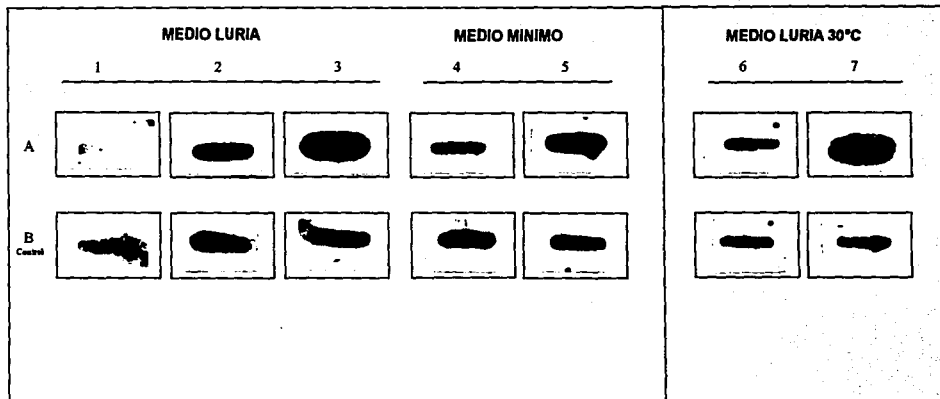


Figura 8. Expresión del operón *groES-groEL* y su relación con el superentollamiento del DNA.

El RNA total se fijó a membranas de nylon y se hibridó con la sonda *groESL* (A). Este filtro se lavó y se rehidró con DNA total (B). 1.) Células a 30 °C, 2.-) Células a 30°C, Nov 60 µg/ml, 10 minutos, 3.-) Células a 30°C, Nov 600µg/ml, 10 minutos, 4.-) Células a 30 °C, 5.-) Células a 30°C, Nov 60µg/ml, 10 minutos, 6.-) Células a 30°C y cambiadas a 43°C 10 minutos, 7.-) Células a 30°C y cambiadas a 50°C 10 minutos.

puede ver en la figura 8A carriles 2 y 3, en medio Luria con ambas concentraciones de Nov el mensajero de *groES-groEL* se incrementa. Estos cambios que se obtienen en presencia de Nov, pueden ser comparados entre si y con los cambios obtenidos en presencia de calor. La cantidad del mensajero que se produce con 60µg/ml de Nov es menor que la cantidad que se obtiene con 600µg/ml de Nov (Fig 8A carriles 2 y 3). También se puede ver que la concentración del mensajero en presencia de 60µg/ml de novobiocina es un poco mayor al que se obtiene a 43°C (Fig 8A carriles 2 y 6) y que la concentración a 50°C es similar a la cantidad del mensajero con 600µg/ml de Nov (Fig 8A carriles 3 y 7). El mismo efecto de la Nov se observa en medio mínimo, cuando el grado de SE del DNA se modifica, la expresión del mensajero de *groES-groEL* aumenta (Fig. 8A, carriles 4 y 5).

En base a estos resultados se ve que sin incrementar la temperatura y sólo con modificar la estructura del DNA por medio de inhibidores de girasa, es posible incrementar la cantidad del mensajero del operon de "heat-shock" *groESL*. Esto sugiere que los genes *groESL* se expresan mejor en DNA con bajo grado de SE. La inducción en la expresión de estos genes al disminuir el grado de SE del DNA es de una magnitud similar a la que se detecta durante la respuesta a estrés por calor.

EFFECTO DE LOS INHIBIDORES DE GIRASA EN LA TRADUCCION *in vivo* DE LAS "HSP" Y EN LA RESPUESTA A ESTRES POR CALOR.

Para ver el efecto de los cambios en la expresión de *rpoH* y de *groES-groEL* en células donde el grado de SE del DNA ha sido modificado por medio del uso de un inhibidor de girasa, en cuanto a la respuesta al estrés por calor a

nivel de la síntesis de proteínas, se realizaron experimentos de marcaje de proteínas durante un estrés calórico (Material y métodos).

Como criterio para evaluar la respuesta al estrés por calor se tomó en cuenta la presencia e intensidad de tres proteínas: GroEL, DnaK y Hps90. Estas tres proteínas son características de la respuesta por estrés a calor.

Travers reportó que cuando se modifica el grado de SE del DNA se induce la síntesis de proteínas de estrés calórico. Para verificar la síntesis de proteínas en presencia de coumermicina (Cou), se realizó un experimento en el cual las células se crecieron hasta la fase media exponencial y se les añadió Cou (60µg/ml) por 10 minutos. Como se puede observar en la figura 9, después de 10 minutos de añadir el antibiótico se ve un cambio significativo en el patrón de proteínas respecto al control sin Cou.

Para ver el efecto de otro inhibidor de girasa, como la Nov, en la respuesta a estrés por calor se llevaron experimentos de marcaje de proteínas de células a diferentes tiempos. Se creció a 30°C (Fig. 10a) y a 30°C en presencia de Nov a 600µg/ml por 10 minutos en la fase media exponencial (Fig. 10b). También se marcaron proteínas de células expuestas a 47°C por 10 minutos (Fig. 10c), en presencia de Nov a 600µg/ml por 10 minutos (Fig. 10d) y de células a 30°C pretratadas con Nov (600µg/ml) por 10 minutos en la fase media exponencial. Esto con el objeto de modificar la expresión del gene *rpoH* y del operón *groES-groEL*, antes del estrés por calor. Estas células se lavaron a 30°C para retirar a la Nov para que el estrés por calor (47°C) se llevara a cabo sin el inhibidor (Fig. 10e). El tiempo de marcaje de las proteínas fue de 5 minutos en todos los casos.

En la figura 10b se puede observar que Nov (600µl/ml) a 30°C por 10 minutos, no induce un incremento importante en las proteínas de estrés calórico: 90 kDa, DnaK, GroEL y GroES. Se puede observar nuevamente que

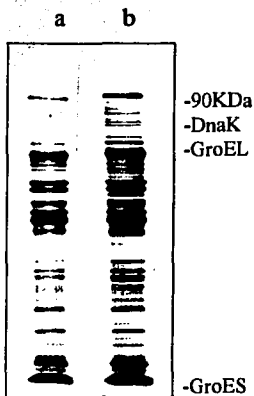


Figura 9. Expresión de proteínas en presencia de Coumestrol.

Las proteínas se marcaron con [³⁵S] metionina durante 5 minutos de un total de 10 minutos y se corrieron en geles de acrilamida

a) 30°C

b) 30°C, mas Cou (60 µg/ml) por 10 minutos.

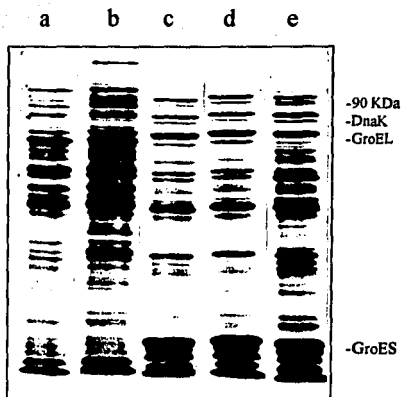


Figura 10. Efecto de la Novobiocina en la respuesta a estrés por calor. Las proteínas se marcaron con [35 S] metionina (Material y métodos) durante un periodo de 5 minutos (de un total de 10 minutos) en presencia de Nov y de un estrés de temperatura. Las proteínas se separaron en gels de acrilamida y se visualizaron por autorradiografía. a) 30°C, b) 30°C, Nov (600 μ g/ml), c) 47°C, d) 47°C, Nov (600 μ g/ml), e) Células a 30°C, Nov (600 μ g/ml), 10 minutos, lavadas y cambiadas a 47°C, 10 minutos.

no se obtiene el resultado reportado por Travers con Cou (Fig. 9) en el cual se describe un incremento en las proteínas de estrés calórico.

En la figura 10d y 10e se puede observar que la expresión de las proteínas de estrés calórico: 90kDa, DnaK, GroEL y GroES a 47°C en presencia de Nov es muy similar al patrón de proteínas que se obtiene a 47°C (Fig 10c).

Para verificar si realmente los inhibidores de girasa inducen un incremento en la síntesis de las proteínas de estrés calórico a 30°C, se aumentó el tiempo de exposición a Nov hasta 25 minutos y el tiempo de marcaje hasta 15 minutos, en una serie de experimentos similares a los que se realizaron a tiempos cortos de marcaje de proteínas.

En la figura 11b se puede observar que la Nov a tiempos largos (25 minutos), induce un incremento en la síntesis de las proteínas de 90kDa, DnaK y GroEL. Sin embargo, el patrón de proteínas de células que fueron tratadas con Nov y sometidas a estrés por calor, no se modificó. Este patrón de proteínas es similar en comparación al patrón que se obtiene a 47°C y 47°C más Nov (Fig. 11e, c y d).

De estos resultados se puede concluir que a 30°C, Cou y Nov a tiempos cortos (10 minutos) no inducen un incremento claro en la síntesis de las proteínas de estrés calórico. Sin embargo, Nov a tiempos largos (25 minutos) si induce un incremento importante en la síntesis de estas proteínas. El efecto que tiene la Nov cuando las células son expuestas a este antibiótico antes y durante el estrés por calor, no efectos significativos en el patrón de proteínas.

En otra serie de experimentos similares a los realizados con Nov, se usó un inhibidor diferente de girasa, el ácido nalidixico (Nal). Las células se marcaron durante 5 minutos con un tiempo de exposición al antibiótico de 10 minutos. En la figura 12b se observa que el patrón de proteínas que se obtiene a

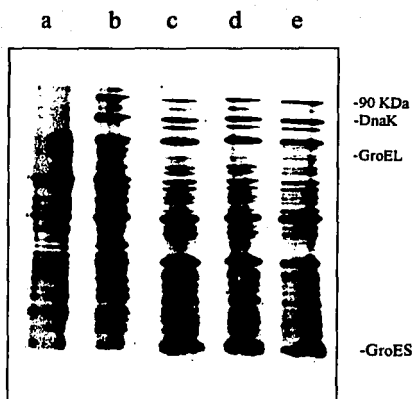


Figura 11. Efecto de la Novobiocina en la respuesta a estrés por calor. Las proteínas se marcaron con [35 S] metionina (Material y métodos), durante un período de 15 minutos de un total de 25 minutos en presencia de Nov y de un estrés de temperatura. Las proteínas se separaron en geles de acrilamida y se visualizaron por autorradiografía. a) 30°C, b) 30°C, Nov (600 µg/ml), c) 47°C, d) 47°C, Nov (600 µg/ml), e) Células a 30°C, Nov (600 µg/ml), 10 minutos, lavadas y cambiadas a 47°C, 25 minutos.

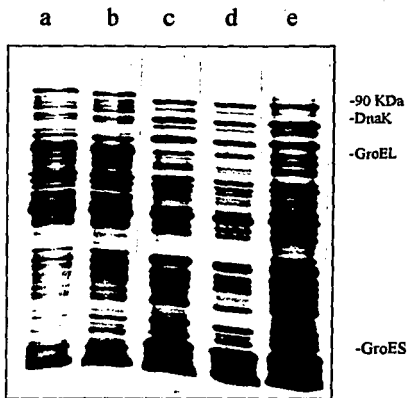


Figura 12. Efecto del ácido nalidíxico en la respuesta a estrés por calor. Las proteínas se marcaron con [35 S] metionina (Material y métodos), durante un periodo de 5 minutos de un total de 10 minutos en presencia de Nal y de un estrés de temperatura. Las proteínas se separaron en gels de acrilamida y se visualizaron por autorradiografía. a) 30°C, b) 30°C, Nal (40 μ g/ml), 10 minutos, c) 47°C, d) 47°C, Nal (40 μ g/ml), 10 minutos, e) Células a 30°C, Nal (40 μ g/ml), 10 minutos, lavadas y cambiadas a 47°C, 10 minutos.

30°C con Nal es similar al patrón a 30°C. En la figura 12d se puede observar que las células que son tratadas previamente con Nal (40µg/ml) por 10 minutos y expuestas a un estrés por calor de 47°C por 10 minutos, presentan también un patrón similar de proteínas al que se obtiene solamente con el tratamiento de 47°C (Fig 12c).

De acuerdo con estos resultados, se sugiere que el cambio en el SE del DNA altera la expresión a nivel de RNAm de los genes *rpoH* y *groEL-groES* y en consecuencia la respuesta celular a nivel de síntesis de proteínas también se altera. Sin embargo esta respuesta no se potencia cuando se modifica previamente el grado de SE del DNA.

DISCUSION

Existe una relación entre el grado de SE y los procesos biológicos como la replicación y transcripción. En los estudios realizados por Hayashi et al, describió que la síntesis de RNA a partir de un templado SE de DNA, se llevaba a cabo con mas eficiencia que en DNA relajado.

La topología del DNA es importante en la replicación del DNA. Por ejemplo, para que se lleve a cabo este proceso, se requieren de proteínas accesorias las cuales preferencialmente se unen a un DNA SE.

En estudios *in vitro* se ha demostrado que el grado de SE no afecta de igual manera a todos los genes. Las mutaciones termosensibles y los antibióticos que inhiben a la girasa reducen la expresión de algunos genes, incrementa la expresión de otros y mantiene sin cambios la expresión de otros genes (Drlica 1984).

En este trabajo se estudió la expresión *in vivo* del gene *rpoH*, el principal gene regulador de la respuesta celular por estrés a calor y del operón *groES-groEL*, un operón regulado por el producto del gene *rpoH*. Las células se crecieron a 30°C, en medio LB (0.2% glucosa) y agitación. En experimentos tipo "Northern" se detectaron dos transcritos que provienen del gene *rpoH*. Los dos transcritos detectados tienen diferente tamaño. En los reportes de Tilly et al (1986), se aislaron dos mRNA del gene *rpoH*, uno de 1400 y otro de 1200 bases. Los mRNA se aislaron de cepas de *Escherichia coli* que crecieron a 30°C. Los resultados que se presentan en esta tesis muestran dos transcritos de *rpoH* de manera similar a lo reportado por el grupo de Tilly.

El grupo de Erickson et al (1987) estudiando la región promotora de *rpoH*, describió cuatro promotores, uno de los cuales (P2) es cepa específico. De los

otros tres promotores, el promotor P3 se reportó como activo en condiciones de estrés calórico y los promotores P1 y P4 como activos principalmente a 30°C. El grupo de Nagai describe un quinto promotor, el cual es sensible a la represión catabólica, o sea, que este promotor es activo en presencia de CRP-AMPC cuando no hay glucosa en el medio de cultivo.

La transcripción a partir de los promotores P1, P4 y P5 se lleva a cabo por la RNA polimerasa acoplada al factor σ^{70} . Como ya se mencionó, el promotor P3 responde a alta temperatura (50°C) y su secuencia consenso no se parece a la secuencia consenso para el factor σ^{70} . Se ha propuesto que el promotor P3 tiene afinidad por un factor sigma diferente, el sigma 24 (σ^{24}) (Erickson 1989).

En los estudios de Ueshima et al (1989), se utilizaron plásmidos superenrollados y relajados (lineal), en un sistema *in vitro* para ver la influencia del SE del DNA sobre la actividad de los promotores de *rpoH*. Se reportó que el promotor P1 (P1) no modifica su actividad en DNA relajado y superenrollado y que el promotor P2 (P4) tiene mayor actividad en DNA superenrollado. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos *in vivo* muestran que el mensajero más grande, que posiblemente corresponde al promotor P1, aumenta hasta 2 veces su concentración. Esto sugiere que dicho promotor es más activo en DNA relajado. La actividad del promotor que corresponde posiblemente a P4 disminuyó un poco cuando el DNA se encuentra relajado, sugiriendo que la activación de este promotor se ve favorecida en DNA superenrollado.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos *in vivo* en este trabajo, la actividad del promotor P1 (P1) se favorece en DNA relajado mientras que en los estudios realizados *in vitro* se reportó que la actividad de este mismo promotor no se modifica en DNA lineal y DNA superenrollado.

Los datos obtenidos en este mismo trabajo *in vivo* sugieren que la transcripción a partir del promotor P4 es más activa en DNA SE que en DNA relajado ya que se puede observar una pequeña disminución en la concentración de este mRNA. Aunque no se ha comprobado que estos dos mRNA provengan de los promotores P1 y P4, se sugiere que esto sea así, debido a que en las condiciones experimentales usadas otros grupos han reportado que sólo es posible detectar los mRNA de los promotores P1 y P4 y no el de los promotores P3 (que es activo a altas temperaturas, 50°C), ni del promotor P5 (activo únicamente en presencia de CRP-AMPC). Sin embargo, no se puede asegurar que los transcritos detectados en este trabajo correspondan únicamente a los promotores P1 y P4 del gene *rpoH*.

Los estudios de Ueshima et al, se realizaron con el gene *rpoH* clonado en plásmidos y fuera de contexto natural del cromosoma. El gene *rpoH* está entre el operón *ftsYEX* y el gene *livJ*. El último de los genes de este operón, el gene *ftsX*, se traslapa con *rpoH* en su región promotora. En esta zona se encuentra el terminador del gene *ftsX*, que forma una estructura en forma de tallo-asa. Esta estructura comprende 2 bases de la región -10 del promotor P1 y el +1 del inicio de la transcripción. Además, la región -35 forma parte del antepenúltimo y penúltimo codón del gene *ftsX* (Erickson et al 1989). Es posible que tanto las conclusiones de Ueshima como las que se presentan en este trabajo sean correctas y que las diferencias se deban a las diferentes metodologías empleadas *in vivo*. Es posible que la transcripción del gene *rpoH in vivo* dependa del nivel de transcripción del operón *ftsYEX*. Si el operón *ftsYEX* se transcribiera activamente cuando el DNA está superenrollado, la actividad del promotor P1 de *rpoH* disminuiría mientras que en DNA relajado la transcripción de este operón sería menor, permitiendo que el promotor P1 de *rpoH* quedara libre y fuese

activo. De acuerdo a esta explicación el operón *ftsYEX* tendría un promotor mas activo en DNA SE y la transcripción activa de este operón interferirá con la actividad del promotor P1 de *rpoH*.

Travers (1982) propuso que cuando se altera la estructura del DNA por el uso de antibióticos que inhiben a la girasa como coumermicina (Cou), existe un aumento en la síntesis de las principales proteínas de estrés calórico como DnaK y GroEL. Estos datos sugieren que los genes regulados por σ^{32} tienen promotores sensibles al grado de SE del DNA.

Se ha descrito que algunos genes de estrés calórico como *groEL*, *groES* y *grpE* tienen un promotor adicional dependiente de σ^{70} , que asegura su transcripción, independiente de factor σ^{32} (Bukau 1993, Zhuo 1988).

En este trabajo se analizó la expresión del operón *groES-groEL* a nivel de mRNA en DNA con diferente grado de SE por el uso de un inhibidor de girasa como la Nov a diferentes concentraciones. La transcripción se comparó con la transcripción que presenta este operón durante un estrés por calor.

En un experimento tipo "slot-blot" se vió que la expresión del operón *groES-groEL* se incrementa de manera similar a la expresión en presencia de calor a 50°C, lo cual indica que este operón tiene promotores sensibles al grado de SE del DNA. Sería importante determinar cual de los promotores es sensible al grado de SE del DNA.

La expresión de uno de los principales genes de estrés calórico *groES* y *groEL* se ve aumentada cuando existen cambios en el grado de SE del DNA. La síntesis del mRNA aumenta de manera similar como cuando las células son expuestas a estrés por calor, durante el cual se sugiere que ocurren cambios en la estructura del nucleóide bacteriano (Pellon 1982). Cuando las células son

expuestas a 42°C, la velocidad de la síntesis de las proteínas de estrés calórico aumenta aproximadamente de 10 a 20 veces y durante los primeros 4-5 minutos después del cambio de temperatura la proteína sigma 32 se estabiliza (Gross et al 1991). Es posible que el promotor para σ^{32} del operón *groES-groEL* sea sensible al grado de SE del DNA y que la transcripción se favorezca a partir de este promotor, porque la RNA polimerasa sea más afin a estos promotores en un DNA relajado y en consecuencia la síntesis de las proteínas *groES* y *groEL* aumente. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la transcripción se lleve a cabo, pero en menor porcentaje, a partir de un promotor para σ^{70} .

En experimentos parecidos a los de Travers, en este trabajo se usó Nov y Nal en lugar de Cou para modificar el grado de SE del DNA. Se usaron tiempos cortos (10 minutos) y tiempos largos (25 minutos). Cuando se usó Nov o Nal como inductores de las proteínas de estrés calórico por 10 minutos no se vió una diferencia significativa en la síntesis de estas proteínas en comparación al patrón de 30°C en ausencia de estos antibióticos. Sin embargo, con Nov a tiempos largos de exposición (25 min) si se observó una clara inducción de las proteínas de estrés calórico en ausencia de calor. Esta diferencia en la inducción de las proteínas de choque térmico a tiempos largos se puede deber a que la célula es poco permeable a este antibiótico.

La Nov y la Cou son antibióticos de la misma familia de las coumarinas, ambos antibióticos inhiben la subunidad B de la girasa por medio de la inhibición de su actividad de ATPasa. Por el contrario Nal es un antibiótico que pertenece a la familia de las quinolonas e inhiben a la subunidad A de la girasa y evita la unión de las dobles hebras del DNA. Esto causa daño al DNA e induce otro sistema de estrés, el sistema SOS. El uso de estos diferentes antibióticos en la

respuesta a estrés por calor resultó semejante a tiempos cortos. A tiempos largos no se realizaron experimentos con Nal y sería interesante observar esta respuesta a diferentes concentraciones de Nal sobre la expresión del operón *groES-groEL*.

En otro grupo de experimentos, las células se expusieron previamente en presencia del antibiótico (Nov, Nal) para cambiar el grado de SE del DNA y modificar la concentración de los mRNA de *rpoH* y de las principales proteínas de estrés calórico y después se sometieron a estrés por calor y se marcaron las proteínas recién sintetizadas

Se ha sugerido que la respuesta a estrés por calor es modificada cuando las células son expuestas a calor o por las pozas altas de proteínas de choque térmico. El efecto del calor y la presencia previa del antibiótico potenciarían esta respuesta a nivel de síntesis de proteínas, sin embargo, esto no se observó.

Bukau (1993) sugiere que las proteínas de estrés calórico juegan un papel importante en la respuesta a estrés por calor. Como se ha visto cuando el DNA se relaja hay síntesis de las principales proteínas de estrés calórico. Se ha demostrado que las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE juegan un papel importante como moduladores de la síntesis de las proteínas de estrés calórico. Mutaciones en que alteran la función de estas proteínas incrementa de dos a cinco veces la expresión de los genes a 30°C y como resultado esta respuesta incrementa su tiempo para llegar a su estado basal (Bukau 1993).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas DnaK, DnaJ y GrpE son moduladores de la síntesis de proteínas de estrés calórico. Se ha demostrado la interacción específica de estas proteínas con el factor σ^{32} . Cuando a la célula se les somete a un estrés por calor ésta experimenta cambios en la membrana, en el DNA y cambios conformacionales en la estructura de las proteínas, esto podría ser una señal para que la respuesta a estrés por calor se active. La proteína DnaK

asiste e interacciona con otras proteínas y evita su inactivación por el calor y agregación entre otras cosas. La proteína DnaK se une a las proteínas desnaturalizadas permitiendo que el factor σ^{32} este libre y pueda unirse a la RNA polimerasa para transcribir los genes de estrés calórico. Sin embargo, la sobreproducción de la proteína de estrés calórico DnaK interactúa con σ^{32} y no le permite que se acople con la RNA polimerasa para seguir transcribiendo los genes de estrés calórico.

Como se puede observar la síntesis de las proteínas de estrés calórico juegan un papel importante en la regulación de respuesta a estrés por calor y la sobreproducción de esta proteínas mantiene en equilibrio esta respuesta.

Cuando las células son expuestas al calor en presencia de Nov y Nal, el patrón de proteínas es similar al que se obtiene en presencia de calor. Las células presentan una respuesta normal, sin que esta sufra cambios significativos y que existe, como ya se mencionó, una regulación en la respuesta a estrés por calor y que la célula puede contender ente el estrés de manera normal.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- 1.-) En experimentos tipo "slot-blot" se observó que la concentración del mRNA del operón *groES-groEL* incrementa *in vivo* cuando las células están en presencia de Nov (inhibidor de girasa) en ausencia de alta temperatura.
- 2.-) El aumento que se observa en la transcripción del operón *groES-groEL* en presencia de Nov a 600µg/ml es similar al que se produce durante un estrés de temperatura.
- 3.-) El operón *groES-groEL* tiene cuando menos un promotor que es más activo en DNA relajado. Esto sugiere que cuando menos uno de los promotores es sensible al SE de DNA.
- 4.-) No se observaron diferencias en la transcripción *in vivo* del gene *rpoH* por el método de "slot-blot". Este método es poco sensible para detectar los cambios pequeños en la transcripción del gene *rpoH*.
- 5.-) En experimentos tipo "Northern" se observaron dos transcritos de diferente tamaño del gene *rpoH*. De acuerdo a las condiciones experimentales que se usaron en este trabajo, se sugiere que los dos mRNA que se observan, sean transcritos a partir de los promotores P1 y P4.
- 6.-) El gene *rpoH* tiene un promotor que es más activo en DNA relajado y otro que es más activo en DNA superenrollado. Posiblemente el mensajero más grande corresponde al promotor P1 y el mensajero más corto al promotor P4.
- 7.-) El transcrito más largo aumenta su expresión *in vivo* en DNA relajado. El transcrito más corto disminuye su expresión *in vivo* en DNA relajado.

8.-) Las proteínas de estrés calórico 90kDa, DnaK y GroEL incrementan su síntesis al relajarse el DNA.

9.-) El patrón de síntesis de proteínas de células en presencia de inhibidores de girasa durante tiempos cortos no se modifica en comparación al patrón de células expuestas a calor. La Nov a tiempos largos produce un aumento en la síntesis de proteínas de estrés calórico. Sin embargo, este patrón de proteínas no se potencia en comparación al patrón de proteínas de células expuestas a estrés calórico y de células expuestas a calor con pozas altas de proteínas de choque térmico.

BIBLIOGRAFIA

- Balbas, B., J., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, and F. Bolivar. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives- A review. *Gene* 50:3-40
- Bauner, W., R., F. H. C. Crick and J. H. White. 1980. Supercoiled DNA. *Sci Ameri* 243:118-133.
- Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 9:671-680.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium. *Mol Gen Genet* 202: 435-445.
- Chuang, S. and F. R. Blattner. 1993. Characterization of twenty-six new genes heat shock of *Escherichia coli*. *J Bac* 175:5242-5252.
- Chung,C., T., S. L. Niemela, R. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl.* 215:185-189.
- Delaney, J., M. 1990. A *cya* deletion mutant of *Escherichia coli* develops thermotolerance but does not exhibit a heat-shock response. *Genetic Res* 55:1-6.

-Drlica, K. 1984. Biology of deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol Rev* 48:273-289.

-Drlica, K. 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Micro* 6:425-433.

-Erickson, J., V., W. A. Walter, F. C. Neidhard, C. A. Gross. 1987 Regulation of the promoters and transcripts of *Escherichia coli*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* 1:419-432.

-Erickson, J., W., and C. A. Gross. 1989. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev* 3:1462-1471.

-Fayet, O., J.M. Louarn and C. Georgopoulos. 1986. Suppression of the *Escherichia coli* dnaA 46 mutation by amplification of the *GroES* and *GroEL* on of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 9:671-680.

-Fujita, N. and A. Ishihama. 1987. Heat-shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in *Escherichia coli*: transcriptional control and a multiple promoter system. *Mol Gen Genet* 210:10-15.

-Gross, A. C., Straus, D. B. and Erickson, J. W. (1991) In: Stress proteins in biology and medicine (Marimoto R., Tissieres A., Georgopoulos C. Eds.), pp 167-189. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

-Hendrick, J., P., and F. Hartl. 1993. Molecular Chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* **63**:349-384.

-Higgins, C. F., Dorman, C. J. and Bhriain, N. N. (1990) In: The bacterial chromosome (Drlica K. and Riley M. Eds.) pp 421-432. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Kato, J., H. Suzuki and H. Ikeda. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**:25676-25684.

-Krawiec, S. and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbial Rev* **54**:502-539.

-Leamli, U.,K. 1970. Cleave of estructural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

-Lee-Rivera, I. and M. C. Gómez-Eichelmann. 1994. *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Micro Let* **121**:35-38.

-Marimoto, R. Y., A. Tissieres, A., Georgopoulos, C. (1991) In Stress proteins in biology and medicine (Marimoto R., Tissieres A., Georgopoulos C. Eds.), pp 1-36. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

-Miller, J., H. (1972) In experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York , pp 352-359

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-Nagai, H., R. Yano, J. W. Erickson, and T. Yura. 1990. Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J Bac.* **172**:2710-2715.

-Neidhardt F., C. (1987). Multigene systems and regulons. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. (Ingraham J. L., Low K. B., Magasanik B. Eds.), pp 1313-1317. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Neidhardt, F. C. and VanBogelen, R. A. 1987. Heat shock response. In *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology.(Ingraham J. L., Low K. B., Magasanik B. Eds), pp 1334-1345. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

-Pellon, J. R., Gomez, R. F. Sinskey, A. J.. (1982) In Heat shock from bacteria to man (Schlessinger, M., Ashburner, M. and Tssieres A. Eds) pp 121-125. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, N. Y.

-Pettijohn, D., E..1988. Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. *J Biol Chem* **163** : 12793-12796.

-Pruss, G., J., and K. Drlica. 1989. DNA supercoiling and procaryotic transcription. *Cell.* **56**: 521-523.

-Reece, R., J. and A. Maxwell. 1991. DNA Gyrase: structure and function. *Critical Rew Biochem Mol Biol.* **26**:335-375.

-Schmid, M., B. 1988. Structure and function of the bacterial chromosome. TIBS 131-135.

-Schofield, M., A., R. Agbunag, M. L. Michaels and J. H. Miller. 1992. Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. J Bac 174:5168-5170.

-Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) In: molecular cloning. A laboratory manual. (Ford N., Ch. Nolan, M. Ferguson Eds.). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

-Schmid, M., B. 1990. More than just "histone-like" proteins. Cell 63:451-453.

-Travers, A.A. and Mace, H. A. F. (1982) In: Heat shock from bacteria to man (Schlessinger, M., Ashburner, M. and Tissieres, A. Eds.), pp 127-130. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

-Tobe, T., K. Ito and T. Yura. 1984. Isolation and physical mapping of temperature-sensitive mutants defective in heat-shock of proteins in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 195: 10-16.

-Tilly, K., J. Erickson, S. Sharma, and C. Georgopoulos. 1986. Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increases after heat shock in *Escherichia coli*. J. Bac. 168 :1155-1158.

-Ueshima, R., Fujita N., and Ishihama A. 1989. DNA supercoiling and temperature shift affect the promoter activity of the *Escherichia coli rpoH* gene

encoding the heat-shock sigma subunit RNA polymerase. *Mol Gen Genet* **215**:185-190.

-Wang, J., C. 1982. DNA topoisomerases. *Sci Ameri* **247**: 84-95.

-Wang, J., C. 1985. DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* **54**:665-697.

-Wang, Q., Kaguni J. M. 1989. DnaA protein regulates transcription of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**:7338-7344.

-Yura, T., H. Nagai, H. Mori. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Biochem* **47**:321-350.

-Zhuo, Y., N., K. Noriko, J. W. Erickson, C. A. Gross and T. Yura. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma σ^{32} . *J Bac* **170**:3640-3649.