

161
rej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Termosensibilidad y Duración de la Respuesta Celular
al Estrés por Calor en *Escherichia coli* K12**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G A

p r e s e n t a

LOURDES GABRIELA SOID RAGGI



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

México, D. F.

Septiembre de 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron 1ª pasante(s) LOURDES GABRIELA SOTO RAGGI

con número de cuenta 8852675-9 con el Título: Termostabilidad y Duración de la Respuesta Celular al Estrés por Calor en Escherichia coli K12

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de bióloga

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
	Dra. Ma. del Carmen	Gómez Eichelmann	
Director de Tesis	Dr. René de Jesús	Cárdenas Vázquez	
	Dr. Mario	Altamirano Lozano	
	Dr. Jesús Manuel	León Cázares	
Suplente	M. en C. Jesús	Ramírez Santos	
Suplente			

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la
Dra. Carmen Gómez Eichelmann**

**Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

UNAM

**bajo la dirección de la Dra. Carmen Gómez Eichelmann y
del M. en C. Jesús Ramírez Santos.**

A Norma Raggi, mi madre y amiga

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Carmén Gómez Eichelmann por su asesoría y dirección en esta etapa de mi formación académica, así como a cada uno de mis compañeros de laboratorio.

Expreso mi gratitud a los integrantes del jurado de este trabajo: Dr. Mario Altamirano, Dr. René Cárdenas, Dr. León Cázares, M. en C. Jesús Ramírez.

Agradezco al QFB Raúl Argüello García por sus comentarios y sugerencias.

Agradezco también a mi madre por siempre confiar en mí.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
1. ESTRES CELULAR: SISTEMAS GLOBALES DE REGULACION	3
2. LA RESPUESTA AL ESTRES POR CALOR EN PROCARIONTES Y EUCARIONTES	5
3. EL SISTEMA GLOBAL DE REGULACION DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO EN <i>Escherichia coli</i> K12	8
3.1 El regulón de σ^{32}	9
3.2 Mutaciones en el gen regulador <i>rpoH</i>	9
3.3 Mutaciones en los genes de las proteínas de estrés calórico (HSPs)	10
3.4 Inductores de los genes de las HSPs	11
3.5 Organización de los genes de estrés calórico en el cromosoma bacteriano	14
3.6 Promotores del gen regulador <i>rpoH</i>	16
3.7 Proteínas de estrés calórico (HSPs)	18
3.8 Modelos de la inducción del regulón σ^{32}	22

4. DETECCION EXPERIMENTAL DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO	27
5. CARACTERISTICAS DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO EN <i>E. coli</i>	27
5.1 Diferentes temperaturas del estrés calórico	27
5.2 Duración de la respuesta del estrés calórico	29
5.3 Efecto del estrés calórico en la división celular	31
5.4 Efecto del estrés calórico en la metilación del DNA	32
6. TERMOSENSIBILIDAD DE <i>E. coli</i>	33
OBJETIVOS E HIPOTESIS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
MATERIAL Y METODOS	38
1. CEPAS BACTERIANAS	38
2. CULTIVO Y CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS	39
3. VERIFICACION DEL FENOTIPO	39
4. CURVAS DE CRECIMIENTO	39
5. FOTOMICROGRAFIAS DE CELULAS DE <i>E. coli</i> K12 EXPUESTAS A TEMPERATURA ALTA Y A ESTRES CALORICO	40
6. MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEINAS	40
7. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	42
8. TINCION DE PROTEINAS CON AZUL DE COOMASIE Y NITRATO DE	

PLATA	42
9. DETECCION DE PROTEINAS RADIOMARCADAS POR FLUOROGRAFIA Y AUTORRADIOGRAFIA	43
10. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE UN GEL A UN FILTRO E IDENTIFICACION DE PROTEINAS ESPECIFICAS CON ANTICUERPOS (WESTERN BLOTTING)	43
RESULTADOS	45
1. TERMOSENSIBILIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE <i>E. coli</i> K12	45
2. RESPUESTA AL ESTRES CALORICO DE DIFERENTES CEPAS DE <i>E. coli</i> K12	52
3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DIVISION CELULAR EN <i>E. coli</i> K 12	56
4. INTENSIDAD Y DURACION DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO EN CEPAS CON DIFERENTE TERMOSENSIBILIDAD	59
4.1 Estrés calórico a 42°C	60
4.2 Estrés calórico a 45°C	66
4.3 Estrés calórico a 47°C	71
5. ACUMULACION DE HSP₂ DURANTE EL ESTRES CALORICO DE 30 A 47°C	79
DISCUSION	83
CONCLUSIONES	88

PERSPECTIVAS	90
APENDICE (MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES)	91
LITERATURA CITADA	102

RESUMEN

La respuesta al estrés calórico se presenta a nivel celular cuando las células u organismos completos se exponen súbitamente a temperaturas altas. Esta respuesta se caracteriza por un incremento en la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de estrés calórico (HSPs). Durante la respuesta ocurre daño en el DNA, así como alteraciones en la membrana y en la división celular que produce filamentación de las células. En el caso de *Escherichia coli*, únicamente en la cepa C600, durante un estrés a 47°C se presenta además inhibición de la metilación de la segunda citosina, en la secuencia 5'CC(A/T)GC 3' (metilación Dcm) del DNA. Sin embargo, después de cuatro horas, el patrón de metilación normal retorna en la cepa mencionada. Así, es probable que durante este tiempo se acumule alguna proteína que ayude a metilar al DNA, como por ejemplo una chaperona molecular. Si a esta cepa se le introduce un plásmido multicopia que tiene clonado a los genes de la chaperonina GroE, no presenta esta inhibición. Este dato sugiere que la metilasa Dcm en la cepa C600 requiere de esta chaperonina para su funcionamiento. En *Escherichia coli* la respuesta se regula positivamente por la subunidad de la RNA polimerasa σ^{32} , que se une a ésta y le da especificidad para que se transcriban los genes de estrés calórico. Como moduladores negativos intervienen algunas de las mismas HSPs como son: DnaK, DnaJ y GrpE.

La respuesta a estrés calórico es probablemente una respuesta para sobrevivir a altas temperaturas. En organismos que crecen en un amplio intervalo de temperatura la máxima respuesta se logra al elevar la temperatura de 10 a 15°C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento. En los organismos que crecen en un intervalo más restringido, la respuesta ocurre al elevar la temperatura alrededor de 5°C. *E. coli* es una bacteria mesófila; sin embargo, el estudio detallado del intervalo de temperatura de crecimiento balanceado para esta bacteria se había realizado únicamente en la cepa B/r derivada de NC3.

El objetivo inicial de este trabajo fue estudiar la termosensibilidad de diferentes cepas de *E. coli* K12, así como la duración e intensidad de la respuesta al estrés calórico en estas cepas. Además, se planteó estudiar el efecto de la temperatura en la división celular (filamentación de las células) e identificar si

hay alguna relación entre la intensidad y duración de la respuesta al estrés calórico, y la inhibición de la metilación Dcm en la cepa C600.

Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que en las seis cepas estudiadas la termosensibilidad a 47°C es diferente. En esta temperatura pueden definirse dos grupos de cepas: un grupo termorresistente (C600, C600 Nal^r y W3110) y otro termosensible (AB1157, GM30 y GM31). Estos resultados no correlacionan con los datos que se obtuvieron en este trabajo al exponer a las cepas a un estrés calórico. Tampoco hay una relación clara entre la termosensibilidad y la formación de filamentos. La respuesta al estrés calórico se puede caracterizar fácilmente por el incremento de tres HSPs: una proteína de 90 kDa., DnaK y GroEL. Estas dos últimas proteínas tienen actividad de chaperonas. En un cambio de 30 a 42°C se incrementa la síntesis de las HSPs y la de las proteínas no propias de estrés; mientras que en un estrés de 30 a 45°C se incrementan las HSPs y las otras proteínas disminuyen y en un cambio de 30 a 50°C sólo se sintetizan las HSPs y la respuesta continúa hasta que la célula muere. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo muestran que la duración de la respuesta de un estrés calórico ligero (30 a 42°C) y de uno medio (30 a 45°C) es de 40 a 60 minutos. No existen diferencias notables en la duración de la respuesta entre una cepa termosensible y una termorresistente. Sin embargo, en un estrés subletal como es el de 47°C sí existen diferencias en la duración de la respuesta. La cepa C600 tiene una respuesta de estrés calórico un poco más corta, y al salir de esta tiene menor cantidad de HSPs en relación a otras cepas. Esto puede ser la causa de que en esta cepa, a diferencia de las otras, no funcione la metilasa Dcm en un estrés calórico de 47°C, por lo que es posible que la proteína GroEL tenga actividad de chaperonina de la metilasa Dcm. Sin embargo, al estudiar la acumulación de GroEL, los datos obtenidos sugieren que esta cepa acumula igual cantidad de GroEL que otras cepas. Una explicación posible es que la proteína DnaK tiene actividad de chaperona para la metilasa Dcm, ya que se sabe que es DnaK y no GroEL la que se encuentra en mayor cantidad a temperaturas arriba de 45°C.

INTRODUCCION

1. ESTRES CELULAR: SISTEMAS GLOBALES DE REGULACION

Los seres vivos poseen una serie de sistemas de regulación genética que les permiten responder a condiciones de estrés como son la limitación de nutrientes, los cambios de temperatura, de concentración de sales y el pH. Las condiciones de estrés se perciben en la célula y se convierten en señales bioquímicas que se interpretan por la maquinaria celular. El sensor de un estímulo o cambio ambiental puede ser una estructura que sufre daño o distorsión por el estímulo, o bien, un proceso celular que se altera. Los sistemas de regulación genética responden a tales cambios al integrar los estímulos ambientales y después activar o reprimir la transcripción de un conjunto de genes de forma que un simple cambio ambiental puede inducir varios genes. También un mismo conjunto de genes puede ser inducido por una o más condiciones ambientales. Algunos estímulos inducen a todo un conjunto de genes, mientras que otros inducen sólo una parte de dicho conjunto (Fig. 1; Neidhardt, 1987).

En las bacterias estos sistemas se componen por un conjunto de regulones, operones y genes que se expresan de manera coordinada y que les permiten crecer en condiciones favorables y desfavorables. Un regulón es un grupo disperso de operones y genes aislados que codifican para moléculas con funciones diferentes y que responden a un regulador común. Un operón es un conjunto de genes que se transcribe en un sólo mRNA (policistónico), pero en el cual cada gen de éste se traduce independientemente y en forma

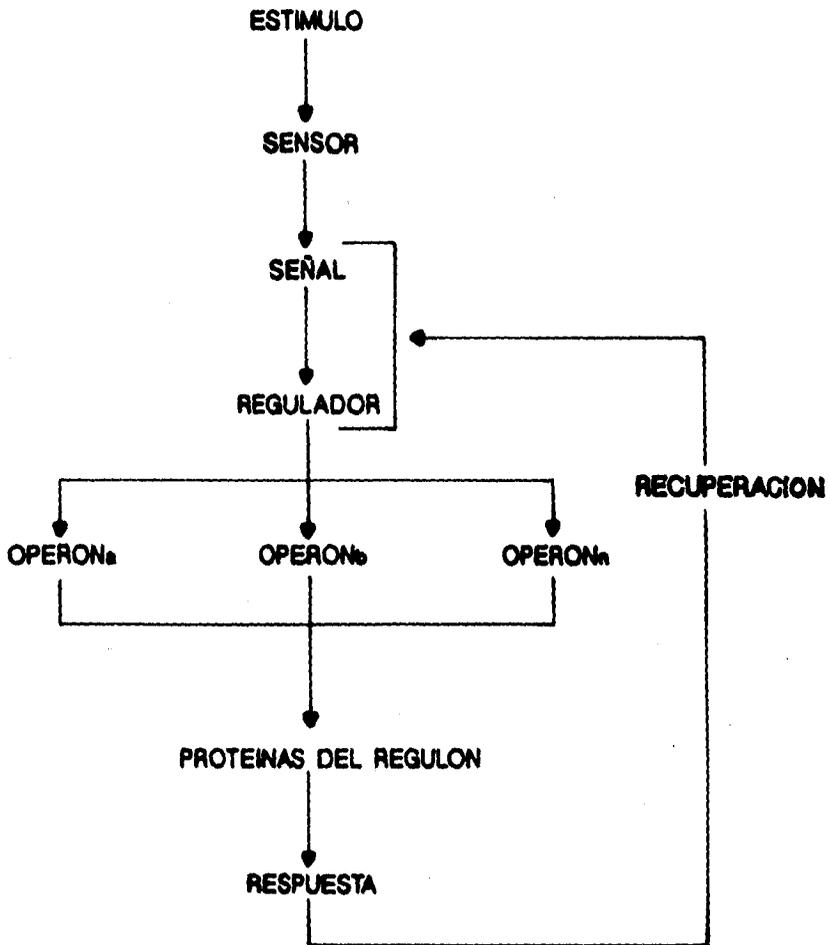


Figura 1. Vía de respuesta de un regulón (Neidhardt, 1987).

coordinada. Muy frecuentemente los operones de un regulón codifican para proteínas que se relacionan funcionalmente en vías o procesos. Estos sistemas se denominan regulones globales, Sistemas Globales de Regulación (SGR) o estimulones y comprenden al total de genes que responden a un cambio ambiental (Neidhardt, 1987).

En el caso de la enterobacteria *Escherichia coli*, los SGR mantienen una coordinación compleja entre la replicación del DNA, el crecimiento y la división celular. Los principales sistemas son:

- 1) El sistema de respuesta al daño en el DNA (sistema SOS).
- 2) El de respuesta al cambio de temperatura (estrés calórico).
- 3) El de represión catabólica.
- 4) El de respuesta a la presencia o ausencia de oxígeno.
- 5) Los de respuesta a la limitación de nitrógeno o fosfatos.

Este trabajo se avoca al estudio de un aspecto del sistema de respuesta al estrés calórico ("Heat Shock").

2. LA RESPUESTA AL ESTRÉS POR CALOR EN PROCARIONTES Y EUKARIONTES.

Los estudios de estrés calórico datan de 1962 cuando se observó que en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de la mosca de la fruta, *Drosophila*, se formaban unos ensanchamientos ("puffs") al exponerla a agentes como el calor, el dinitrofenol o el salicilato de sodio (Ritossa, 1962). Posteriormente se observó que había otros tratamientos que inducían también este fenómeno (Ashburner y Bonner, 1979; Ritossa, 1962). En la siguiente década se estudió el estrés calórico principalmente a nivel citológico y en 1973 se iniciaron los análisis moleculares. También en 1973 se reportó que la inducción de los "puffs" de los cromosomas de *Drosophila* coincidía con el incremento en la síntesis de un pequeño número de proteínas (Lindquist *et al.*, 1975). En 1975 se reportó que la respuesta se presenta también en bacterias. En *E. coli* se descubrió una mutante en el gen *rpoH* en la que no se observó el incremento de dichas proteínas. Esto sugirió que había un regulador de la expresión de estas proteínas (Cooper y Ruettinger, 1975).

La respuesta al estrés por calor es universal y muy conservada. Se presenta en arqueobacterias, eubacterias y eucariontes. En general esta respuesta se estudia a nivel celular, en metazoarios y metafitas dicha respuesta puede observarse en los organismos enteros y también se puede estudiar en cultivos celulares o en tejidos y órganos aislados (Neidhardt *et al.*, 1984). En las células un estrés por calor causa daño en el DNA, alteraciones en la permeabilidad de la membrana y cambios conformacionales en las proteínas (Yura *et al.*, 1993). Asimismo ocurre un aumento rápido y transitorio en la síntesis de un grupo de proteínas llamadas Proteínas de Choque Calórico ("Heat Shock Proteins" o HSPs). Es probable que este aumento represente una protección importante o un mecanismo homeostático, es decir, puede ser una respuesta adaptativa o simplemente un fenómeno de estímulo-respuesta. Las proteínas de estrés calórico posiblemente proporcionan protección contra la temperatura alta, ya que si un organismo se incuba primero a una menor temperatura y después a otra mayor se observa un aumento en la sobrevivencia (Bukau, 1993). A este fenómeno se le da el nombre de termotolerancia y se define como una mayor sobrevivencia de las células a temperaturas letales, si previamente se incuban a una temperatura intermedia (Neidhardt *et al.*, 1984). Por ejemplo, las células de mamífero en cultivo a 30° C al cambiarse a una temperatura de 42° C por 30 minutos y posteriormente a 50° C tienen mayor sobrevivencia que cuando se exponen inmediatamente a 50° C. Esta termotolerancia es de pequeña magnitud y es pasajera, alcanza un máximo a los 30 minutos y desaparece a los 60 minutos. Su decaimiento coincide con la disminución de las HSPs. El etanol, la hipoxia, el arseniato de sodio y el cloruro de cadmio pueden producir también termotolerancia (Velázquez y Lindquist, 1984). Las proteínas de estrés calórico se sintetizan en condiciones de no estrés, aunque a una tasa más reducida y tienen un papel fundamental en la fisiología celular normal (Neidhardt *et al.*, 1982; Yura *et al.*, 1993).

La respuesta celular al estrés calórico probablemente apareció muy temprano en la vida celular del planeta (hace de 3,000 a 3,500 millones de años). Algunos de los genes que intervienen en esta respuesta se han conservado a nivel de secuencia de DNA a lo largo de la evolución. La homología entre estos genes es más notoria si se comparan a nivel de su secuencia de aminoácidos (Hunt y Marimoto, 1985).

El incremento en la síntesis de las HSPs se debe a la inducción de la transcripción de los genes que las codifican. En *E. coli* y posiblemente en algunas de las demás bacterias se incrementa el factor de transcripción sigma 32 (σ^{32}) y en eucariontes el factor del estrés calórico (HSF) (Yura *et al.*, 1993; Zhou *et al.* 1988). El HSF activo es trimérico, su tamaño varía de 300 a 800 aminoácidos aproximadamente. Este factor se autofosforila y el incremento en la fosforilación se correlaciona con la habilidad para promover la transcripción de los genes de estrés calórico en todos los eucariontes. La activación de este factor incluye dos mecanismos: su unión al DNA y su fosforilación (Fig.2). En el DNA se une a las secuencias denominadas Elementos de Choque Térmico ("Heat Shock Elements" o HSE), que son activos a distancias variables del sitio de transcripción. Los HSE están compuestos de un número variable de cajas de cinco pares de bases que se llaman cajas

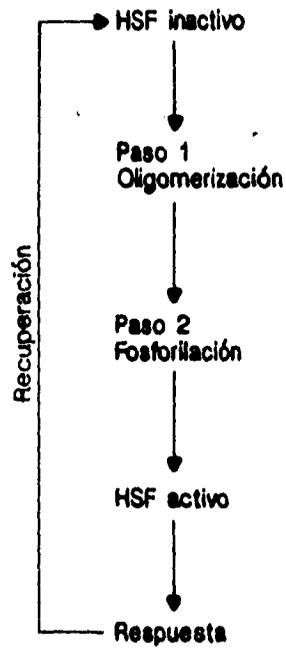


Figura 2. Activación de un HSF (Sorger, 1991)

nGAAn dispuestas en orientación alternada. Por ejemplo, en el gen *hsp70* de *Drosophila* hay cinco repetidos entre la posición -115 y -92 pb. Los repetidos 1, 3 y 5 tienen la misma orientación, diferente a los de los repetidos 2 y 4 que tienen también entre ellos la misma orientación. Estos dos grupos de repetidos están separados por una vuelta-hélice del DNA (Abravaya *et al.*, 1991; Boulikas, 1994). De la misma manera, en el promotor del gen *hsp83* hay 7 repetidos de los cuales el 2, el 4 y el 6 están en la misma orientación y los restantes están en la orientación opuesta, separados también uno de otro por una vuelta-hélice del DNA. En estudios *in vitro* se ha observado que se necesitan al menos dos unidades de nGAAn para la unión del HSF que pueden arreglarse como cabeza-cabeza (nGAAnnTTCn) o como cola-cola (nTTCnnGAAn). Cada monómero del HSF interactúa con una caja nGAAn, su unión es altamente cooperativa y no se unen antes o después de la respuesta al estrés calórico, sino solamente durante su inducción (Morimoto *et al.*, 1992; Sorger, 1991; Xiao *et al.*, 1991). Aparentemente en *Saccharomyces cerevisiae* el HSF puede también unirse al DNA cuando hay un octámero de histonas (Pederson y Fidrych, 1994).

3. EL SISTEMA GLOBAL DE REGULACION DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS CALORICO EN *E. coli*

Como ya se mencionó, un SGR es un conjunto de regulones, operones y genes que se expresan de manera coordinada, generalmente bajo la modulación de un estímulo común. El SGR del estrés calórico comprende a todos los genes que se inducen por un incremento de temperatura. En *E. coli* el SGR de la respuesta a estrés por calor está formado por varios regulones que comprenden más de 40 genes. Un regulón, como ya se explicó anteriormente, consiste de varios genes regulados de forma coordinada por una proteína represora o activadora que reconoce a una secuencia particular común. Uno de estos regulones es el regulón de sigma 24, σ^{24} ó σ^E , que consiste de los genes *rpoH* y *htrA* (*degP*). El gen *htrA* se requiere para la sobrevivencia y el crecimiento a temperaturas mayores de 42°C. Este gen codifica para una endopeptidasa periplásmica (Raina *et al.*, 1991). Otro regulón es el de σ^{32} que es el que más se conoce y que regula la transcripción de más de 26 genes. La proteína reguladora de este regulón es el factor de transcripción σ^{32} que sólo puede reconocer a los genes de estrés calórico. El factor de transcripción para condiciones de no estrés, σ^{70} , puede transcribir genes de estrés calórico y genes de no estrés (Bloom *et al.*, 1986). Además de estos regulones, hay aproximadamente 10 genes para los cuales no se conoce un regulador.

3.1 El Regulón de σ^{32}

En este regulón se habían descrito hasta 1992 aproximadamente 17 genes. Sin embargo, en 1993, después de un análisis de mapeo cromosómico y clonación molecular, se encontró que σ^{32} regula a más de 26 genes. Los genes que más se conocen del regulón de σ^{32} son: *rpoH*, *groEL*, *groES*, *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *lon*, *lysU* y *rpoD* (σ^{70}) (Neidhardt y Van Bogelen, 1981; Neidhardt *et al.*, 1983). La inducción de los genes de estrés calórico de este regulón ocurre por la activación de la transcripción a partir de los promotores que reconoce la RNA polimerasa que contiene a σ^{32} (Cowing, *et al.*, 1985; Grossman *et al.*, 1984; Landick, *et al.*, 1984). Esta proteína reguladora σ^{32} también se requiere para la inducción de la expresión de estos genes en células sin estrés (Zhou *et al.*, 1988). La inducción de los genes de estrés calórico depende de la cantidad de σ^{32} que es el producto del gen *rpoH*, ya que al aumentar σ^{32} , sin elevarse la temperatura, se incrementa la síntesis de dichas proteínas (Yamamori y Yura, 1982; Grossman *et al.*, 1987).

En la inducción de la respuesta hay un incremento rápido en los niveles de σ^{32} , debido a que aumenta la transcripción y la traducción del mRNA de *rpoH*, así como la vida media de esta proteína. Parece ser que a 30°C *rpoH* se transcribe eficientemente, pero se traduce poco (Kamath-Loeb y Gross, 1991). Algunos genes de estrés calórico, incluso *groEL*, *groES*, *grpE* y *dnaK* tienen promotores adicionales de σ^{70} que aseguran que haya niveles basales de las proteínas correspondientes a estos genes en condiciones normales (Georgopoulos *et al.*, 1990).

3.2 Mutaciones en el gen regulador *rpoH*

En *E. coli* existen mutantes de *rpoH* que permiten estudiar y entender la regulación del estrés calórico, ya que como se mencionó, el producto de *rpoH* se requiere para la transcripción de los genes de estrés. Una de dichas mutantes es la Tsn-K165 que tiene una mutación ámbar en *rpoH* y un gen termosensible de tRNA mutado que suprime dicha mutación a 30°C, pero no a 42°C. Estas mutantes tienen pequeñas cantidades funcionales de σ^{32} (Grossman *et al.*, 1987). Existen otras cepas con mutaciones totales que no pueden crecer a temperaturas arriba de 20°C y que muestran defectos en la proteólisis, en la división celular y en la duplicación del DNA de un plásmido (Baker *et al.*, 1984; Tsuchido *et al.*, 1986; Wada *et al.*, 1987). Las mutantes totales tienen un crecimiento lento, presentando filamentación y defectos en la partición del cromosoma. En mutantes con el gen *rpoH* interrumpido, a 16.5°C se expresa sólo el 30% de las HSPs que se expresan en el tipo silvestre y no se detecta DnaK. Después del cambio a 42°C, DnaK se detecta, pero menos del 11% que en el tipo silvestre (Zhou *et al.*, 1988). Estas mutantes, además, son hipersensibles a antibióticos, son incapaces de permitir la duplicación del bacteriófago λ y presentan niveles altos de HSPs a 30°C, pero estas no aumentan a temperaturas altas (Zhou

et al., 1988). Estas mutantes no pueden crecer porque no tienen cantidades suficientes de GroEL y GroES. Las mutantes con un plásmido multicopia que contiene a los genes *groESL* y que sobreproducen a las proteínas GroEL y GroES, pueden crecer a temperaturas aún arriba de 40° C (Kusukawa y Yura, 1988).

Existen también mutaciones ámbar de *rpoD*, el gen que codifica para σ^{70} . Las mutantes *rpoD* ámbar tienen un número bajo de moléculas de σ^{70} y éste es inestable. Estas mutantes sintetizan una cantidad pequeña de HSPs, pero a temperaturas elevadas la respuesta al estrés calórico es de gran intensidad y duración (Osawa y Yura, 1981). Este alelo mutante suprime parcialmente la mutación Tsn-K165, ya que las dobles mutantes tienen una respuesta de estrés calórico normal. Estos datos sugieren que los productos de los genes *rpoH* y *rpoD* (σ^{32} y σ^{70} , respectivamente) compiten por la RNA polimerasa (Yura *et al.*, 1993).

Existe un supresor extragenético de *rpoH*, que se llama *suhB*. Las cepas mutantes *rpoH15 suhB2* son sensibles al frío y presentan una síntesis elevada del σ^{32} mutado. El supresor *suhB2* no promueve la síntesis del σ^{32} normal. Esto sugiere que SuhB reprime la traducción del mRNA de *rpoH* mutado (Yano *et al.*, 1990; Yura *et al.*, 1993).

3.3 Mutaciones en los genes de las proteínas de estrés calórico (HSPs)

Hay mutaciones totales y sin sentido de los genes de estrés calórico *dnaK*, *dnaJ* y *grpE* que provocan un incremento en la vida media de σ^{32} . Un nivel bajo de la proteína GroEL también estabiliza a σ^{32} , aunque de una forma menos notable (Yamamori y Yura, 1980). En cepas mutantes *dnaK*, *dnaJ* y *grpE* se incrementa la síntesis de HSPs y la respuesta tarda en apagarse. Estos efectos se deben a que en estas mutantes hay un aumento en los niveles de σ^{32} . Este aumento obedece a su vez a un incremento en la traducción del mRNA de *rpoH* y en la vida media de σ^{32} (Bukau y Walker, 1990; Paek y Walker, 1987; Straus *et al.*, 1990; Tilly *et al.*, 1983). En estas mutantes σ^{32} se degrada más lento y continúa en niveles altos por 90 minutos (Grossman *et al.*, 1987 y Straus *et al.*, 1990). En mutantes *dnaK756* y *dnaJ259*, a 30° C se incrementa la estabilidad de σ^{32} y aún más en mutantes *grpE280*. Esta última, junto con *grpE17*, son resistentes al crecimiento del fago λ a 30 y a 42° C. Otras mutantes de esta proteína son *grpE25*, *grpE66*, *grp103*, *grp139*, *grp57* y *grp61* las cuales son sensibles al crecimiento de λ a 30° C, pero son resistentes a 42° C. Todas las mutaciones anteriores son recesivas, ocurren en la parte final de la región codificante de *grpE* y afectan a aminoácidos conservados (Wu *et al.*, 1994). A 42° C la estabilidad de σ^{32} se incrementa en mutantes *dnaK* y *grpE*, pero no en mutantes *dnaJ*, lo que indica el papel de DnaK, DnaJ y GrpE en la degradación de σ^{32} a bajas temperaturas y de DnaK y GrpE en la degradación después del estrés calórico. Por otra parte, las cepas mutantes dobles *dnaK* y *rpoH*, sensibles a temperatura, no muestran una respuesta de estrés calórico (Bukau, 1993).

3.4 Inductores de los genes de las HSPs

No solamente el calor provoca el incremento de la síntesis de las proteínas de estrés. Estas pueden incrementarse con otros factores como el etanol, que es el inductor más parecido al calor, que al igual que éste provoca la inducción de todas las HSPs. No obstante, el calor es el inductor más rápido y efectivo y es el único que provoca el incremento de las proteínas de estrés calórico de un cambio de células de condiciones subóptimas a condiciones óptimas de crecimiento, por ejemplo de 28 a 37° C (Neidhardt *et al.*, 1984).

Existen otros agentes que dañan al DNA o inhiben su duplicación y que producen una respuesta similar. Algunos de estos factores son la luz UV, el cadmio, el ácido nalidixico, la coumermicina y la infección viral (Gross *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1991; Parsell y Sauer, 1989). Si se compara con el calor, la respuesta a la luz UV es muy lenta, ya que muestra un máximo de inducción a los 15 o 20 minutos de exposición y requiere 100 J/m². La luz UV a dosis menores induce a otro SGR conocido como SOS. Este sistema se activa cuando hay daño en el DNA. Funciona principalmente con dos proteínas reguladoras, LexA y RecA. Esta última es producto del gen *recA*, se activa con la luz UV probablemente por interacción de dicha proteína con oligonucleótidos formados como resultado de la degradación del DNA tras la irradiación. La proteína LexA tiene un control negativo sobre una serie de genes como el propio *recA*, y los genes de las nucleasas *uvr* que eliminan a los dímeros de Timina. Estos genes se expresan cuando se degrada la proteína LexA (Darnell *et al.*, 1990).

Con ácido nalidixico la respuesta al estrés calórico ocurre entre 10 y 15 minutos. Este inductor, al igual que la coumermicina y la clorobiocina, inhibe a la DNA girasa, que es esencial para la duplicación del DNA de *E.coli* (Neidhardt *et al.*, 1984).

Los análogos de aminoácidos, la limitación de la fuente de carbono o de aminoácidos, el cambio alcalino, altas concentraciones de sal y cambios entre condiciones aeróbicas y anaeróbicas inducen parcialmente la respuesta.

Otros inductores de los genes de las HSPs son los metales pesados, ionóforos de calcio, agentes quelantes, piridoxina, azul de metileno, glucosamina, deoxiglucosa, agentes teratogénicos, componentes sulfhidrilos como arseniato de sodio, diamida y otros componentes no polares como dimetilsulfóxido (Neidhardt *et al.*, 1984). A excepción del etanol, la mayoría de estos inductores sólo promueven la síntesis de algunas HSPs.

La respuesta estricta ("stringent") también provoca una respuesta similar al estrés calórico. Esta respuesta se induce cuando en condiciones pobres de crecimiento hay escasez de algún tRNA cargado con su respectivo aminoácido. En la respuesta se reducen varios procesos como la duplicación del DNA, la síntesis de proteínas, de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, rRNA y tRNA. Sin embargo, se estimulan otros procesos como la biosíntesis de

aminoácidos. La respuesta estricta se regula por el nucleótido no usual ppGpp que se acumula notablemente en estas condiciones. También interviene el gen *relA* que codifica para el factor estricto. Este factor sólo es activo cuando se asocia a un ribosoma que está participando en la traducción. De esta forma la síntesis máxima de ppGpp, y por lo tanto la respuesta máxima estricta, ocurren cuando un ribosoma se une al mRNA sin su respectivo tRNA con su aminoácido. En la regulación también interviene el producto del gen *spot* que degrada a ppGpp (Voet y Voet, 1990).

En eucariontes también son inductores los glucocorticoides como hidrocortisona y dexametasona y las hormonas esteroideas (Fisher *et al.*, 1986; Hahn y Li, 1990). Esto sugiere que las HSPs pueden proteger contra una gran variedad de estreses ambientales (Lindquist, 1986).

La lista de inductores de la respuesta a estrés calórico puede dividirse en tres amplias categorías: a) estreses ambientales; b) condiciones de no estrés como crecimiento celular normal, desarrollo, diferenciación y activación de ciertos oncogenes; y c) estados patológicos (Morimoto *et al.*, 1992).

Debido a la gran cantidad de inductores, es probable que estos interactúen con varios blancos que originan señales separadas y que finalmente activan a *rpoH* (Fig. 3A). Los blancos pueden ser proteínas, DNA y membrana y se provocan así señales como desnaturalización de proteínas, cortes de cadena sencilla y doble cadena en el DNA y cambios de fluidez en la membrana. Puede ser también que haya un blanco celular para todos los inductores (Fig. 3B), o que haya sólo una señal efectiva y otras que activen indirectamente dando lugar a una sola respuesta (Fig. 3C) (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

La mayoría de los inductores generan proteínas aberrantes o proteínas parcial o totalmente desplegadas, lo cual apoya la idea de que las proteínas dañadas son las señales de la respuesta (Goff y Golberg, 1985), ya que la producción de proteínas heterólogas, la fusión de proteínas, las proteínas mutantes o los fragmentos de proteínas inducen la respuesta (Parsell y Sauer, 1989). Sin embargo, no se excluye la idea de que la presencia de sensores y señales adicionales como componentes de la membrana, ácidos nucleicos y ribosomas participen también en la respuesta. Estos últimos parece que tienen cambios en la composición de proteínas durante el estrés calórico (Glover, 1982; Scharf y Nover, 1982). Por ejemplo, los polisomas desaparecen durante este estrés (Lindquist *et al.*, 1975).

La variedad de agentes y el intervalo amplio de temperatura sobre la cual se induce la respuesta sugiere la posibilidad de que exista alguna señal metabólica llamada alarmona que podrían activar a *rpoH*. Una de ellas es la diadenosina 5', 5'''- P1, P4 tetrafosfato (AppppA). Estas moléculas responden a una amplia variedad de agentes oxidantes. Las condiciones que inducen el estrés calórico pueden también provocar un estrés de oxidación en las células en que se daña la membrana e impide el flujo normal de electrones (Lee *et*

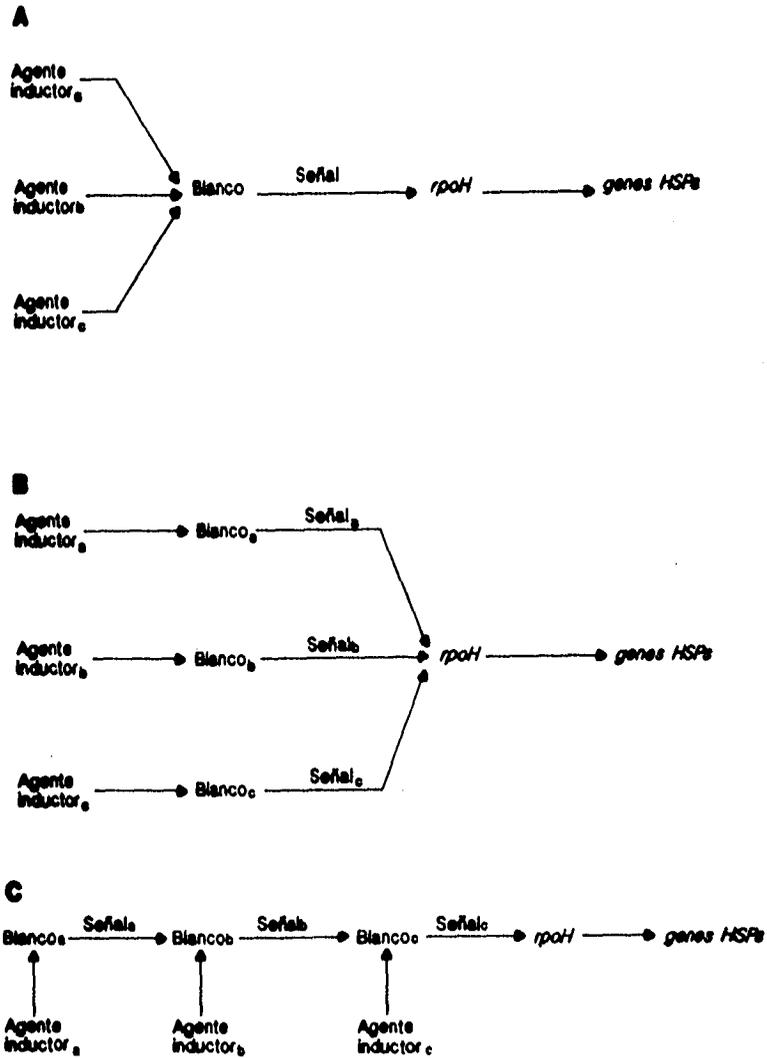


Figura 3. Modelos alternativos para la inducción de la respuesta al estrés calórico. En el modelo **A**, hay un solo blanco para todos los inductores. En el modelo **B**, los inductores interactúan con blancos y señales separados, pero cada señal enciende directamente el regulón. En el modelo **C**, hay directamente sólo una señal efectiva; las otras actúan indirectamente dando lugar a la señal efectiva (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

al., 1983). Durante el estrés por calor se eleva la concentración de varias alarmonas. Sin embargo, es posible que estas moléculas no actúen como señal en este estrés, ya que en un estrés de calor poco severo, como es el de 28 a 42° C y con tratamientos con ácido nalidixico se inducen las HSPs, pero no las alarmonas. Además la cinética de la respuesta de las alarmonas no corresponde, ya que en *E. coli* la respuesta es transcripcionalmente activa en minutos, en cinco minutos la síntesis de mRNA empieza a declinar y la acumulación de alarmonas comienza entre 5 y 15 minutos (Lindquist, 1986).

En eucariontes, anteriormente se pensaba que los factores que afectan la fosforilación oxidativa o el transporte de electrones afectaban el mecanismo de la respuesta oxidativa e inducían la respuesta a estrés calórico. Actualmente se sabe que esto no parece ocurrir ya que hay factores que inducen la respuesta y no afectan la respiración, además la respuesta no es particular de la mitocondria (Lindquist, 1986).

3.5 Organización de los genes de estrés calórico en el cromosoma bacteriano

El gen *rpoH* es una unidad de transcripción, se encuentra entre el operon *fisYEX* y el gen *livJ* en el minuto 76. El terminador ρ -independiente de *rpoH* tiene una estructura tallo-asa. σ^{70} y σ^{24} participan en el proceso de transcripción de *rpoH* según se explica más adelante.

Se conocen nueve genes que han sido mapeados en varios operones o unidades de transcripción: *groESL*, *dnaKJ*, *rpoD*, *lysU*, *grpE*, *rpoH*, *htpG* y *lon* que están agrupados entre los 90 y 10 minutos del mapa circular de *E. coli* (Fig. 4). Hay dos operones bicistrónicos: *dnaKJ* y *groESL*.

El operón de *groE* se encuentra en el minuto 95 y codifica para dos proteínas: GroES y GroEL de 15 y 65 kDa., respectivamente. Este operón, además del promotor para σ^{32} , tiene un promotor para σ^{70} (Taylor *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1988).

Los genes para *dnaK* y *dnaJ* se encuentran muy cerca del origen de duplicación. Estos forman un operón con dos promotores que se inducen por calor y se localizan en las posiciones 115 y 40 hacia 5' en relación al sitio de inicio de la transcripción (Cowing *et al.*, 1985; Saito y Uchida, 1978). Estos genes codifican para las proteínas DnaK y DnaJ, respectivamente. Aún no se conoce si este operón tiene también un promotor para σ^{70} .

El gen de *rpoD* se encuentran en el minuto 67 y codifica para σ^{70} . Este gen forma parte de un mRNA policistrónico que contiene a los siguientes genes: *rpsU*- *dnaG* - *rpoD*. Los

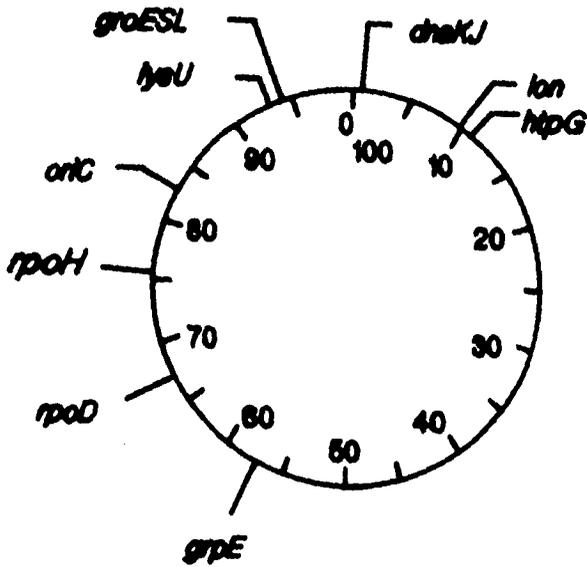


Figura 4. Localización de los genes de estrés calórico de *E. coli* K12 (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

dos primeros codifican para la proteína ribosomal S21 y la DNA primasa, respectivamente (Burton *et al.*, 1983). El gen *rpoD* puede transcribirse por un promotor de estrés calórico y por dos de σ^{70} (Zhou *et al.*, 1988).

El gen *lysU* está cerca de *cadA*, en el minuto 93, y codifica para la lisina descarboxilasa (Van Bogelen *et al.*, 1983). El gen *lon* se encuentra en el minuto 10 y codifica para una proteasa (Lindquist, 1986). Otro gen es el *htpY* que se localiza a -700 pb del operón *dnaKJ* y que se transcribe en la misma dirección que éste (Missiakas *et al.*, 1993). En procariontes los genes que codifican para estas proteínas generalmente están en una sola copia. En eucariontes, al menos los genes homólogos que codifican para DnaK y DnaJ constituyen una familia de genes.

Existen otros genes que se requieren para crecer en temperatura alta que son los genes *htr* ("high temperature requirements"). Estos genes se transcriben por σ^{70} , σ^{32} ó σ^{24} . Un ejemplo es *htrC*, cuyas mutantes tienen una síntesis elevada de HSPs. Es probable que este gen module el control transcripcional de σ^{32} (Raina y Georgopoulos, 1990).

En los eucariontes, la mayoría de los genes de estrés calórico no tiene intrones. De los 70 genes que se conocen, 13 son de *Drosophila* y sólo el gen *hsp83* de este organismo y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* tienen intrones (Hackett y Lis, 1983; Holmgren *et al.*, 1981; Russnak *et al.*, 1983).

3.6 Promotores del gen regulador *rpoH*

El gen *rpoH* tiene al menos 5 promotores: P1, P2, P3, P4 y P5 (Fig. 5) (Erikson *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 1990). Los promotores P1, P4 y P5 se reconocen por σ^{70} , es decir, σ^{70} reconoce al gen que codifica para σ^{32} . P3 sólo interacciona con σ^{24} y es muy activo solamente a temperatura alta (Erikson y Gross, 1989; Wang y Kaguni, 1989 b). P2 es un promotor cepa específico (Erikson *et al.*, 1987). Este promotor se encuentra únicamente en la cepa SC122 (Cooper y Ruettinger, 1975) a -130 pb de la región codificadora.

El P1 es el más potente a temperatura fisiológica y el más distal; se encuentra a -220 pb del sitio de inicio de la traducción de *rpoH* y está adyacente a *fsyEX* que es uno de los operones de la división celular. Este promotor está sobrelapado con el terminador del operón *fsyEX* y éste junto con el P4 se incrementa por un cambio de baja a alta temperatura. Este promotor se encuentra a -80 pb de la región codificadora (Erikson *et al.*, 1987; Yura *et al.*, 1993).

P3 no es reconocido por σ^{70} , sino que interacciona con un factor de 24 kDa, σ^{24} ó σ^E , producto del gen *rpoE* que se localiza en el minuto 55.5 y que posee principalmente dos

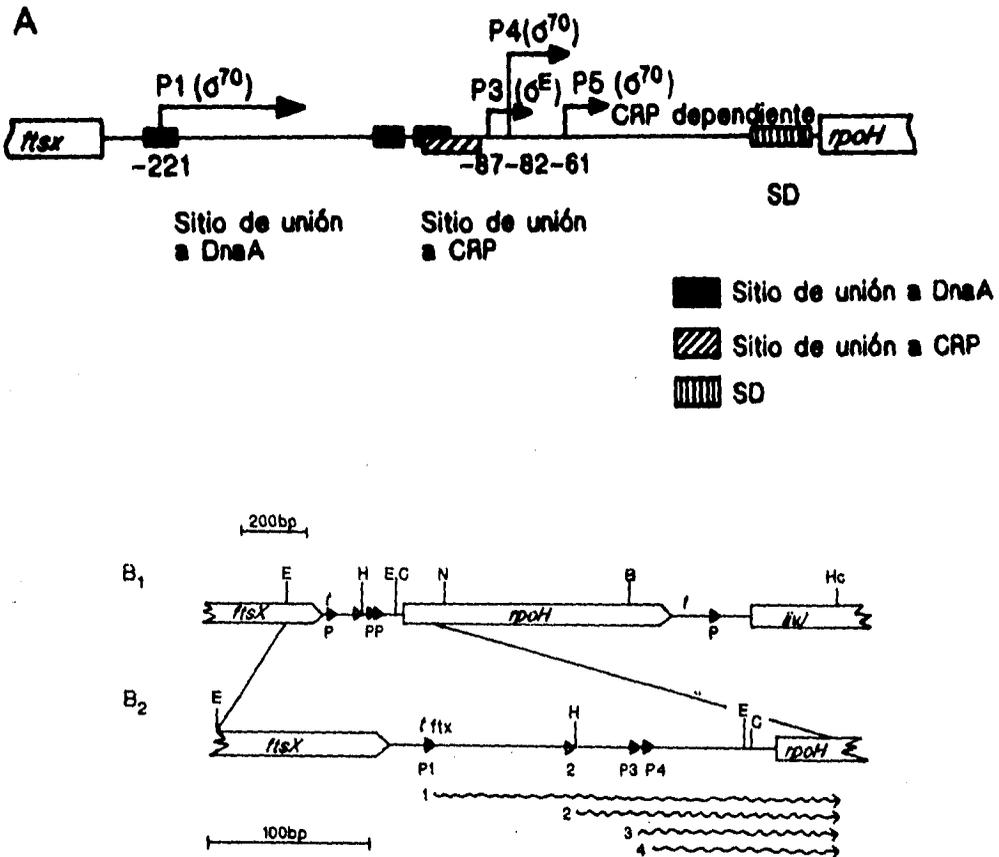


Figura 5. A) Organización de los promotores de *rpoH* (Yura *et al.*, 1993). B) Diagrama de la unidad de transcripción de *rpoH*. (B1) El gen *rpoH* se encuentra entre los genes *ftsX* y *livJ*. Los promotores se indican con una P mayúscula y los terminadores con una letra t minúscula. (B2) Ampliación de la región intercistronica *ftsX-rpoH*. Las líneas onduladas representan los tipos de mRNA. El terminador del operón *ftsYEX* se sobrelapa con el sitio de inicio del P1 (Erikson *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 1990; Wang y Kaguni, 1989 a).

promotores, uno de los cuales se autorregula por el propio σ^{24} . La actividad de este factor se regula positivamente por un aumento en la transcripción de *rpoE* y posiblemente en forma negativa por un regulador que se localiza hacia 3' junto a *rpoE* (Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995; Wang y Kaguni, 1989 b). σ^{24} no inicia la transcripción mediada por los otros tres promotores. La secuencia consenso de este sigma para -35 y -10 es GAACTT y TCTGA, respectivamente (Erikson y Gross, 1989). A 30°C cuenta con menos del 30% de los transcritos de *rpoH*. A temperaturas de 42 a 43.5°C sus transcritos se incrementan más de diez veces. En una exposición a temperatura letal, en la cual σ^{70} se inactiva, todo el mRNA proviene de P3 (Erikson *et al.*, 1987). Esto puede explicar el hecho de que durante el estrés calórico de 50°C se sintetizan únicamente las proteínas de estrés calórico (Craig y Gross, 1991; Neidhardt *et al.*, 1983). Además del P3 de *rpoH*, σ^{24} reconoce a más de 10 genes, incluyendo al promotor del gen *htrA*. Estos datos sugieren que los genes cuya transcripción depende de σ^{24} constituyen un segundo regulón del estrés calórico.

P5 es un promotor débil que se encuentra entre -61 y -62 pb del sitio de inicio de la transcripción. Este promotor es sensible a la represión catabólica. Si en las células hay glucosa o un producto de su degradación se impide la síntesis del mRNA de las enzimas del metabolismo para degradar otros azúcares como la lactosa. Esto ocurre porque en *E. coli* la glucosa es la fuente preferencial de carbono. En ausencia de glucosa las bacterias presentan un incremento en adenosina 3', 5'-monofosfato (cAMP) que parece ser una señal de "alerta" para un estrés metabólico. Cuando el cAMP se añade con glucosa y lactosa la inducción de β -galactosidasa, la enzima que corta a la lactosa, no se reprime tanto como cuando no se añade el cAMP. Esto indica que el cAMP es muy importante para superar la represión por glucosa (Darnell *et al.*, 1990). El promotor P5 incrementa su expresión en ausencia de glucosa o por adición de etanol, requiere cAMP y a la proteína receptora de cAMP (CRP). La unión de CRP al DNA induce la transcripción de P5, pero interfiere con la transcripción de P4. Esto sugiere una alternancia entre ambos promotores (Nagai *et al.*, 1990). Algunos estudios recientes muestran que P5 probablemente es un promotor secundario, ya que las células con o sin cAMP pueden responder a un estrés por calor (Lee-Rivera y Gómez-Eichelmann, 1994).

3.7. Proteínas de estrés calórico (HSPs)

Las proteínas de estrés calórico son aquellas cuya síntesis se incrementa brusca y rápidamente al aumentar la temperatura. Se han conservado durante la evolución, lo que sugiere que tienen funciones similares en todos los organismos (Georgopoulos *et al.*, 1990; Morimoto *et al.*, 1992). En *E. coli* su tamaño varía entre 10 y 94 kDa. En 1981 se identificaron 9 proteínas. En 1984 con geles de dos dimensiones se identificaron 17. En 1993 con una técnica global de transcripción para simultáneamente detectar, clonar y mapear genes se identificaron 26 proteínas nuevas, 16 de las cuales se activan por σ^{32} (Chuang y Blattner, 1993; Yura *et al.*, 1993). Estas proteínas, con las que se conocían

anteriormente, suman más de 40 HSPs (Tabla I). Las HSPs no sólo tienen un papel fundamental en la fisiología celular normal, sino que en condiciones de estrés calórico se sobreproducen, protegen a otras proteínas de la inactivación por el calor y ayudan a la célula a crecer en un intervalo de temperatura más alto. Esto es, evitan la inactivación de las proteínas celulares, reactivan a proteínas desnaturalizadas y ayudan a la degradación de proteínas desnaturalizadas que no se pueden reparar y que se acumulan durante el crecimiento normal y en condiciones de estrés (LaRossa y Van Dyk, 1991; Hendrick y Hartl, 1993). Algunas HSP como DnaK, GroEL y ClpB se unen específicamente al dinucleótido AppppA que se sintetiza durante el estrés calórico (Fuge y Farr, 1993).

Algunas HSPs son chaperonas moleculares, es decir, son proteínas que median el correcto plegamiento de polipéptidos, pero sin ser componentes de las estructuras ensambladas, ya que son proteínas que se unen a otras proteínas sin formar parte del complejo. Otra función de las chaperonas es mediar el correcto ensamble de polipéptidos, sin formar tampoco parte activa de su estructura, estabilizar formas inestables de otras proteínas y controlar la unión y liberación del complejo enzima-sustrato. Asimismo, estas proteínas facilitan el correcto destino de otras proteínas, ayudan a su plegamiento y a su ensamble oligomérico. Las chaperonas también transportan proteínas a compartimientos subcelulares y controlan el cambio entre conformaciones activas e inactivas debido a que la formación de estructuras plegadas inhibe la traslocación hacia la membrana interna. Para realizar estas funciones, deben reconocer elementos estructurales que normalmente no se exponen en las proteínas nativas (Ellis y van der Vies, 1991). Algunos ejemplos son DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES, y probablemente HtpG que intervienen en la duplicación del DNA del fago λ , la transcripción del RNA, el transporte de proteínas, la proteólisis, la síntesis de flagelos y la mutagénesis por UV (Georgopoulos *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1992). Algunas HSPs, como se explicará más adelante, tienen un efecto regulador negativo sobre la síntesis de las HSPs.

Las mutaciones en algunas HSPs como DnaK y GroEL producen efectos pleiotrópicos: cambios en permeabilidad, filamentación, daño en el DNA y RNA y cambios en la síntesis de proteínas (Takano y Kaffedda, 1972; Wada e Itikawa, 1984). GroEL es una chaperonina (60 kDa) que durante el estrés calórico se fosforila, lo cual incrementa su afinidad por las proteínas desnaturalizadas y estimula su disociación dependiente de ATP (Sherman y Goldberg, 1994). DnaK es una proteína que a temperaturas fisiológicas y elevadas se localiza principalmente en el citoplasma, aunque probablemente existe una subpoblación que se asocia a la membrana (Bukau *et al.*, 1993). Esta proteína tiene actividad de ATPasa, se autofosforila en treonina y probablemente es el principal modulador de la respuesta. Esta proteína interactúa directamente con DnaJ y GrpE (Liberek y Georgopoulos, 1993). Un exceso de ella durante la exposición al calor protege *in vitro* a la RNA polimerasa de la inactivación térmica. Esto se conoce porque una enzima que se inactiva por calor, se puede reactivar 60% con un exceso de DnaK en un proceso dependiente de ATP. Esta activación se incrementa si además están presentes DnaJ y GrpE. Por ejemplo, la actividad de la

Tabla I. Proteínas de Estrés Calórico (HSPs) en *E. coli* K12

Proteína	Masa Molecular (KDa)	Proteína	Masa Molecular (KDa)
DnaK	69	RpoD	72
DnaJ	39	HsfL	70
Lon	89	HsfM	31
HsfA	65	HsfN	27
HsfB	46	HsfO	33
Ctp	22(24)	HsfP	30
HtpG	70	HsfQ	24
HsfC	60	HsfR	16
HsfD	?	HsfS-ibpB-HtpE	16,3
PspA	28	HsfT-ibpA-HtpN	15,8
HsfE	60	HsfU-HtpI	49
HsfF	51	HsfV-HtpO	21
HsfG	41	GroEL	60
HsfH	39	HsfW	22
HsfI-HtpH	36	GroES	16
HsfK	14	HsfX	51
GrpE	26	HsfY	45
LisI-rNASintetasa	—	HsfZ	37

Luciferasa de la luciérnaga se expresada en *E. coli* depende de DnaK, DnaJ y GrpE. En células silvestres pierde su actividad a 42° C, pero la recupera si la temperatura baja a 30° C; esta recuperación de la actividad de la luciferasa no se observa en mutantes *dnaK* o *dnaJ*. La proteína GrpE, aunque es activa como un homodímero, estimula la hidrólisis ADP-ATP con ayuda de DnaJ y DnaK (Liberek *et al.*, 1991).

Otra proteína muy importante del estrés calórico es Lon, una proteasa dependiente de ATP de 94 kDa. Las mutantes Lon⁻ acumulan muchos mucopolisacáridos, tienen una respuesta SOS anormal y disminuyen la habilidad para lisogenizar al fago lambda. Esta proteína degrada a Sula que es un inhibidor de la división celular (Gottesman *et al.*, 1985). Existe otra proteasa dependiente de ATP llamada Clp o Ti que se deriva de una proteína precursora más grande (Chuang y Blattner, 1993). El factor σ^{70} también se induce por calor, pesa 70 kDa, se asocia a la RNA polimerasa y se une a promotores de no estrés (Gross *et al.*, 1979; Cowing *et al.*, 1985). Otra HSP es la lisil tRNA sintetasa que es la única proteína de su especie (Neidhardt *et al.*, 1984). Más recientemente se encontró D48.5, que es también una HSP regulada por σ^{32} , la cual es el producto del gen *htpI* y es esencial para el crecimiento a temperatura alta (Peruski y Neidhardt, 1994).

En procariontes, las HSPs participan en la duplicación del DNA (DnaK y DnaJ), en la síntesis del RNA (factor sigma), en la síntesis de proteínas (LysU), en el procesamiento o ensamble (GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE) y en la degradación de proteínas (Lon) (Neidhardt *et al.*, 1984).

En eucariontes las principales HSPs son las de 104, 90, 70, 60 y 20 kDa. Muchas de ellas también tienen actividad de chaperonas. Por ejemplo, HSP 70, que funcionalmente está como un multímero, estabiliza proteínas *in vivo*, estimula el ensamble/desensamble del complejo de duplicación y la exportación de proteínas. También reactiva a la RNA polimerasa inactivada por calor y facilita la degradación de proteínas anormales. Otro ejemplo es HSP60, que es un oligómero que promueve el plegamiento de proteínas y el ensamble de proteínas celulares y virales (Martín y Hartl, 1992).

En eucariontes la HSP más conservada es la HSP70, la cual es homóloga con la DnaK de *E. coli*. Esta proteína se purifica principalmente como un monómero, pero su forma funcional es la de un multímero. Durante el estrés calórico se encuentra principalmente en el núcleo y en menor cantidad en la membrana celular. En la recuperación desaparece del núcleo y se encuentra en el citoplasma (Velázquez *et al.*, 1983; Tanguay, 1983; Velázquez y Lindquist, 1984). Otras HSPs son HSP82, HSP81, HSP83. Esta última se reprime al final después de un cambio a baja temperatura. Además de estas proteínas, se conocen otras como la HSP36, HSP27, HSP26, HSP23, HSP22 que se encuentran en el cristalino de los mamíferos. Estas proteínas se traslocan entre el núcleo y el citoplasma dependiendo de la temperatura (Lindquist, 1986).

Existen también otras proteínas menores de estrés calórico en *Drosophila melanogaster* que durante el estrés se encuentran en el núcleo asociadas al RNA (Keene *et al.*, 1981; Pelham, 1982; Wadsworth *et al.*, 1980).

3.8. Modelos de la inducción del regulón σ^{32}

En la inducción del regulón de σ^{32} intervienen, además del regulador positivo σ^{32} , las proteínas DnaK y DnaJ que funcionan como reguladores negativos (Fig. 6). El regulador positivo es σ^{32} , que confiere a la RNA polimerasa la especificidad para transcribir a los genes del estrés calórico. La RNA polimerasa con σ^{32} es la que reconoce a los promotores del estrés calórico (Covin *et al.*, 1985; Fujita e Ishihama, 1987; Zhou *et al.*, 1988). Hasta el momento sólo se conoce la secuencia de 13 promotores que se reconocen por σ^{32} , es decir, solamente los reconoce σ^{32} , pero no σ^{70} (Tabla II). Estos promotores tienen una secuencia consenso TCTCNCCCTGAA en la región -35, un espacio de 13 a 17 nucleótidos y CCCATNTA en la región -10 que es la secuencia que da especificidad para establecer contacto con el sigma. Estos promotores son claramente diferentes de los de σ^{70} que tienen una secuencia consenso TTGACA en la región -35, un espacio de 16 a 18 nucleótidos y TATAAT en la región -10.

El factor σ^{32} reconoce específicamente a los promotores que se inducen con calor (Blomm *et al.*, 1986; Cowing *et al.*, 1985; Fujita e Ishihama *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1984), aunque recientemente se examinó al promotor *rmBp1* en el que se sobreponen las regiones -35 y -10 de σ^{32} y σ^{70} , lo que provoca que el sitio de inicio de la transcripción para ambos sigmas sea idéntico. (Neidhardt *et al.*, 1983; Newlands *et al.*, 1993). En *Bacillus subtilis* existe un mismo promotor que puede ser reconocido por dos formas diferentes de la holoenzima RNA polimerasa (Johnson *et al.*, 1983; Tatti y Moran, 1985; Wang y Doi, 1984).

Los experimentos recientes mostraron que σ^{32} se une físicamente a DnaK, DnaJ y GrpE. Parte de este complejo es roto por magnesio y ATP. El ATP rompe la asociación de DnaK y GrpE con σ^{32} , pero no con DnaJ. La asociación de DnaJ- σ^{32} y DnaK- σ^{32} ocurren independientemente de DnaK y DnaJ, respectivamente. La unión de DnaJ con σ^{32} incrementa la afinidad de DnaK por el complejo DnaJ- σ^{32} . Se ha observado también que se forma un complejo ternario DnaJ- σ^{32} -DnaK en presencia de GrpE o ATP. Esto muestra que DnaK, DnaJ y GrpE actúan juntas para interferir con la actividad de σ^{32} y de esta manera favorecer su degradación. De acuerdo con esto, se sugiere que en condiciones fisiológicas de crecimiento y no de estrés, DnaK, DnaJ y GrpE están unidas a σ^{32} . En estas condiciones de baja temperatura, la síntesis de σ^{32} se reprime a nivel de iniciación de la traducción y es inestable debido a la unión de DnaK/DnaJ. La vida media de σ^{32} es de un minuto. Parece haber una región en el extremo del carboxilo en σ^{32} que es importante para su estabilidad, es decir, un segmento de σ^{32} que ayuda a la interacción con las proteínas DnaK/DnaJ. Los

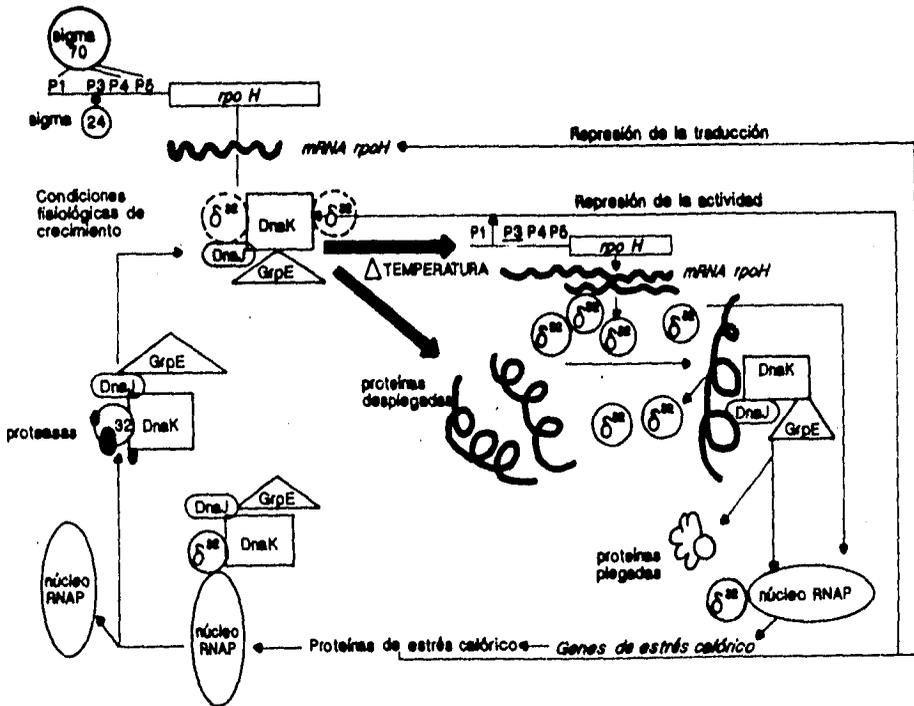


Figura 6. Modelo de regulación de la respuesta al estrés calórico.

Introducción

Tabla II. Promotores transcritos por la RNA polimerasa con σ^{82}

Posición en el mapa	Promotor	Region-35	Espacio	Region-10
0.3'	<i>dnaKp1</i>	T C T C c C C C T T G A I	14	C C C C A T I T A
0.3'	<i>dnaKp2</i>	T I g g g C a g T T G A A	13	C C C C T a I T A
10'	<i>lon</i>	T C T C g g C g T T G A A	14	C C C C A T s T A
10'	<i>clpP</i>	T g T t a t g C T T G A A	14	a C C C A T s a c
11'	<i>hlpGpl</i>	g C T C t C g C T T G A A	15	C C C C A T c T c
28'	<i>topApl</i>	a C a a g g g g T T G A I	16	g I C C A T s T c
57'	<i>grpE</i>	T g c t t C C C T T G A A	14	C C C C A T s a I
57'	<i>clpB</i>	c a s t a s C C T T G A A	14	C C I C A T I T A
67'	<i>rpoDphs</i>	T g c C a C C C T T G A A	16	g a C g A T s T A
83'	<i>lfp</i>	g a T a a g g C T T G A A	13	a C C C A T t I t
90'	<i>rmBpl</i>	a I T t c C t C T T G t c	14	C C C I A T s a t
94'	<i>groE</i>	T I T C c C C C T T G A A	13	C C C C A T I T c
F	<i>repE</i>	c C T g c t t a T T G A c	17	g s C a A T c T A
Secuencia consenso de σ^{82}		T C T C - C C C T T G A A	13 - 17	C C C C A T - T A
Secuencia consenso de σ^{70}		T T G A C A	16 - 18	T A T A A T

Tomada de Yura *et al.*, 1993

genes de estrés se transcriben aunque haya muy poco σ^{32} , lo cual implica la habilidad de σ^{32} para competir con otros sigmas. A baja temperatura σ^{32} y σ^{70} tienen la misma afinidad por la RNA polimerasa (Liberek *et al.*, 1992; Osawa y Yura, 1981).

Por su parte, σ^{70} no forma un complejo estable con DnaJ o DnaK. Su presencia no interfiere con el complejo DnaJ- σ^{32} -DnaK. *In vitro*, el 90 % de σ^{32} y sólo el 10 % de σ^{70} se unen a la RNA polimerasa (Liberek y Georgopoulos, 1993).

Por lo tanto, DnaK, DnaJ y GrpE actúan como reguladores a tres niveles: represión de la traducción del mRNA de *rpoH*, degradación y represión de la actividad de σ^{32} (Bukau, 1993).

Cuando las células se cambian a temperatura alta hay un decremento repentino en la concentración de DnaK y DnaJ libres debido a que, por su actividad de chaperonas, se unen a proteínas desnaturalizadas y desplegadas. De esta forma se reduce rápidamente la unión a σ^{32} que queda libre lo cual facilita su unión con la RNA polimerasa. Además, *in vitro* σ^{32} se asocia preferencialmente con la RNA polimerasa antes que con DnaK o DnaJ. La síntesis de σ^{32} se induce posiblemente por un rompimiento de la estructura secundaria de su mRNA. Muchos de los polipéptidos nacientes de σ^{32} se unen a la RNA polimerasa antes que a DnaK y DnaJ.

La inducción del estrés calórico se logra por un incremento en los niveles de σ^{32} que aumentan más de quince veces, aunque el mRNA de *rpoH* sólo se incrementa dos veces. Esto se debe a un aumento de la traducción de dicho mRNA y a un aumento en la vida media de la proteína σ^{32} . El incremento de la traducción del *rpoH*, antes que la acumulación del mRNA de *rpoH* es el primer evento que permite la síntesis de σ^{32} , ya que el aumento de σ^{32} ocurre a los tres minutos del cambio de temperatura y el aumento en el mRNA de *rpoH* a los seis minutos (Kamath-Loeb y Gross, 1991 b). El mRNA normal no se degrada, pero sí se retiene en la célula (DiDomenico *et al.*, 1982; Krüger y Benecke, 1981). Asimismo, la estructura secundaria de este mRNA está determinada por la interacción de dos regiones reguladoras en 5' (A y B) que comprenden 200 nucleótidos, los cuales actúan *in cis*. Esta estructura a su vez puede regular a nivel de la traducción la expresión del gen *rpoH* (Yuzawa *et al.*, 1993). Más recientemente Nagai *et al.* (1994) han reportado dentro del gen *rpoH* la presencia de una región hacia 3' (región C) que participa en el abatimiento de la respuesta al estrés calórico por medio de un mecanismo de regulación negativa mediado por DnaK. A la vez σ^{70} disminuye su actividad con el incremento de la temperatura y con el aumento de σ^{32} . Este decremento en la actividad de σ^{70} puede ser paradójico, ya que σ^{70} es una HSP y como tal aumenta su síntesis. Esto se explica porque puede ocurrir que σ^{70} sea menos activo a alta temperatura, tal vez por modificaciones moleculares que evitan la asociación con la RNA polimerasa (Erikson y Gross, 1989).

Una propuesta de Craig y Gross (1991) es que el sensor de esta respuesta son las proteínas aberrantes, desplegadas o mal plegadas que son sustrato para DnaK/DnaJ y que como se mencionó, al liberar a σ^{32} permiten su estabilización. De esta forma DnaK sirve como un sensor que detecta los cambios en la concentración celular de proteínas desplegadas o desnaturalizadas. Otra propuesta es que es DnaJ antes que DnaK la que puede desempeñar un papel regulador en la respuesta a estrés calórico. El secuestro de DnaJ a proteínas desnaturalizadas evita la asociación con σ^{32} .

Alternativamente, según McCarty y Walker (1991), DnaK puede ser un sensor directo. Estos autores encontraron que la actividad de ATPasa y de autofosforilación de DnaK se incrementan de manera lineal con la temperatura. La treonina-199 es el aminoácido que se fosforila y es crítico para la actividad de ATPasa de DnaK. Con la hidrólisis del ATP se disocian σ^{32} y DnaK. Un incremento en la hidrólisis de ATP a temperaturas altas provoca un aumento en el σ^{32} libre y por lo tanto un incremento en la expresión de los genes de estrés calórico. De esta forma la estrategia de sobrevivencia a temperaturas elevadas incluye no sólo mayor expresión de DnaK, sino también mayor actividad de esta. Lo anterior difiere con la opinión de Craig y Gross (1991) en que ellas proponen un mecanismo homeostático en el que el nivel de DnaK libre en una célula constituye un indicador molecular. DnaK detecta indirectamente el incremento en la temperatura al interactuar con las proteínas parcialmente desnaturalizadas que aparecen al incrementar la temperatura. McCarty y Walker apoyan que DnaK es directamente un "termómetro". Se conoce que la fosforilación de DnaK se incrementa con la temperatura y que a su vez la DnaK fosforilada tiene mayor afinidad por las proteínas desplegadas (Sherman y Goldberg, 1993). Estos modelos no son mutuamente excluyentes y ambos pueden funcionar para integrar efectos directos e indirectos de la temperatura.

Otro modelo totalmente diferente es el que propone que son los ribosomas los que funcionan como sensores del estrés calórico. Es probable que durante el estrés calórico haya un cambio en la composición de los mismos y el estado del ribosoma sea el que de la señal. Esto se basa en que hay compuestos que bloquean la traducción e inducen sólo HSPs y otros que inducen proteínas de estrés al frío. Por lo tanto, el ribosoma puede ser un sensor de temperatura que incluye varios SGR en *E. coli* (Scharf y Nover, 1982; VanBogelen y Neidhardt, 1990).

La respuesta al estrés por calor termina al incrementarse los niveles de las proteínas DnaK y DnaJ. Estas proteínas se unen nuevamente a σ^{32} y entonces se reprime o atenúa la transcripción de las HSP y se restaura la traducción del mRNA normal (DiDomenico *et al.*, 1982 b; Krüger y Benecke, 1981). Para detener el proceso se requiere σ^{70} para restablecer la transcripción de los genes no propios de estrés calórico, ya que parece ser que σ^{70} y σ^{32} compiten por la RNA polimerasa.

4. DETECCIÓN EXPERIMENTAL DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS CALÓRICO

Una manera sencilla de estudiar el estrés calórico, utiliza el marcaje radiactivo de proteínas y su separación por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para marcar las proteínas generalmente se emplea el aminoácido metionina con el radioisótopo ^{35}S . De esta forma, las cadenas proteicas nacientes son las primeras en marcarse. A medida que transcurre el tiempo se observa un aumento en el número de cadenas completas marcadas radioactivamente (Darnell *et al.*, 1990). Este método se emplea porque durante el estrés calórico se modifica la síntesis de las proteínas de una manera importante. Este procedimiento se combina con la técnica bioquímica de electroforesis en gel de poliacrilamida de una o dos dimensiones. Posteriormente, en la autorradiografía se detecta cada cadena recién sintetizada. En el caso de geles de una dimensión la respuesta al estrés calórico puede caracterizarse por el incremento de las proteínas de 90 kDa., DnaK y GroEL.

5. CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS CALÓRICO EN *E. coli*

Como se ha explicado, la respuesta al estrés calórico se caracteriza principalmente por el incremento en la síntesis de las HSPs, por cortes en cadena sencilla y doble en el DNA y por alteraciones en la membrana celular. Sin embargo, existen algunos aspectos particulares relevantes en este fenómeno y que incluyen factores medio ambientales, metabólicos y genéticos.

5.1 Diferentes temperaturas del estrés calórico

La respuesta del estrés calórico depende de la magnitud y duración de la elevación de la temperatura. En organismos que crecen en un intervalo de temperatura amplio la respuesta máxima se logra de 10 a 15°C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento. En organismos que crecen en un intervalo más restringido, la respuesta ocurre al elevar la temperatura alrededor de 5°C. En bacterias termófilas como *Sulfolobus shibataei*, el estrés calórico se observa sólo al cambiar a una temperatura por arriba de 88°C. Otro ejemplo es *Mycobacterium tuberculosis*, en la cual el patrón de HSPs depende de la severidad del estrés. Un estrés calórico suave de 30 a 37 ó 42°C incluye la inducción de DnaK, GroEL y GroES.

A una temperatura más alta como 45°C hay una mayor inducción de DnaK y otras HSPs de 90, 28 y 20 kDa., mientras que GroEL y GroES declinan. A una temperatura de 37 a 48°C las principales proteínas que se inducen son las de 90, 70, 20 y 15 kDa. (Young y Garbe, 1991).

En *E. coli*, que es una bacteria mesófila, la respuesta a estrés calórico se observa en un intervalo de temperatura amplio. Algunas HSPs se inducen ante un cambio de temperatura de 28 a 33 ó 36°C, no obstante que la temperatura óptima de crecimiento es 37°C. La respuesta al estrés calórico depende de la temperatura inicial y del incremento de ésta. Los cambios de temperatura baja (28 a 30°C) a una mayor (35 a 43°C) producen una respuesta transitoria que causa la inducción no sólo de las HSPs, sino también un incremento en la síntesis de todas las proteínas de la célula (Neidhardt et al., 1982; Yamamori et al., 1982). Los cambios a una temperatura de 43 a 47°C, que son temperaturas altas, causan una disminución en las proteínas de fondo o las proteínas no propias de estrés y un aumento de las HSPs. Los cambios a temperaturas letales inducen la síntesis de las HSPs y la inhibición de las otras proteínas. En este caso, la síntesis de las HSPs continúa hasta que las células mueren. Durante la exposición a una temperatura letal, ocurren cortes de cadena sencilla y doble del DNA que es lo que causa probablemente la pérdida de viabilidad (Neidhardt et al., 1984).

La temperatura en que se induce la síntesis de las HSPs depende del tipo de incremento de temperatura (brusco o gradual). Cuando el cambio es brusco y las células se llevan directamente a una temperatura muy alta, la respuesta máxima ocurre a una temperatura muy baja en relación con el intervalo de crecimiento. Cuando la temperatura se incrementa gradualmente la respuesta máxima se logra a una temperatura más elevada (Lindquist, 1986).

En eucariontes, además del incremento en la síntesis de las HSPs también ocurren otros eventos, como son el rompimiento de algunos orgánulos como el citoesqueleto, y alteraciones en la división celular. A su vez, la magnitud y duración de estos fenómenos ocurre de acuerdo a la intensidad del estrés calórico y a las características del propio organismo o célula, como son su estado de desarrollo y metabolismo. Por ejemplo, en los organismos eucariontes, los embriones tempranos de *Drosophila*, de erizo de mar y de algunos gusanos son incapaces de producir HSPs y en muchas ocasiones son sensibles al calor. Sin embargo, algunos embriones tempranos pueden sintetizar algunas HSPs a temperaturas normales (Lindquist, 1986). En otros eucariontes como *S. cerevisiae*, la respuesta en células a 25°C y con metabolismo de fermentación es transitoria si el incremento es a 36°C y sostenida si es a 40°C. En células respirando, la respuesta es pasajera a 34°C y sostenida a 36°C (Lindquist, 1986).

5.2 Duración de la respuesta del estrés calórico

La duración del estrés calórico se refiere al tiempo que requieren las células para que sintetizen nuevamente sus proteínas en concentraciones adecuadas a la última temperatura. A esto también se le llama adaptación, que se refiere a la restauración que ocurre en las células cuando éstas se mantienen a temperaturas de estrés. La salida del estrés calórico es un proceso gradual (DiDomenico *et al.*, 1982 b). No debe ser confundida con la recuperación, que es el tiempo necesario para sintetizar concentraciones convenientes de proteínas después de regresar a la temperatura fisiológica inicial (Duncan y Hershey, 1989). En el proceso de adaptación se requiere la reactivación del componente traduccional que se inhibe y la transcripción de un nuevo RNA. En la recuperación no existe este requerimiento, ya que con los mRNA que dejaron de traducirse se reinicia la actividad normal de la célula (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

La magnitud de la respuesta y su duración depende de la severidad del cambio. La máxima respuesta se obtiene después de un cambio a una temperatura letal donde no hay abatimiento de la respuesta (Craig y Gross, 1991).

En *E. coli* la concentración de la proteína σ^{32} se incrementa de 15 a 20 veces en los primeros cinco minutos después del cambio de temperatura y disminuye a los diez minutos a un nuevo nivel. Este nivel sólo es un poco más alto que el nivel previo al cambio de temperatura (Fig. 7). En las mutantes *dnaK756*, *grpE280* y *dnaJ259* la declinación de la respuesta es defectuosa. En bacterias sujetas a un estrés calórico de 30 a 42°C, la síntesis de HSPs permanece elevada a los 60 minutos. Esto se puede deber a su inhabilidad para degradar a σ^{32} . (Straus *et al.*, 1990).

A nivel de síntesis de proteínas hay muy pocos estudios sobre la duración del estrés calórico. Uno de los pocos estudios se realizó en la cepa W3110 en un estrés calórico de 30 a 42°C. En estos estudios se observó que el nuevo patrón de síntesis de proteínas del nuevo estado se logra a los 30 minutos después de la iniciación del estrés (Neidhardt y VanBogelen, 1987). Otras de las pocas investigaciones acerca de esto se realizaron en mezclas de cultivos que crecieron a 30 y 55°C sujetas a un estrés calórico de 42°C. Estos estudios se realizaron en 1981 cuando aún no se conocía el regulador de la respuesta y se efectuaron en cepas mutantes Tsn-K165 que tienen un supresor extragenético. Su objetivo fue estudiar el efecto de la cantidad del gen regulador del estrés calórico en el tipo de respuesta observada. Los resultados indicaron que la respuesta es más intensa cuando hay más expresión del gen *rpoH* y que la duración de la respuesta a nivel de HSPs a esta temperatura es entre 15 y 30 minutos (Yamamori y Yura, 1982).

La recuperación o salida del estrés calórico, por lo tanto, no se conoce con precisión. Esta respuesta se ha estudiado principalmente en temperaturas de 42°C. Es probable que su duración varíe según el grado de intensidad del estrés. Este a su vez puede ser diferente

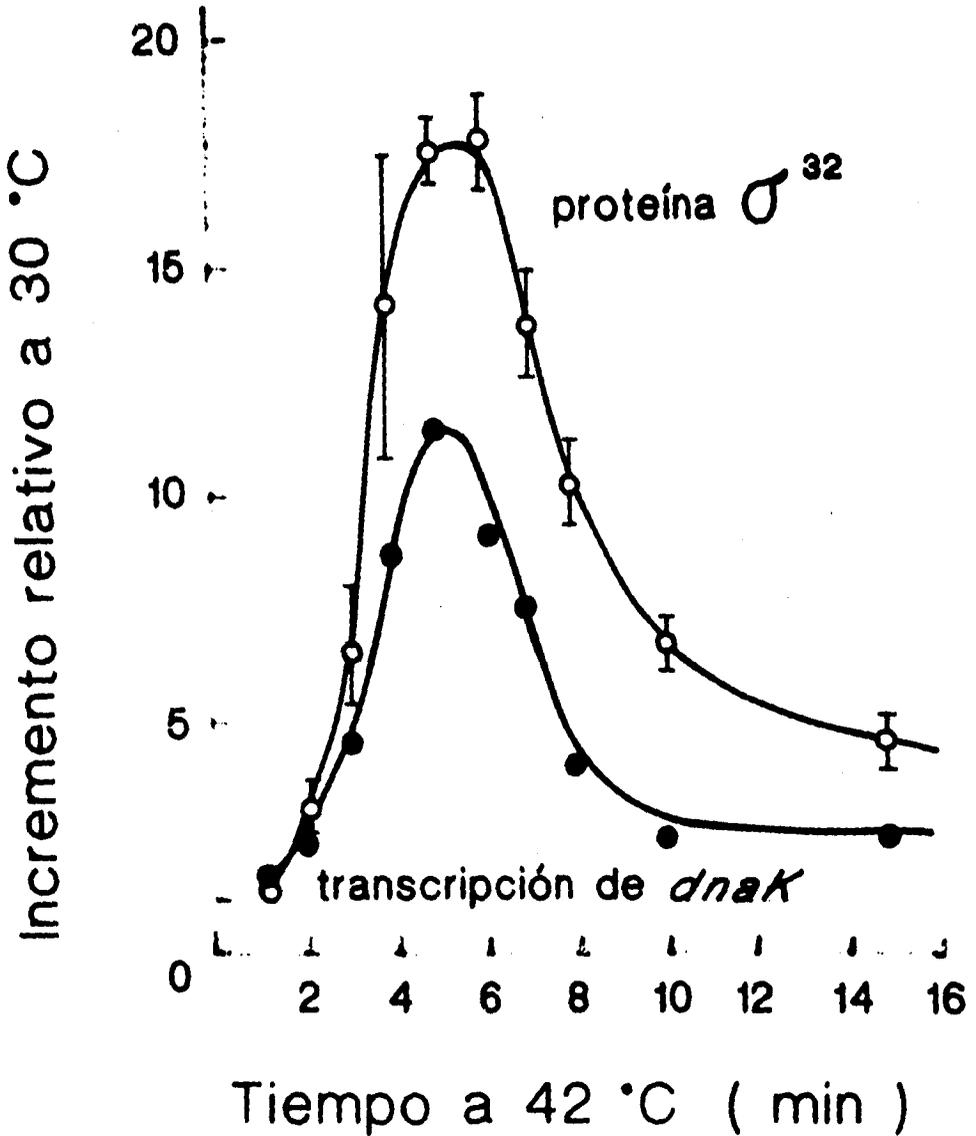


Figura 7. Cambios en la cantidad de la proteína σ^{32} y en la transcripción de *dnaK* en un estrés calórico de 30 a 42°C (Straus *et al.*, 1987; Yura *et al.*, 1993).

según la cepa, es decir, un estrés de calor que para una cepa es fuerte o débil, puede no ser distinto para otra.

5.3 Efecto del estrés calórico en la división celular

La temperatura tiene un efecto profundo sobre la división celular en procariontes y eucariontes. Aunque haya diferencias en la división celular entre las bacterias, protistas y mamíferos, en todas estas células la temperatura induce la división sincrónica, ya que todas las células se afectan directamente por el calor (Pechan, 1991).

Las bacterias se dividen a intervalos constantes durante el crecimiento balanceado, es decir, cuando el crecimiento es directamente proporcional al tiempo. En cada división *E. coli* forma un septo transversal cerca del centro de la célula. La posición y el tiempo de formación de este septo es muy importante. Cada célula hija recibe completo el material genético (Smith y Pardee, 1970).

Las mutantes en el gen *rpoH* no pueden dividirse. A una temperatura de 20°C estas mutantes crecen un poco más lentas que el tipo silvestre y forman filamentos. A temperaturas altas aumenta la longitud promedio de los filamentos. La longitud celular se incrementa progresivamente con el tiempo de exposición a temperaturas altas. Por ejemplo, después de tres horas a 40°C el promedio celular es cuatro veces más largo que en el tipo silvestre. Esto confirma que *rpoH* participa en la división celular. En estas mutantes la síntesis de DNA se inhibe más temprano que la síntesis de proteínas. Esta inhibición puede explicar la formación de células alargadas a temperaturas altas (Zhou *et al.*, 1988).

Las mutantes *fam 715* tienen una mutación ámbar sensible a temperatura (*ts*) pleiotrópica que afecta la división celular. En esta mutante un incremento de temperatura no induce a los genes de estrés calórico, con la excepción del gen *lysU*. Estas mutantes complementan a mutantes en *rpoH* y producen recombinantes tipo silvestre, ya que *fam* es un alelo mutado de *rpoH*. Durante un estrés calórico de 28 a 42°C ambas mutantes crecen en filamentos. Las mutantes *fam* también producen bajas cantidades de la lipoproteína mureína. Es probable que el nivel bajo de lipoproteínas sea el responsable de los defectos en la división celular. Esto se apoya en que las mutantes en el gen estructural para las lipoproteínas LPP tienen defectos en la división celular (Tsuchido *et al.*, 1986).

Las mutantes *ts* de *dnaK*, *groEL* y *groES* forman filamentos a temperaturas altas. La filamentación puede deberse a la falta de inducción de una o más proteínas de estrés calórico. Estos filamentos no están septados, lo que indica que la división celular se bloquea en un estado temprano antes de la formación del septo. Hay varias mutaciones que afectan el proceso de división celular. Los genes que intervienen en ella están dispersos. Las

mutaciones letales en la división celular, a temperaturas altas, forman filamentos. A estos genes se les llama *fts* que se refiere a mutantes *ts*. Algunos *fts* están muy unidos a otros genes esenciales como el *rpoH* y el *dnam* que se relaciona con el desarrollo celular (Crickmore y Salmond, 1986). La sobreproducción de FtsX suprime la filamentación en estas mutantes. En el tipo silvestre se produce septaciones adicionales y se forman minicélulas (Yamamori et al., 1982). Las mutantes en los genes *htr* también producen filamentación a temperaturas mayores de 37°C (Raina et al., 1991; Raina y Georgopoulos, 1990).

En el caso de eucariontes como el ciliado *Stylonychia mytilus*, las células expuestas a un estrés calórico presentan generalmente un ciclo de división prolongado. Los organismos que crecen a 23°C y se exponen a una temperatura de 35°C muestran un arresto en la fase G₁ y S. El tiempo del retraso depende del estado en el cual se da el estrés calórico. Este retraso varía de tres a siete horas. Las fases G₂ y la fase temprana D₁ son aún más sensibles al estrés calórico. En la fase tardía D₂ las células no se afectan, sin embargo, las células hijas muestran un defecto en la división celular (Kaul, 1990). Otros eucariontes como *S. cerevisiae* muestran también un retraso en la división celular y presentan aberraciones morfológicas.

5.4 Efecto del estrés calórico en la metilación del DNA

La metilación de bases nitrogenadas del DNA es un fenómeno común en los seres vivos. En *E. coli* K12 se efectúa por tres sistemas que modifican aproximadamente el 2% de sus adeninas y el 1% de citosinas. Los tres sistemas son: el EcoK, el Dam y el Dcm.

El sistema EcoK se encuentra codificado en el minuto 99 del mapa genético. Consta de los genes *hsdR*, *hsdS* y *hsdM*. Este último es el gen que codifica para la metilasa HsdM. Esta enzima metila la segunda adenina de la secuencia AAC(6N)GTGC (Sain y Murray, 1980). El sistema Dam se codifica por el gen *dam* en el minuto 74. La metilasa Dam funciona como un monómero y metila la adenina de la secuencia 5' GATC 3' (Herman y Modrich, 1982). El sistema Dcm, al igual que el anterior también contiene un sólo gen llamado *dcm*. Este gen se localiza en el minuto 43 del mapa cromosómico y codifica para la proteína Dcm que es una metilasa de citosina. Esta proteína metila la citosina interna de la secuencia 5' CC(A/T)GG 3' (Bhagwat et al., 1990).

En nuestro laboratorio se estudió la metilación del DNA en cepas de *E. coli* que crecen a 30°C y se someten a un estrés calórico de 47°C. Estos estudios muestran que en las cepas C600 y C600 NaI^r (Bachman, 1972 y Bachman, 1987) el sistema de metilación Dam no se afecta, incluso durante un estrés prolongado. No sucede lo mismo con la metilación Dcm. En estas cepas la metilación Dcm se inhibe, pero después de cuatro horas el patrón de

metilación normal retorna. Esto indica que existe una dependencia de tiempo para la recuperación de la metilación. Es probable que durante este tiempo se acumule algo que ayuda a metilar, como por ejemplo una chaperona. Esto se fundamenta porque al transformar a la cepa C600 con el plásmido multicopia que tiene clonado a *groEL* y *groES* la inhibición de la metilación no se observa. (Ramírez-Santos, 1993). En otras cepas de *E. coli* como la W3110, la AB1157 (Kenion *et al.*, 1982) y la GM30 (Marinus y Morris, 1975) no hay inhibición de la metilación Dam ni Dcm.

En varios estudios realizados al transducir con el fago P1 al gen *dcm* de la cepa C600 a la cepa GM31, que es una cepa *dcm*⁻ la cepa transductante metila normalmente. Esto indica que la falta de metilación Dcm en las cepas C600 y C600 Nal^r no es debido a una metilasa Dcm sensible a temperatura. La termosensibilidad de la metilasa Dcm de la cepa C600 probablemente depende del fondo genético y del contexto celular en que se encuentra. Por lo tanto, es probable que la respuesta al estrés de calor sea distinta en diferentes cepas.

6.- TERMOSENSIBILIDAD DE *E. coli*

Termosensibilidad se refiere al comportamiento y capacidad de un ser vivo de crecer a una determinada temperatura. Es una característica genética intrínseca, particular de cada organismo. Por ejemplo, las células de mamífero que se derivan de animales cuya temperatura fisiológica es alta, son más resistentes al calor que las células que provienen de animales que crecen a temperaturas más bajas. En el caso de las bacterias, la termosensibilidad puede observarse por medio de densidad óptica al hacer curvas de crecimiento a diferentes temperaturas.

Las bacterias pueden crecer en un intervalo de temperatura de aproximadamente 40°C. *E. coli* es una bacteria típica mesófila con respecto a su temperatura de crecimiento. En cierto intervalo de crecimiento que se llama intervalo de Arrhenius muestra un crecimiento balanceado, es decir, el crecimiento es directamente proporcional a la temperatura. En una gráfica de temperatura y D.O. muestran un crecimiento de tipo sigmoide que define a una población con generaciones continuas y capacidad de carga (D.O. máxima alcanzada) (Krebs, 1985). La temperatura del crecimiento balanceado es de 10 a 49°C, aunque este depende de los nutrientes en el medio. La temperatura del crecimiento óptimo es de 20 a 37°C. El incremento de la temperatura arriba de 40°C o abajo de 20°C provoca progresivamente un crecimiento más lento. Finalmente, abajo de 9°C o arriba de 49°C el crecimiento cesa (Herendeen *et al.*, 1979; Ingraham, 1987).

Introducción

La máxima temperatura de crecimiento de *E. coli* se relaciona directamente con la capacidad para sintetizar HSPs. Las HSPs se requieren para el crecimiento a temperaturas altas (Straus *et al.*, 1990). Principalmente la cantidad de la proteína GroEL a temperaturas hasta 42 ó 45°C y a temperaturas más altas DnaK determinan la máxima temperatura de crecimiento (Zhou *et al.*, 1988). En mutantes incapaces de presentar la respuesta de estrés calórico el crecimiento se altera, no pueden crecer a temperaturas altas, crecen muy poco a 33°C y son muy inestables a 36°C.

En ausencia de metionina exógena, el crecimiento se suspende a los 45°C. Existe una diferencia en el crecimiento en un medio rico en nutrientes y un medio mínimo (Ron y Davis, 1971). Los antibióticos también afectan la temperatura de crecimiento. En presencia de kanamicina o tetraciclina la máxima temperatura de crecimiento es de 15°C. En presencia de ambos antibióticos no se observa el crecimiento a ninguna temperatura (Zhou *et al.*, 1988).

De acuerdo a los estudios realizados por Herendeen *et al.* (1979) en *E. coli* la máxima temperatura de crecimiento balanceado es de 49°C. Estos estudios fueron realizados en una sola cepa de *E. coli*, la B/r derivada de NC3. Esta cepa es protótrofa, es capaz de crecer rápidamente en medio mínimo, forma colonias lisas ante restricciones biosintéticas y nutricionales y presenta un sistema de restricción de DNA tipo B defectuoso (Neidhardt *et al.*, 1977). Esta línea celular es diferente de la línea K12, línea en la que se realizan muchos estudios sobre estrés calórico. Es muy probable que esta temperatura máxima de crecimiento sea particular de dicha cepa. A pesar de ello, no existen estudios sobre la termosensibilidad de las cepas que se emplean con mucha frecuencia en estudios del estrés calórico. Uno de los objetivos de este trabajo es, por lo tanto, estudiar la termosensibilidad de algunas cepas y relacionarla con la duración de la respuesta de estrés calórico.

OBJETIVOS E HIPOTESIS

Este trabajo tiene como objetivos principales estudiar la termosensibilidad de diferentes cepas de *Escherichia coli* K12, así como la duración e intensidad de la respuesta al estrés calórico en estas cepas. Como objetivos secundarios se planteó estudiar el efecto de la temperatura en la división celular e identificar si hay alguna relación entre la intensidad y duración de la respuesta al estrés calórico y la inhibición de la metilación de la segunda citosina en la secuencia 5'CC(A/T)GG 3' (metilación Dcm) del DNA en la cepa C600.

Para abordar estos objetivos, se propusieron las siguientes hipótesis:

1. El tiempo de duración del estrés calórico es más largo entre mayor es la diferencia entre la temperatura basal y la temperatura del estrés.
- 2.-Si existen diferencias en termosensibilidad, las cepas más termosensibles son las que tardan más en volver a un estado basal después de un estrés de calor.
3. La cepa C600 sintetiza una menor cantidad de la proteína de estrés calórico GroEL durante la respuesta al estrés calórico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se utilizó un diseño experimental que consiste en hacer curvas de crecimiento a 30, 42, 45 y 47°C en diferentes cepas de *E. coli* K12. Se eligieron 6 cepas: C600, C600 NaI^r, W3110, AB1157, GM30 y GM31. Estas cepas se utilizan frecuentemente en estudios de estrés calórico y también se emplearon en los experimentos de metilación del DNA que se llevaron a cabo. Además, se estudió el crecimiento de estas cepas durante un estrés de calor y se realizaron observaciones al microscopio de las células cultivadas a diferentes temperaturas o durante el estrés calórico. Para ver la duración del estrés calórico se realizaron cultivos a 30°C y se sometieron por diferentes tiempos a estrés calórico de 42, 45 y 47°C. Se analizó la inducción de las HSPs por marcaje radioactivo con [³⁵S]-L- Metionina. Estas proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en una dimensión, se visualizaron por autorradiografía y se realizó una densitometría de las autorradiografías para determinar la abundancia cuantitativa de cada proteína. Como control se tomaron cultivos a 30°C y a la respectiva temperatura de estrés. En la Figura 8 se muestra un esquema de esta estrategia.

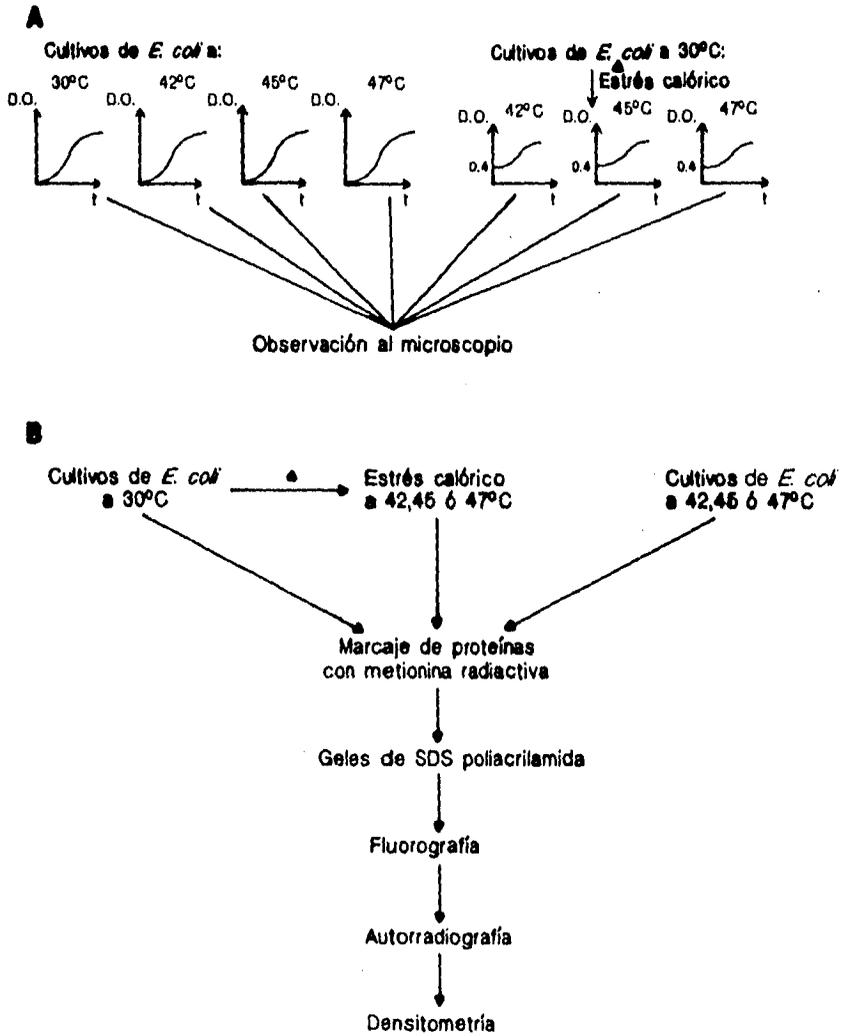


Figura 8. Estrategia experimental.

MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS BACTERIANAS

Se emplearon las cepas de *Escherichia coli* K12 que se indican en la Tabla III:

Tabla III. Cepas de *E. coli* que se emplearon en el presente trabajo.

Cepa	Fenotipo más importante	Referencia
W3110	F ⁻ Protótrofa, Lac ⁺	Bachman , 1972
C600	F ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Lac ⁻	Bachman , 1972
C600 Nal ^r	Como C600, pero Nal ^r	Hanahan , 1983
AB1157	F ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Lac ⁻ Arg ⁻ Sti ^r	Kenyonetal., 1986
GM30	F ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ His ⁻ Lac ⁻ Sti ^r	Marinus y Morris , 1975
GM31	Como GM30, pero Dcm ⁻	Marinus y Morris, 1975

2. CULTIVOS Y CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

Los cultivos bacterianos se hicieron a partir de un precultivo fresco. Este cultivo se preparó por inoculación de la cepa en un frasco con 3 ml de medio luria (LB), el cual se incubó sin agitación a 30°C de 12 a 18 horas.

Los cultivos bacterianos se iniciaron por inoculación del precultivo en medio LB. Para ello se utilizaron matraces nefelométricos de 125 ml con 10 ml de LB y 200 µl de precultivo. Se incubó con agitación constante a 180 rpm a diferentes temperaturas.

La conservación de las bacterias por períodos largos, se realizó en condiciones de microaerofilia. A partir de un cultivo en medio sólido, se sembró una muestra del césped bacteriano por piquete en un tubo (STAB), el cual se tapó y selló con parafina. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente en la obscuridad.

3. VERIFICACION DEL FENOTIPO

Para verificar el fenotipo, se sembraron colonias aisladas de cada cepa en medio Luria (LB) con palillos de madera estériles y se incubaron a 30°C de 14 a 18 horas.

Se duplicaron los parches por el método de réplica de placas (Miller, 1972), en los medios con los antibióticos y aminoácidos adecuados.

4. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para realizar las curvas de crecimiento los precultivos de cada cepa se vaciaron en tubos de ensaye de 8 ml. Se midió la densidad óptica a 550 nm (D₀ 550 nm) en un espectrofotómetro y cuando fue necesario se diluyó con medio LB para igualar la densidad celular de los precultivos. De cada precultivo se tomaron 200 µl para inocular 10 ml de medio LB en matraces nefelométricos como se mencionó. Los matraces se incubaron en baños con agua con agitación (New Brunswick Scientific modelo G76) a 180 rpm y temperaturas de 42, 45 y 47°C. La densidad óptica se midió cada media hora.

5. FOTOMICROGRAFIA DE CEPAS DE *E. coli* K12 EXPUESTAS A TEMPERATURA ALTA Y AL ESTRES CALORICO

Para evitar el movimiento de las células antes de fotografiarlas se mezclaron con agarosa fundida (concentración final 1%) y se vaciaron sobre laminillas de vidrio. De esta manera al enfriarse la agarosa, las células quedaron incluidas en ella. Las fotos se tomaron en un microscopio Carl Zeiss de contraste de fases con una cámara adaptable M35 y un controlador MC63A Carl Zeiss. Se utilizó una película Kodak Plus X-125 blanco y negro. Una vez que se obtuvo el contraste de fases y se enfocó la imagen, se colocó el botón selector de la sensibilidad de la película en el asa (din) correspondiente, en este caso asa 125 (22 din). De acuerdo con la cantidad de luz deseada se usó el botón selector de valores intermedios en -1, 1 y +1. Se extrajo la varilla para el prisma divisor de haces, ya que cuando esta introducida el 100% de la luz se desvía hacia el observador y al extraerla el 80% de la luz va hacia la cámara y el 20% hacia el observador. Se extrajo la corredera del chasis de la cámara, se oprimió el disparador del controlador, momento en el cual se encendió la lamparita piloto amarilla que señala que el tiempo de exposición se fija de manera automática. Cuando el botón se apagó se introdujo la corredera del chasis, se oprimió el disparador de la cámara, se sacó nuevamente la corredera del chasis y se corrió la película con el botón de rebobinado de la cámara. La película se reveló con el revelador y el fijador recomendados para la película Plus X-125.

6. MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEINAS

Con el objeto de marcar a las proteínas que sintetiza *E. coli* se empleó [³⁵S] - L-metionina (>100Ci/mmol) en concentración de 1000 µCi/ml de cultivo. Para realizar esto, se prepararon cultivos bacterianos en LB. Cuando llegaron a una D.O. de 0.4 (550 nm), se tomaron 0.5 ml de este cultivo y se colocaron en tubos de 1.5 ml a la temperatura deseada. Una vez que transcurrió el tiempo establecido, se agregó la marca radioactiva los últimos 5 minutos e inmediatamente después se agregó metionina fría en una proporción 100 veces más que la metionina marcada para competir con ésta y permitir el término de la síntesis de proteínas no completas. Los tubos se colocaron en hielo para detener la reacción y se centrifugaron en frío en una microcentrífuga a 14,000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 2 µl del inhibidor de proteasas PMSF y 20 µl de solución Laemmli. Esta última contiene un colorante guía para la electroforésis, glicerol, SDS y β- mercaptoetanol para evitar que se agreguen las proteínas. En algunas ocasiones la cantidad de solución Laemmli se modificó para igualar la concentración de proteínas (Tabla IV).

Tabla IV. Cantidad de solución Laemmli que se añadió para igualar la concentración de proteínas.

Tiempo (min)	42° C (μ l)	45° C (μ l)	47° C (μ l)
10	20	20	20
20	30	25	20
30	35	30	20
40	40	35	20
50	45	40	20
60	50	45	20

7. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Esta se efectuó según la técnica reportada por Laemmli (1970). El gel separador contenía 10% de acrilamida. Se añadió Tris HCl 1.5 M pH 8.8 y 0.1% SDS para desnaturalizar a las proteínas y minimizar sus cargas nativas. El gel se polimerizó químicamente por la adición de 0.025% de TEMED y persulfato de amonio 10 mM.

El gel concentrador se preparó con 3% de acrilamida y se le agregó Tris 0.5 M pH 6.8 y 0.1% de SDS y se polimerizó de igual forma que el gel separador.

Los geles se montaron en cámaras para electroforesis verticales Mini-Protean (Bio-Rad). Para desnaturalizar a las proteínas, previamente se incubaron en baño maría por cinco minutos. Los carriles en el gel concentrador se cargaron con 7 μ l de muestra. La electroforesis se corrió con el amortiguador de corrida Laemmli a 70 Voltios para el gel concentrador y 150 a 170 Voltios para el gel separador.

Para tener una mayor resolución al realizar un Western blot, se utilizó una cámara Bio-Rad modelo 220 con separadores medianos de 1.5 mm. Se colocaron 10 μ l de muestra por pozo. El gel concentrador se corrió a 50 Volts y el separador a 120 Voltios.

8. TINCION DE PROTEINAS CON AZUL DE COOMASIE Y NITRATO DE PLATA

Las proteínas que se corrieron electroforeticamente, se tiñeron una hora a 37°C con azul brillante de Coomasie al 0.1%. Los geles se destiñeron lavando con ácido acético al 10% por varias horas. El gel se continuó destiñendo con las soluciones A y B (30 minutos con cada una). Para completar la destinción se sumergió en la solución C a 4°C y se enjuagó con agua cinco minutos. Esto último se repitió cuatro veces. El gel se tiñó con plata 20 minutos. Se lavó cinco minutos en agua y se reveló hasta la intensidad deseada. En el caso de no visualizar las bandas, se añadió formaldehído gota a gota. La reacción se detuvo con la solución de frenado. Todos los pasos anteriores se realizaron en agitación constante.

9. DETECCION DE PROTEINAS RADIOMARCADAS POR FLUOROGRAFIA Y AUTORRADIOGRAFIA

Para mejorar la intensidad de las imagenes autoradiográficas, los geles se trataron con la técnica de fluorografía siguiendo el protocolo de Bonner y Laskey (1974). Para deshidratar los geles se embebieron en DMSO durante una hora con cambios de media hora. Después se impregnaron con líquido de centelleo. Finalmente, para remover el DMSO se sumergieron en agua dos horas como mínimo con varios cambios y finalmente se incubaron en una solución de glicerol al 3% para mantenerlos flexibles y permitir el proceso de secado.

Los geles se secaron previamente entre papel celofán suave sobre papel filtro Whatman en una plancha secadora de geles Bio-Rad y se expusieron a una placa de rayos X Kodak X-Omat dentro de un cassette de exposición de 7 a 14 días a -70°C . Las placas se revelaron en la oscuridad con luz roja con revelador fotográfico, se enjuagaron en agua corriente y se trataron con fijador fotográfico. La autoradiografía resultante se analizó por medio de un lector de placas Gel Scan LX controlado por computadora.

10. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE UN GEL A UN FILTRO E IDENTIFICACION DE PROTEINAS ESPECIFICAS CON ANTICUERPOS (WESTERN BLOTTING)

Para transferir las proteínas de geles de poliacrilamida-SDS a soportes sólidos (papel de nitrocelulosa) y detectar inmunológicamente las proteínas inmovilizadas (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979), se realizó una electroforesis según Laemmli (1970). Se prepararon dos geles: uno para control de cantidad de proteínas y peso molecular, otro para la transferencia. Inmediatamente concluida la electroforesis, el gel control se trató normalmente para la tinción de proteínas. El gel para la transferencia se sumergió en amortiguador de transferencia a 4°C toda la noche. Se cortó el filtro de nitrocelulosa de $0.45\ \mu\text{m}$ y el papel Whatman, ambos $0.5\ \text{cm}$ más grandes que el gel. Se embebieron en el amortiguador de transferencia junto con un tapete poroso (esponja). Se ensambló el dispositivo de transferencia evitando la formación de burbujas, en una cámara de transferencia modelo Idea Scientific Genie en el siguiente orden: el cátodo, la rejilla, el tapete poroso, el papel Whatman, el gel, el papel de nitrocelulosa previamente señalado, y nuevamente el papel Whatman, el tapete poroso y por último el ánodo. Se llenó la cámara con el amortiguador de corrida y se conectó a la fuente de poder. Se aplicó una corriente de 25 Voltios durante dos horas, sin permitir que la corriente excediera a 1 Amperio.

Material y Métodos

El papel de nitrocelulosa se bloqueó con BSA a 4°C toda la noche. Se lavó con PBS-Tween por cinco minutos en tres ocasiones con agitación constante. Se sumergió en una solución con el anticuerpo antiGroEL diluido 1:500 en PBS-Tween y se incubó por cinco horas a temperatura ambiente con agitación rotativa. Transcurrido este tiempo, el papel se incubó con la solución de la proteína A-Biotina diluida en 1:500 en PBS-Tween una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se sumergió en la solución con el conjugado Estreptavidina-Peroxidasa en PBS-Tween en una dilución 1:500 durante 30 minutos. Esto último se realizó en la oscuridad para evitar la degradación de la peroxidasa. El papel se lavó nuevamente durante cinco minutos en cada cambio, una vez en PBS-Tween y dos veces sólo en PBS, ya que el Tween inhibe al sustrato para la peroxidasa. En seguida, el papel se incubó en la oscuridad con la solución reveladora (sustrato para la peroxidasa) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se enjuagó con agua corriente varias veces y se secó entre papel Whatman.

RESULTADOS

1. TERMOSENSIBILIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE *E. coli* K12

La termosensibilidad es una característica genética intrínseca de los organismos. Se puede definir como la capacidad de un organismo para crecer en un intervalo determinado de temperatura. Una manera sencilla de estudiar la termosensibilidad en bacterias, es realizar curvas de crecimiento de éstas a diferentes temperaturas y determinar la D.O. que es una forma indirecta de medir el crecimiento.

En estudios de estrés calórico se han utilizado diferentes cepas, sin embargo, no se ha determinado si las cepas que se usan en estos estudios tienen igual termosensibilidad. Para observar si existen diferencias en la termosensibilidad de las cepas de *E. coli* K12 se seleccionaron seis cepas diferentes: C600, C600 Nal^r , W3110, AB1157, GM30 y GM31. Estas seis cepas se han utilizado por diferentes grupos de investigación en estudios de estrés calórico. Se incluyen dos cepas (C600 y C600 Nal^r) que se estudiaron en el laboratorio, en las cuales se encontró que en un estrés calórico de 47° C se inhibe la metilación Dcm. La W3110 es una cepa silvestre, protótrofa; la GM30 y GM31 son isogénicas, cuya diferencia es que la segunda tiene mutado el gen *dcm*. La cepa AB1157 es una cepa de referencia que se usa para estudios sobre estrés calórico en diferentes laboratorios.

Así se estudió el crecimiento de estas cepas a 30, 42, 45, 47°C. La temperatura de 30°C se eligió porque es una temperatura de crecimiento que se encuentra a la mitad del intervalo de temperatura donde el crecimiento de *E. coli* es balanceado (21 a 37°C). Las temperaturas de 42, 45 y 47°C se seleccionaron porque en los experimentos de estrés calórico estas temperaturas producen diferente intensidad de la respuesta a estrés calórico. El estrés que se induce al cambiar células de 30 a 42°C es un estrés débil, de 30 a 45°C se produce un

estrés de intensidad media y a 30 a 47°C, que es una temperatura subletal, se produce un estrés fuerte. A esta última temperatura se realizaron los estudios de metilación del DNA porque es lo suficientemente alta para producir un estrés fuerte, pero sin ser letal, como lo es 50°C. Estas cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB que es un medio rico (ver Apéndice). Para ello se inoculó la misma cantidad en todas las cepas de un cultivo previo de bacterias de una noche antes (cultivo "overnight" o precultivo).

A 30°C, las cepas mostraron una curva de crecimiento sigmoide que describe a una población de generaciones continuas con capacidad de carga equivalente a la D.O. máxima alcanzada. Lo anterior se refiere a un crecimiento que inicia lentamente, pero que después tiene una fase exponencial, en la que el crecimiento es lineal con respecto al tiempo. El cultivo alcanza después una fase estacionaria, en la cual el crecimiento es casi nulo. A 30°C no se detectaron diferencias importantes entre las seis cepas utilizadas (Fig. 9). Estas mismas cepas se cultivaron a 42°C (Fig. 10). A esta temperatura tampoco se encontraron diferencias en las curvas de crecimiento, es decir, todas las cepas tuvieron una termosensibilidad similar. En estas condiciones todas las cepas crecieron a mayor velocidad que a 30°C. Posteriormente las cepas se cultivaron a 45°C (Fig. 11). A esta temperatura las cepas sí presentaron una diferencia pequeña en la velocidad del crecimiento. Las curvas comenzaron a separarse entre sí y se observó, en la mayoría de las ocasiones, una tendencia de las cepas C600, W3110 y C600 NaI^f a crecer un poco más rápido que la AB1157, GM30 y GM31. Finalmente las cepas se cultivaron a 47°C (Fig. 12). A esta temperatura sí hubo diferencias claras en el crecimiento. Se identificaron dos grupos, el grupo de las cepas termorresistentes: C600, C600 NaI^f y W3110, y el grupo de las cepas termosensibles: AB1157, GM30 y GM31. Las cepas C600 y W3110 crecieron más y a mayor velocidad que el resto de las cepas, ya que aunque la temperatura afectó el crecimiento al disminuir la velocidad y el crecimiento máximo, las cepas alcanzaron una D.O. final de 1.1. La C600 NaI^f se comportó de manera intermedia y aunque creció más lentamente siempre alcanzó una D.O. mayor de 0.6. Sin embargo, en las cepas AB1157, GM30 y GM31 la temperatura alteró el crecimiento de una forma más notable. La Figura 13 es una gráfica representativa del comportamiento de dos cepas (C600 y GM30) a 30 y 47°C. En algunas ocasiones, la GM30 fue un poco más termosensible que la AB1157, pero en general estas cepas no alcanzaron una D.O. de 0.4, lo que significa que su crecimiento fue escaso. En esta Figura se presenta el comportamiento de una de las cepas más termosensibles (GM30) y una de las menos termosensibles (C600). Se puede apreciar que el crecimiento a 30°C de las dos cepas es muy similar, mientras que el crecimiento a 47°C se afecta mucho en algunas cepas como en la GM30 y escasamente en otras como en la C600.

En resumen, a 30 y 42°C la termosensibilidad de seis diferentes cepas de *E. coli* K12 es similar. A temperaturas más elevadas como 45°C empiezan a observarse diferencias y a 47°C que es una temperatura subletal, las diferencias se hacen más notables. A 47°C pueden

Resultados

definirse dos grupos de cepas: un grupo termorresistente (C600, C600 NaI^r y W3110) y otro termosensible (AB1157, GM30 y GM31).

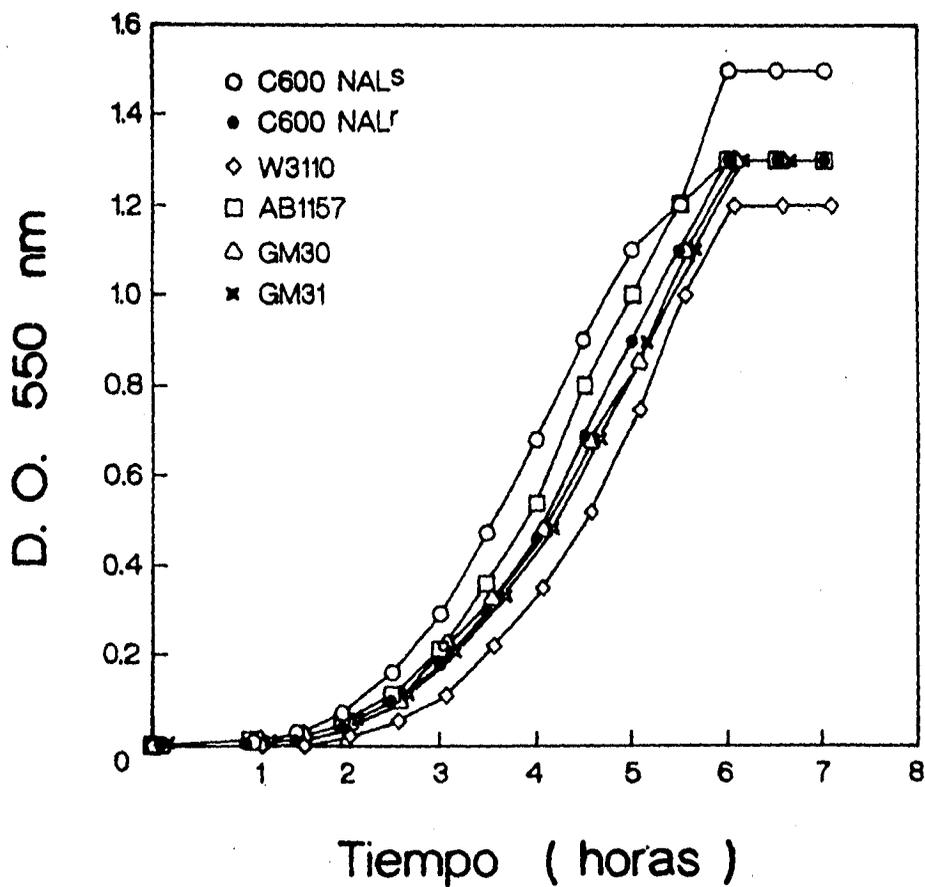


Figura 9. Crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* K12 a 30°C en medio LB.

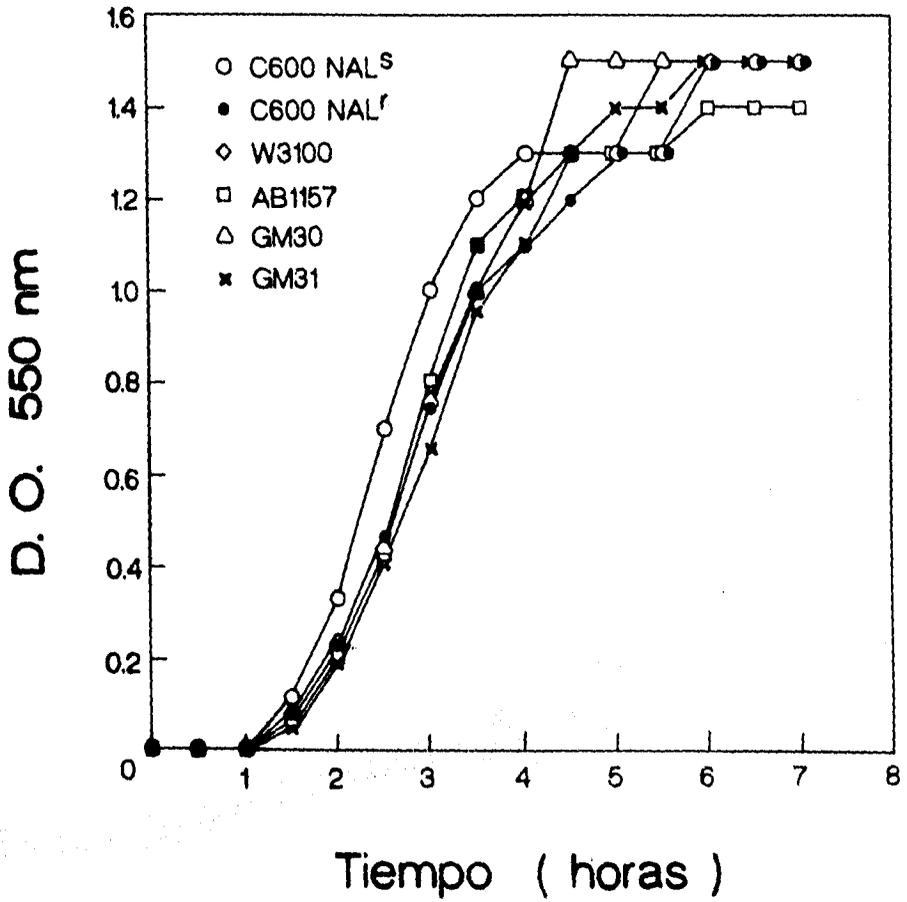


Figura 10. Crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* K12 a 42°C en medio LB.

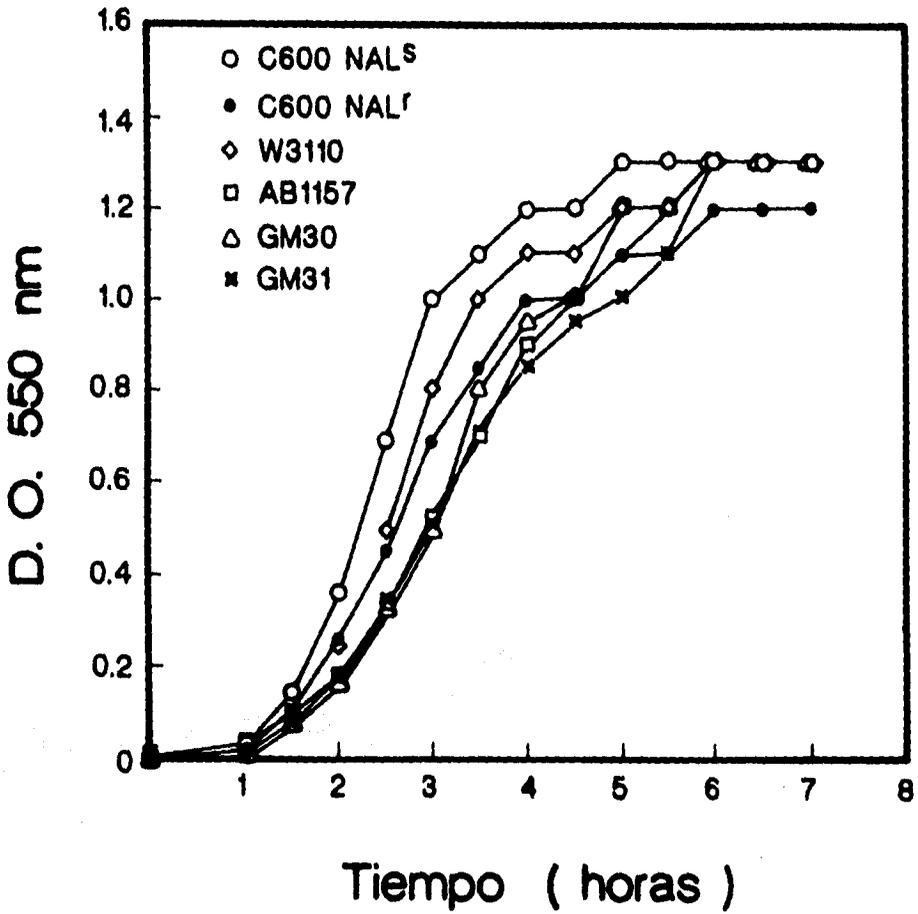


Figura 11. Crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* K12 a 45°C en medio LB.

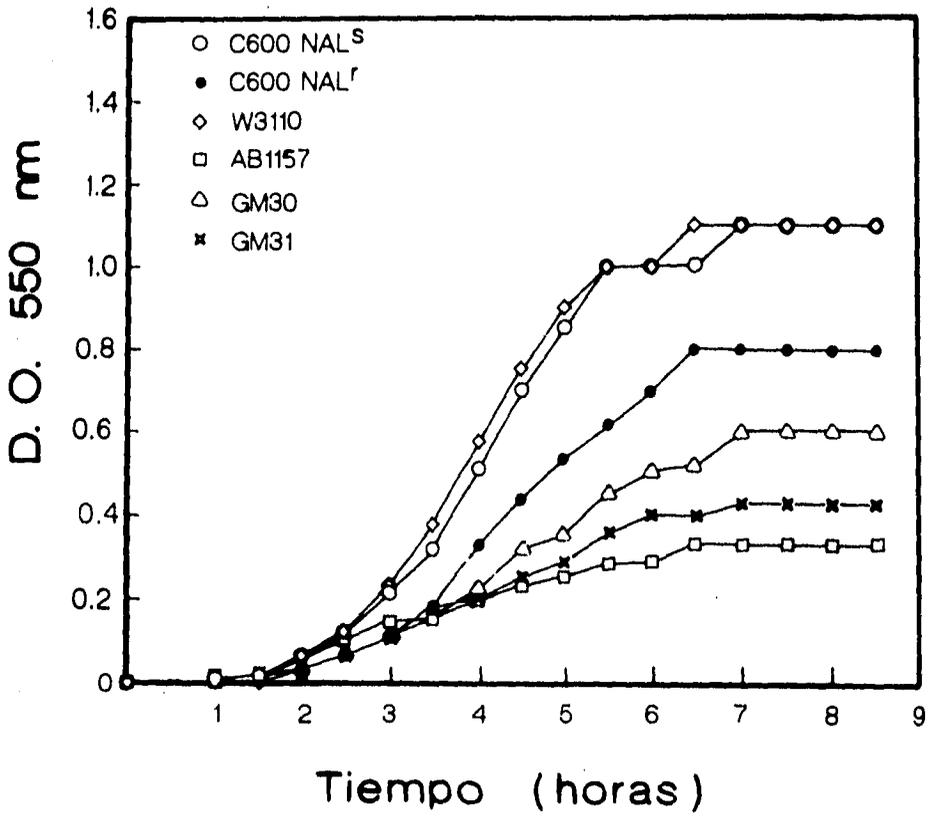


Figura 12. Crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* K12 a 47°C en medio LB.

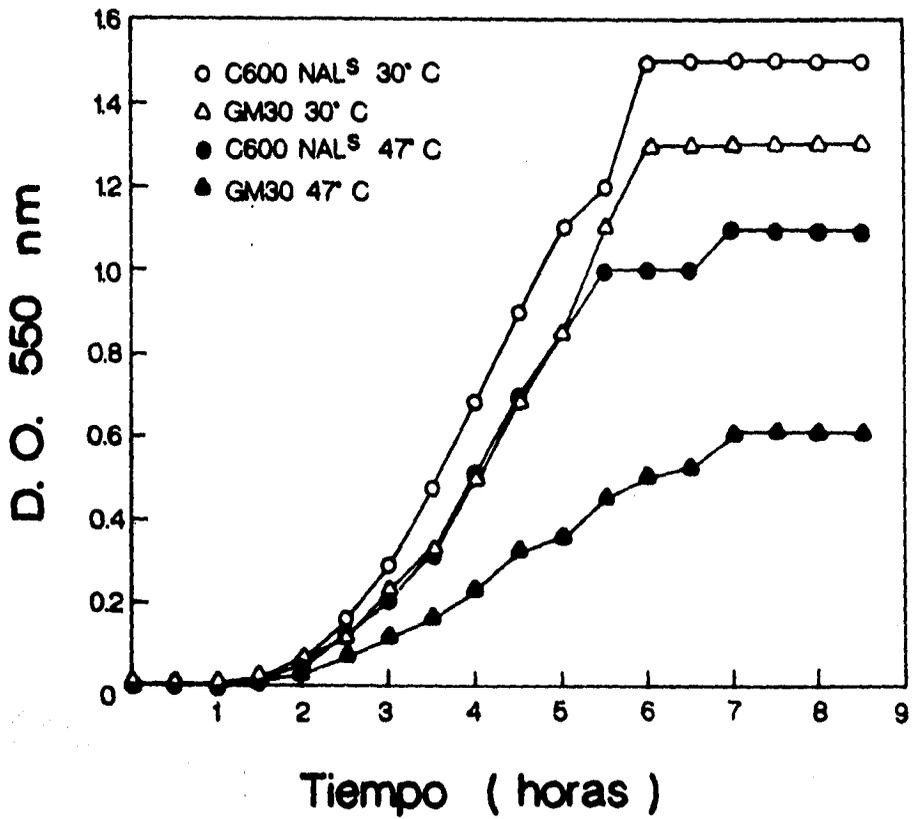


Figura 13. Comparación del crecimiento a 30°C y a 47°C de dos cepas de *E. coli* con diferente termosensibilidad.

2. RESPUESTA AL ESTRÉS CALÓRICO DE DIFERENTES CEPAS DE *E. coli* K12

Debido a que a 47° C las cepas mostraron diferente termosensibilidad y se observó un grupo de cepas termorresistentes y otro de cepas termosensibles, también se estudió cómo es el crecimiento de *E. coli* K12 durante un estrés calórico, es decir, cómo responden las células a un cambio repentino de temperatura. Para ello, las células se cultivaron a 30° C y al llegar a una D.O. de 0.4, que es la mitad de la fase logarítmica, se expusieron a una temperatura más alta. Se eligió una de las cepas termosensibles (GM30) y dos de las termorresistentes (C600 y W3110). Se seleccionó a la cepa C600 y no a la C600 Nal^r, ya que esta última presenta una mutación en el gen de girasa, lo cual podría afectar los resultados. También se escogió a la W3110 porque presentó una termosensibilidad similar a la C600, pero su comportamiento en la metilación del DNA a 47° C es diferente a ésta (Ramírez- Santos, 1993).

Durante un estrés calórico a 42° C, aunque las cepas crecieron de manera similar, se observaron pequeñas diferencias (Fig.14). La cepa C600 fue la cepa que creció mejor ante el cambio de temperatura. Las cepas W3110 y GM30 se comportaron de manera similar. En la W3110 el cambio de temperatura provocó un crecimiento un poco más lento y una disminución de la capacidad de carga de la población. Al exponer a las células a estrés calórico mayor (45 ó 47° C) las diferencias anteriores se hicieron más notables (Figs. 15 y 16). Nuevamente la cepa C600 creció mejor al cambio de temperatura. Las cepas GM30 y W3110 disminuyeron su capacidad de carga. De manera general, la cepa C600 respondió de manera similar a una temperatura alta constante y a la exposición repentina a una temperatura elevada. La W3110, por su parte, respondió mejor a una temperatura elevada constante que a un estrés calórico. La GM30, por el contrario, creció mejor durante estrés calórico que a temperatura elevada constante (Figs. 10-12 y 15-16).

Con base en lo anterior, puede concluirse que no existe una correlación entre el patrón de termosensibilidad y la respuesta de crecimiento al estrés calórico, esto es, las cepas con termosensibilidad similar como C600 y W3110, respondieron de manera diferente al estrés calórico. Además, una cepa termorresistente y una termosensible pueden tener un crecimiento similar durante la respuesta a un estrés calórico.

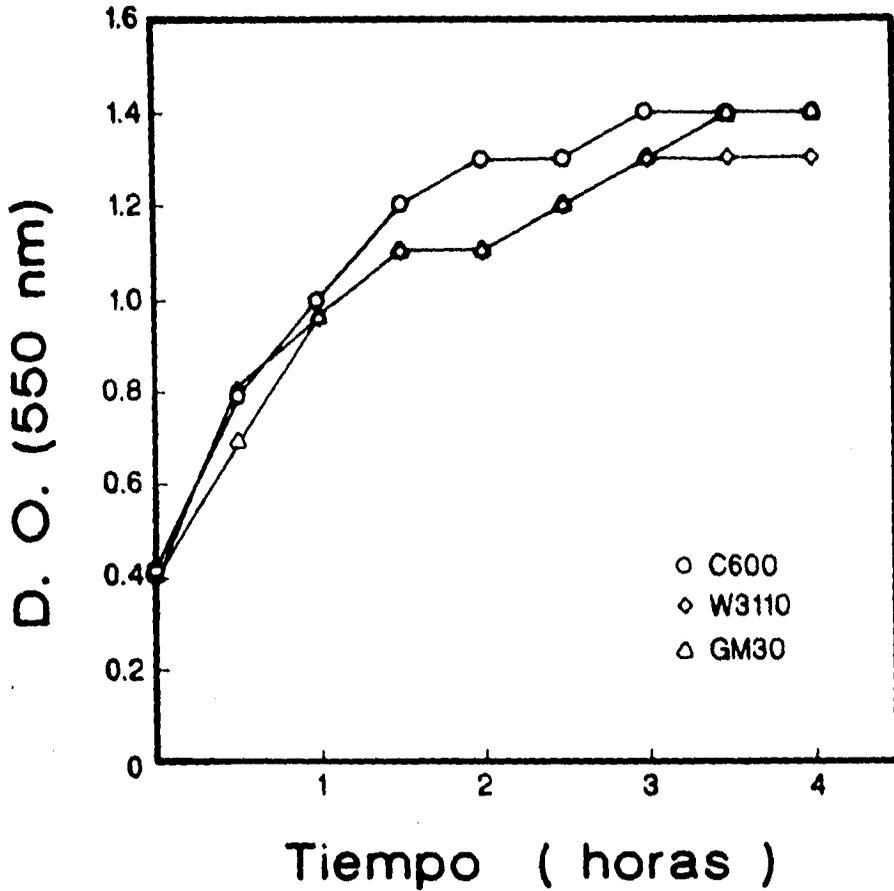


Figura 14. Crecimiento durante estrés calórico de diferentes cepas de *E. coli* K12. Las células se crecieron a 30° y al llegar a una D.O. de 0.4 (550 nm. de absorbencia) se expusieron rápidamente a 42°C.

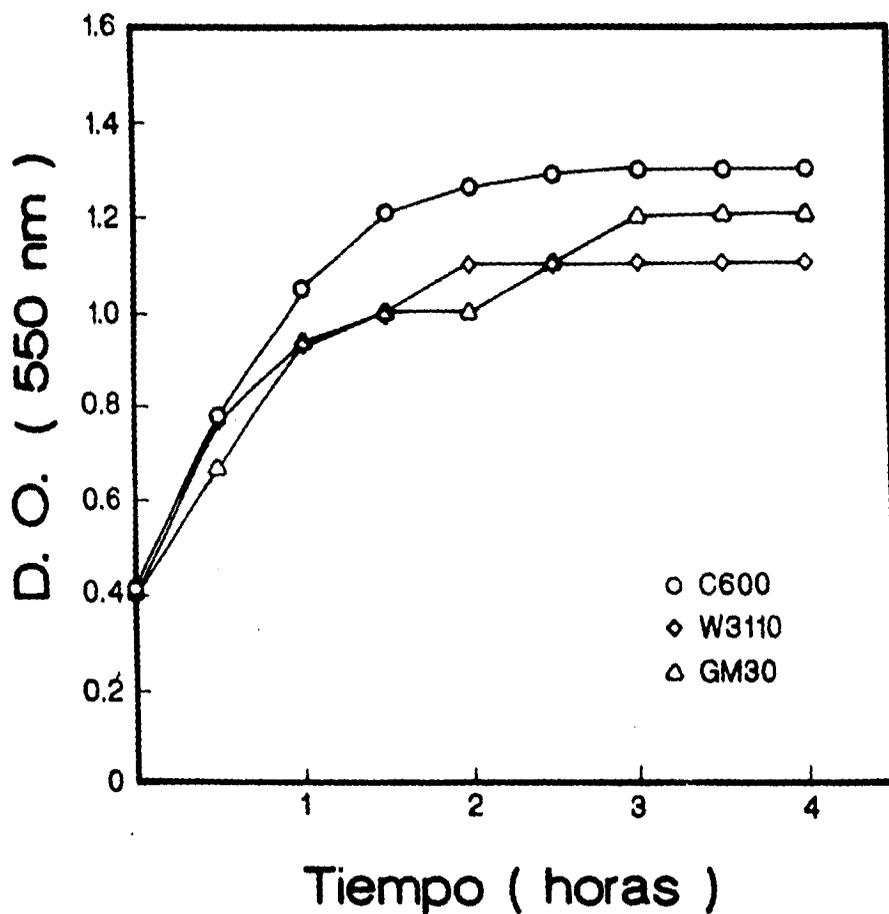


Figura 15. Crecimiento durante estrés calórico de diferentes cepas de *E. coli* K12. Las células se crecieron a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 (550 nm. de absorbencia) se expusieron rápidamente a 45°C.

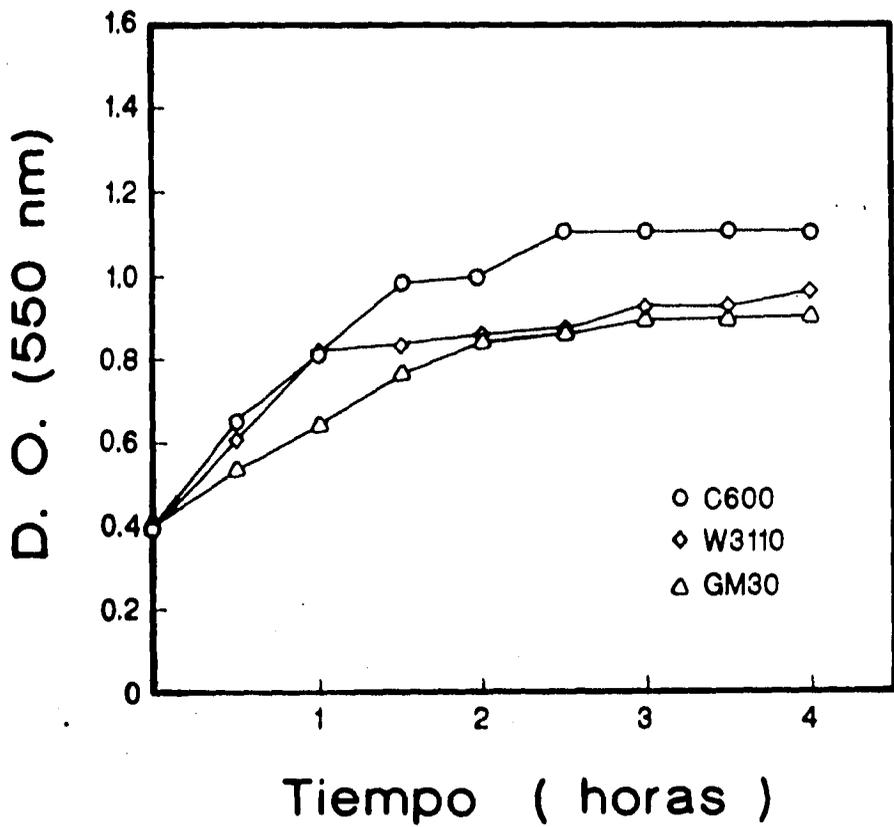


Figura 16. Crecimiento durante estrés calórico de diferentes cepas de *E. coli* K12. Las células se crecieron a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 (550 nm. de absorbencia) se expusieron rápidamente a 47°C.

3. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DIVISION CELULAR EN *E. coli* K12

Se sabe que algunas cepas con mutaciones en el gen *rpoH* y en los genes *dnaK*, *groEL* y *groES* forman filamentos a temperaturas altas (Tsuchido *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 1988). Esta filamentación se debe a una alteración en la división celular. Debido a esto, se planteó analizar si la temperatura de cultivo afecta la división celular. Esta pregunta surgió porque es probable que la respuesta a estrés calórico sea una respuesta adaptativa para resistir a las temperaturas altas. Así, es posible que las cepas termosensibles tengan una respuesta de estrés calórico deficiente y sean menores las cantidades de HSPs que sintetizan. Esto a su vez podría afectar la división celular y provocar la formación de filamentos.

Para observar si existe una correlación entre la división celular y la termosensibilidad de las células, se hicieron observaciones al microscopio de dos cepas termorresistentes (C600 y C600 Nal^r) y una termosensible (GM30) cultivadas en distintas temperaturas. Primero se observó el comportamiento de las células expuestas constantemente a 47°C. En la Figura 17 A, B y C se observan las cepas C600, C600 Nal^r y GM30 a una D.O. de 0.4 cultivadas constantemente a 30°C. A esta temperatura no se observó ninguna diferencia en el tamaño de las células. Las letras A, B y C corresponden a las mismas cepas, pero expuestas a una temperatura constante de 47°C. En esta temperatura si se observaron diferencias. Las células de C600 (Fig. 17 A') al exponerse a una temperatura elevada se hicieron más pequeñas, mientras que la cepa C600 Nal^r (Fig. 17 B') tendió a formar filamentos. La GM30 (Fig. 17 C'), aunque formó algunos filamentos, estos fueron pocos en relación a la C600 Nal^r.

Se estudió también la filamentación de las células en un estrés calórico de 47°C (Fig. 18). Para esto se cultivaron las células a 30°C a una D.O. de 0.4 y después se cambiaron repentinamente a 47°C. Las letras A, B y C corresponden a las cepas C600, C600 Nal^r y GM30, respectivamente, a una D.O. de 0.4 a 30°C antes del cambio de temperatura. Las letras A', B' y C' corresponden a las mismas cepas a 47°C dos horas después del cambio. En las cepas C600 y GM30 se observan células similares como en 30°C (comparar Figura 18 A y C con A' y C'); sin embargo, en la cepa C600 Nal^r se observa una filamentación de las células. Estas observaciones se hicieron cada media hora durante dos horas (datos no mostrados). En el caso de la cepa C600 Nal^r a medida que pasó el tiempo los filamentos se hicieron más largos (Fig. 18 B').

De acuerdo a lo anterior, no se observó una relación clara entre termosensibilidad y filamentación. Esta relación no ocurre ni durante exposiciones constantes ni en cambios repentinos de temperatura. La filamentación de la cepa C600 Nal^r puede deberse a que esta cepa presenta una mutación en el gen *gyrA* que le confiere resistencia al ácido nalidíxico, más que a la respuesta propia del estrés calórico.

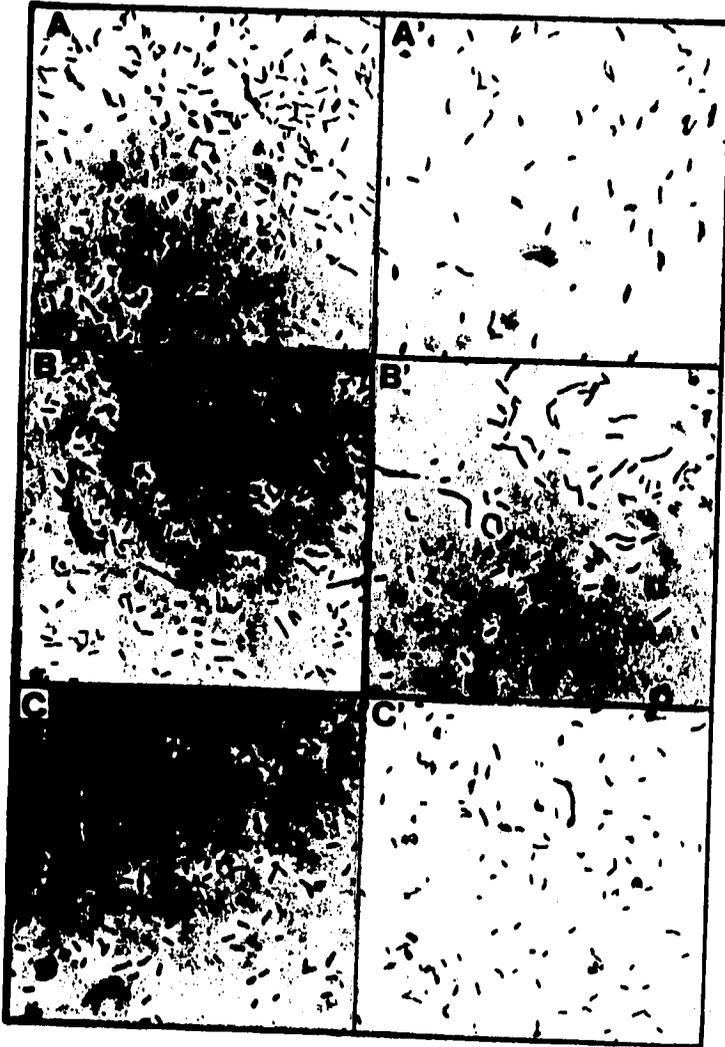


Figura 17. Fotomicrografía de células de *E. coli* K12 a 30°C cultivadas constantemente a 30°C y a 47°C a una D.O. de 0.4 (550 nm. de absorbencia). (A,B y C) Cepas C600, C600 Nal^r y GM30, respectivamente, a 30°C. (A', B' y C') Las mismas cepas a 47°C.



Figura 18. Fotomicrografía de células de *E. coli* K12 a 30°C y dos horas después del estrés calórico a 47°C. Las cepas fueron cultivadas constantemente a 30°C a una D.O. de 0.4 (550 nm. de absorbencia) (A, B y C) y sometidas repentinamente a 47°C por dos horas (A', B' y C'). (A, A') Cepa C600. (B, B') Cepa C600 Nal^r. (C, C') Cepa GM30.

4. INTENSIDAD Y DURACION DE LA RESPUESTA A ESTRES CALORICO EN CEPAS CON DIFERENTE TERMOSENSIBILIDAD

El estrés calórico representa posiblemente una respuesta celular adaptativa. Por esta razón, las cepas que se comportan de manera diferente a una temperatura alta constante o a un cambio repentino a una temperatura alta podrían tener un estrés calórico diferente en intensidad y/o duración. Es probable que las cepas termosensibles sean las que tardan más en volver a su estado basal después de un estrés de calor. Por otra parte, se sabe que el estrés calórico de 28 y 30 a 42°C es un estrés débil que dura de 20 a 30 minutos (Yamamori y Yura, 1982). Asimismo, el estrés de 50°C, que es una temperatura letal, es un estrés muy fuerte del cual la célula no se recupera, sino que continúa hasta que esta muere. Esto sugiere que el tiempo de duración del estrés calórico puede ser más largo entre mayor es el incremento entre la temperatura basal y la temperatura de estrés. Sin embargo, no existen estudios acerca de esto último en cepas con distinta termosensibilidad a temperaturas de 42, 45 y 47°C.

En adición a lo anterior, se sabe que particularmente en la cepa C600 durante un estrés calórico de 47°C se inhibe la metilación Dcm y no la metilación Dam del DNA; pero después de 4 horas esta cepa recupera su metilación normal. Esta cepa con el plásmido multicopia que tiene clonados los genes que codifican para las proteínas GroES y GroEL no muestra inhibición de la metilación. Considerando que GroEL es una chaperonina molecular (Georgopoulos *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1992), estos datos sugieren que GroEL tiene actividad de chaperonina sobre la metilasa Dcm. Por lo tanto, es posible que la cepa C600 tenga una respuesta al estrés calórico de menor duración e intensidad que otras cepas, de forma que esta cepa sintetice una menor cantidad de HSPs como GroEL y sea ésta la causa de la pérdida de metilación del DNA. Para realizar estos estudios de intensidad y duración del estrés calórico se seleccionó a una de las cepas termosensibles que metila normalmente: GM30, y a otra de las termorresistentes que durante un estrés de 47°C pierde la metilación Dcm del DNA: C600. En ocasiones se usó a la cepa W3110 que también pertenece al grupo de las cepas termorresistentes, pero no deja de metilar su DNA.

Para caracterizar la duración de la respuesta a estrés calórico se hicieron experimentos con marcaje radioactivo de las proteínas que se sintetizaron a tiempos diferentes del inicio del estrés de calor. Las proteínas se marcaron con [³²S]- L- metionina y se separaron por electroforesis en geles de acrilamida en una dimensión y se visualizaron por autorradiografía. Para igualar la cantidad de proteínas cargadas en los geles, éstas se tificaron antes de la autorradiografía. Cuando se requirió se corrió un segundo gel para corregir la concentración de proteínas en cada carril (Tabla IV).

Resultados

La parte superior de la mayoría de las figuras corresponde a las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida teñidas con azul de Coomassie. Esto ayudó a interpretar correctamente las autorradiografías al evitar que el aumento o disminución de una proteína en una autorradiografía fuera por diferente concentración de proteínas y no por diferente inducción.

En los análisis electroforéticos en geles unidimensionales, la respuesta al estrés calórico se puede seguir por la presencia de algunas proteínas mayoritarias del regulón σ^{32} . Estas proteínas son una proteína de 90 kDa., DnaK y GroEL. Como controles, en casi todos los experimentos se marcaron proteínas a temperatura constante de no estrés (30°C) y a la temperatura constante del estrés calórico estudiado (42, 45 y 47°C). Esto se realizó para comparar las proteínas sintetizadas en condiciones fisiológicas (sin estrés calórico) con las que se sintetizan cuando la célula se somete a un estrés calórico del cual ya salió. En estas últimas condiciones se sintetiza un nuevo patrón de proteínas que es distinto al de 30°C y al de estrés calórico. También se comparó con la síntesis de proteínas de 5 a 10 minutos después del cambio de temperatura de 30 a 42, 45 ó 47°C, debido a que durante este tiempo se observa el incremento máximo en la síntesis de HSPs.

4.1 Estrés calórico a 42°C

En un estrés calórico de 30 a 42°C se observó un incremento en la síntesis de HSPs y además un incremento de las proteínas en general. De acuerdo con lo reportado, la respuesta dura de 20 a 30 minutos. En los experimentos que se realizaron con la cepa C600 se observó la respuesta al estrés calórico a los 10 y 20 minutos (Fig. 19 B, carriles 2 y 3). A los 30 minutos se observó que la proteína de 90kDa. (marcada \rightarrow) empezó a disminuir (Fig. 19 D, carril 2). A los 40 minutos DnaK también empezó a reducirse (Fig. 19 D, carril 3). Sin embargo, la respuesta se apagó al minuto 50 donde los niveles de GroEL disminuyeron notablemente (Fig. 20 B, carril 4). En la cepa GM30 la síntesis de HSPs continuó a los 20 minutos (Fig. 21 B, carril 3); esta empezó a declinar gradualmente a los 30 y 40 minutos (Fig. 20 B carril 4 y 5). Finalmente el terceto disminuyó significativamente a los 50 minutos (Fig. 21 B carril 6). En la parte inferior de las Figuras 19 a 21 se muestran las autorradiografías correspondientes a las condiciones de estrés. En la parte superior de estas se muestran las fotografías de los geles teñidos con azul de Coomassie, donde se puede observar que las concentraciones de éstas son similares.

La gráfica de la Figura 22 muestra un resumen de los datos anteriores. Esta gráfica se obtuvo al analizar las autorradiografías de las Figuras 18 a 20 con un lector de placas. En estas autorradiografías se realizaron barridos densitométricos que se integraron y se obtuvo el área bajo la curva (U de absorbencia/ mm) de los picos correspondientes a las proteínas

Resultados

DnaK y GroEL. El incremento relativo de DnaK y GroEL se obtuvo al calcular el cociente de la síntesis de estas proteínas después de ciertos tiempos de la inducción del estrés calórico a 42°C (A_t) y la basal correspondiente a 30°C (A₃₀). La Figura 22 A, que corresponde a C600, muestra que a los 10 minutos de iniciado el estrés calórico, la síntesis de DnaK y GroEL aumentó de 6 a 7 y de 10 a 12 veces, respectivamente. A partir de este tiempo, la síntesis empezó a disminuir gradualmente y finalmente a los 50 minutos para ambas proteínas llegó a su estado basal e incluso disminuyó aún más. En el caso de la cepa GM30 (Fig. 22 B) GroEL aumentó casi tres veces a los 10 minutos, alcanzó su pico máximo a los 20 minutos y declinó paulatinamente para casi desaparecer a los 60 minutos. DnaK aumentó y declinó a los mismos tiempos, pero su incremento máximo fue menor de dos veces. En virtud de que ambas gráficas corresponden a experimentos separados, los datos obtenidos no permiten comparar directamente a las cepas que se utilizaron entre sí.

De acuerdo con lo anterior, bajo nuestras condiciones experimentales, la respuesta al estrés calórico en lo que se refiere a la síntesis de proteínas, alcanzó su pico máximo en la cepa C600 a los 10 minutos y en la GM30 a los 20 minutos. En este tiempo dicha síntesis empezó a disminuir gradualmente y entre los 50 y 60 minutos disminuyó casi totalmente, sin existir diferencias en función de la termosensibilidad de las cepas. Sin embargo, mientras que en la cepa C600 (termorresistente) el nivel de síntesis a los 50 minutos es semejante que al tiempo cero, en la GM30 (termosensible) este nivel es claramente inferior al del tiempo cero.

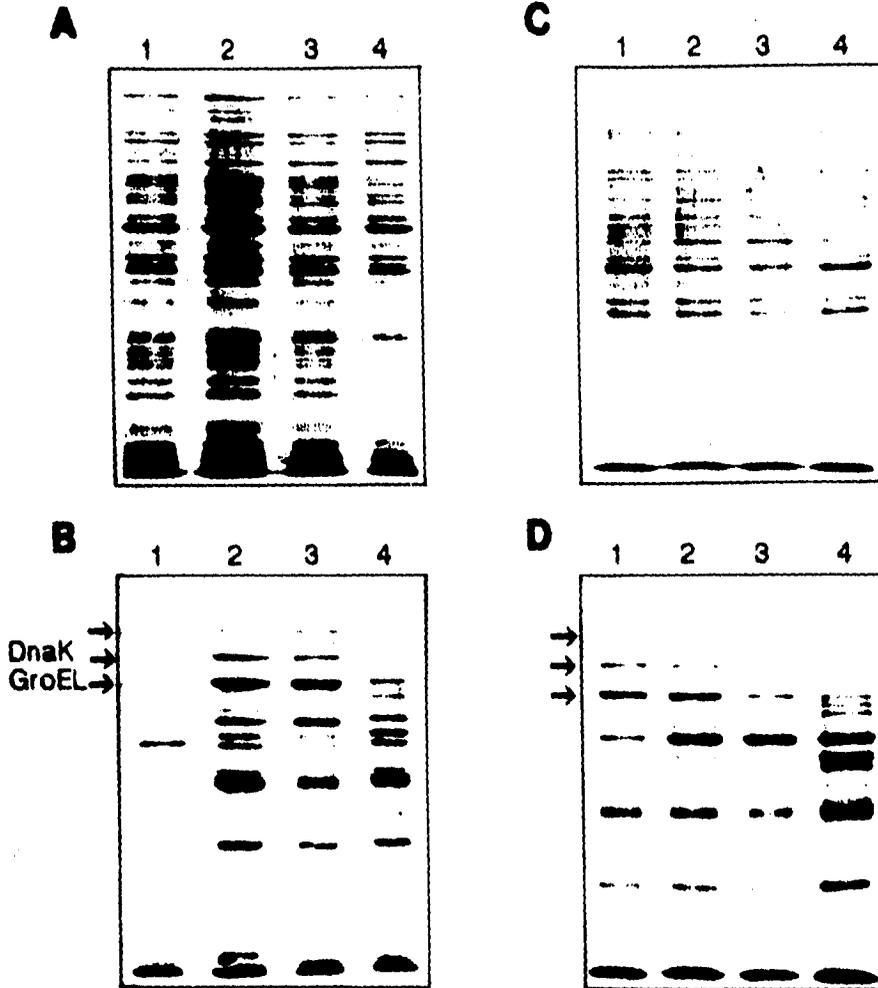


Figura 19. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 42°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0,4 (550 nm. de absorbencia) se expuso a 42°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con ^{35}S -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A y C) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B y D) Autorradiografía de A y C. (Carril 1; A, B) Cultivo a temperatura constante de 30°C. (Carril 2; A, B) 10 minutos a 42°C. (Carril 3; A, B) 20 minutos a 42°C. (Carril 4; A, B) Temperatura constante de 42°C. (Carril 1; C, D) 10 minutos a 42°C. (Carril 2; C, D) 30 minutos a 42°C. (Carril 3; C, D) 40 minutos a 42°C. (Carril 4; C, D) Temperatura constante de 42°C. El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

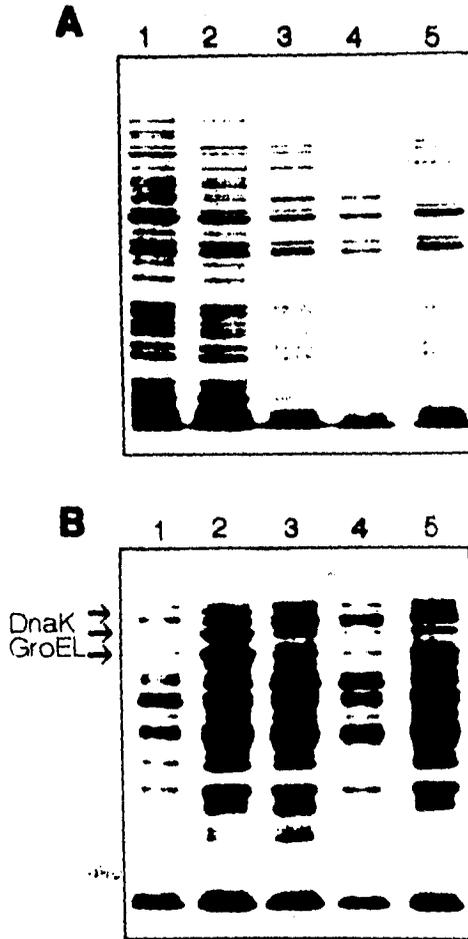


Figura 20. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico a 42°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 42°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 42°C (carriles 1 y 5); estrés calórico a 42°C por 10, 40 y 50 minutos (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de cinco minutos.

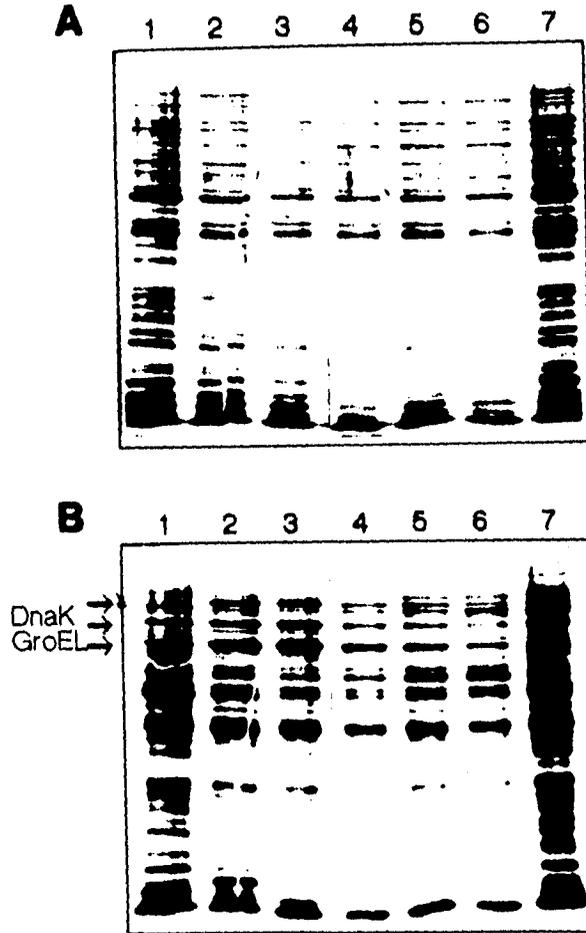


Figura 21. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 42°C. La cepa GM30 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 42°C. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 42°C (carriles 1 y 5); estrés calórico a 42°C de 10, 20, 30, 40 y 50 minutos (carriles 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radioactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

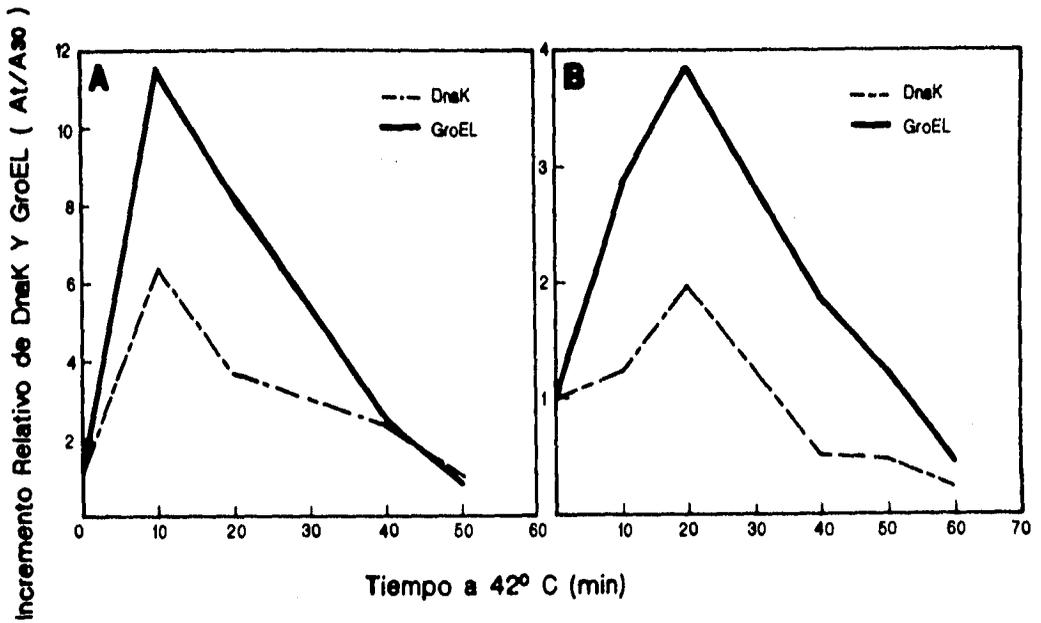


Figura 22. Incremento relativo de la síntesis de HSPs por estrés calórico de 30 a 42°C. El incremento relativo se obtuvo al dividir las áreas correspondientes a DnaK y GroEL (expresadas en U de absorbencia/mm) del análisis densitométrico a una temperatura de 42°C (A_t) entre el área respectiva a 30°C (A₃₀) para cada tiempo específico. (A) C600, datos correspondientes a las Figuras 19 y 20. (B) GM30, datos correspondientes a la Figura 21.

4.2. Estrés Calórico a 45°C

El estrés calórico de 30 a 45°C es un estrés de intensidad media. En la Figura 23 B se observa una cinética de estrés calórico de 30 a 45°C de la cepa C600. En el carril 3 se observa perfectamente la inducción de las HSPs a los 20 minutos. A los 30 minutos, aunque hay una menor concentración de proteínas, se nota un inicio en la disminución de DnaK y la proteína de 90 kDa. (Fig. 23 B, carril 4). A los 40 y 50 minutos (Fig. 24 B, carriles 3 y 4) continúa disminuyendo gradualmente hasta que a los 60 minutos también la síntesis de GroEL disminuye (Figura 24 B, carril 5). En la cepa GM30 a los 40 minutos aún se observa la respuesta a estrés calórico (Fig. 25 B, carril 3). La respuesta se apaga entre los 50 y 60 minutos (Fig. 25 B, carriles 4 y 5).

En la Figura 26 A se presenta un resumen de la cinética de la respuesta de estrés calórico de 30 a 45°C de la cepa C600. La proteína GroEL se incrementó de 4 a 6 veces en los primeros 10 minutos después del cambio y alcanzó su máxima síntesis (14 a 16 veces) a los 30 minutos. La síntesis de esta proteína disminuyó casi por completo a los 40 minutos para finalmente disminuir aproximadamente 14 veces a los 60 minutos. La proteína DnaK también alcanzó su síntesis máxima a los 30 minutos, pero su incremento fue sólo de 4 a 6 veces su concentración. La síntesis de esta proteína disminuyó de manera importante a los 60 minutos. En la cepa GM30, GroEL se incrementó de 30 a 35 veces a los 40 minutos después del cambio a 45°C (Fig. 26 B). Esta proteína a los 50 minutos disminuyó su síntesis 20 veces y a los 60 minutos disminuyó aproximadamente 5 veces más a un valor que se encuentra por arriba de la síntesis a 30°C. La proteína DnaK aumentó sólo 15 veces a los 10 minutos y permaneció constante hasta los 40 minutos, momento en el cual comenzó a desaparecer rápidamente hasta disminuir casi totalmente a los 50 minutos. El nivel final de ambas proteínas es superior al nivel basal a 30°C. Sin embargo, la diferencia de valores entre los incrementos de las cepas C600 y GM30 no es comparable porque son experimentos independientes entre sí.

Por lo tanto, la duración de un estrés calórico de 30 a 45°C es de aproximadamente 50 minutos en ambas cepas, aunque estas cepas son diferentes en cuanto a su termosensibilidad. Sin embargo, en la cepa C600 el incremento de la síntesis de las proteínas DnaK y GroEL fue menor que en la cepa GM30. La síntesis de la proteína GroEL, al igual que en un estrés de 42°C, alcanzó su pico máximo primero en la cepa C600 a los 30 minutos y después en la cepa GM30 a los 40 minutos. En C600 este incremento disminuyó a un nivel por debajo del nivel basal a 30°C. En la cepa GM30 el incremento de GroEL y DnaK fue 15 y 10 veces mayor, respectivamente que en la cepa C600. Este nivel a los 50 minutos permaneció superior al del nivel basal a 30°C.

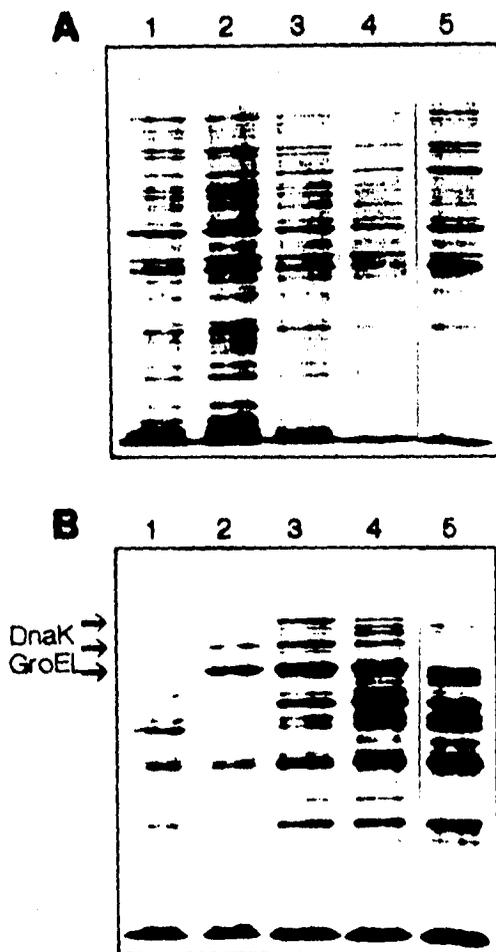


Figura 23. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 45°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 45°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 45°C (carriles 1 y 5); estrés calórico a 45°C de 10, 20 y 30 minutos (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

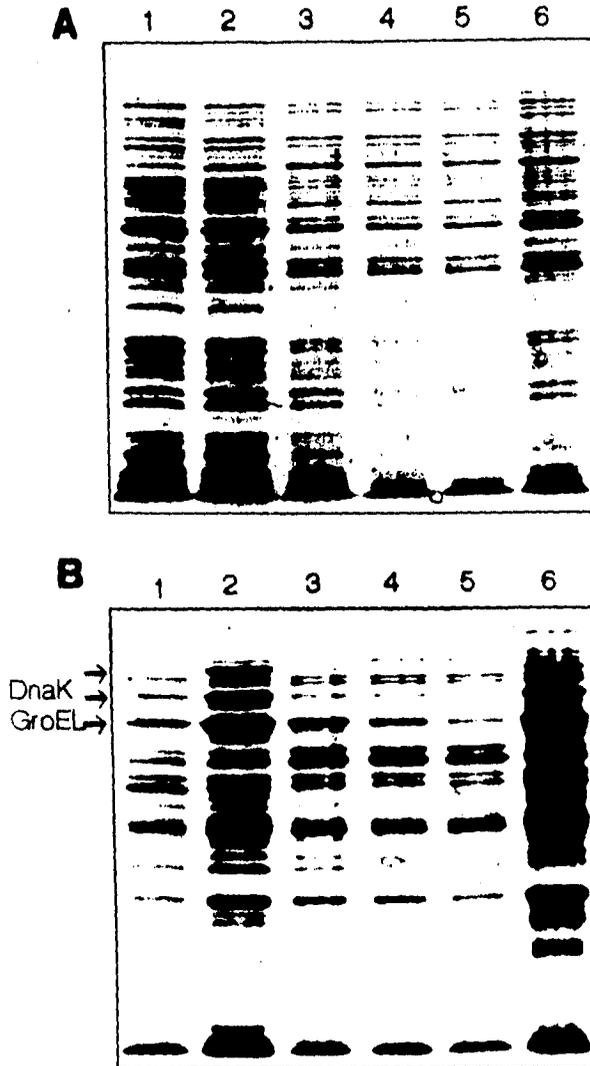


Figura 24. Síntesis de proteína durante un estrés calórico de 45°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a un D.O. de 0.4 se expuso a 45°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 11%. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autoradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 45°C (carriles 1 y 6); estrés calórico a 45°C de 10, 40, 50 y 60 minutos (carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

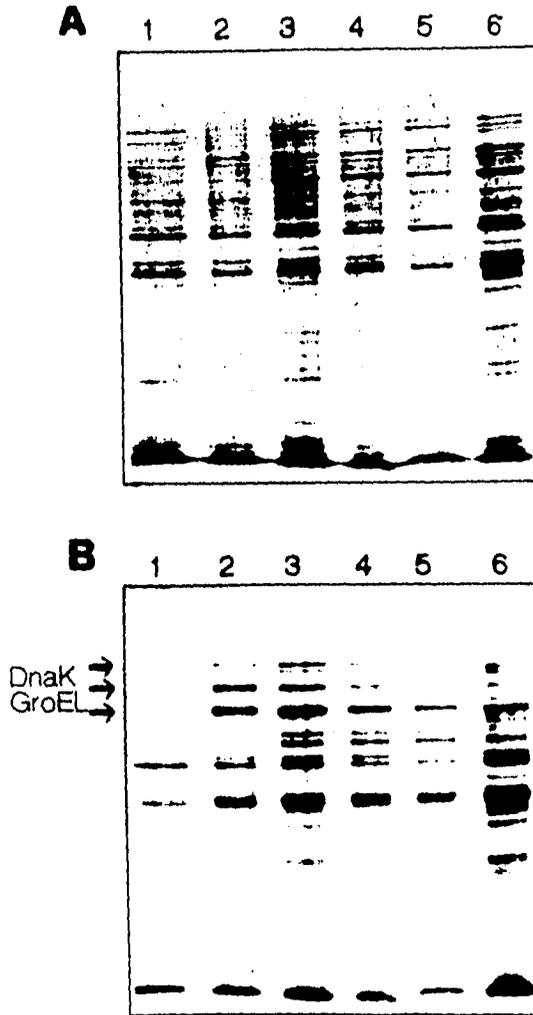


Figura 25. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 45°C. La cepa GM30 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 45°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 45°C (carriles 1 y 6); estrés calórico a 45°C de 10, 40, 50 y 60 minutos (carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

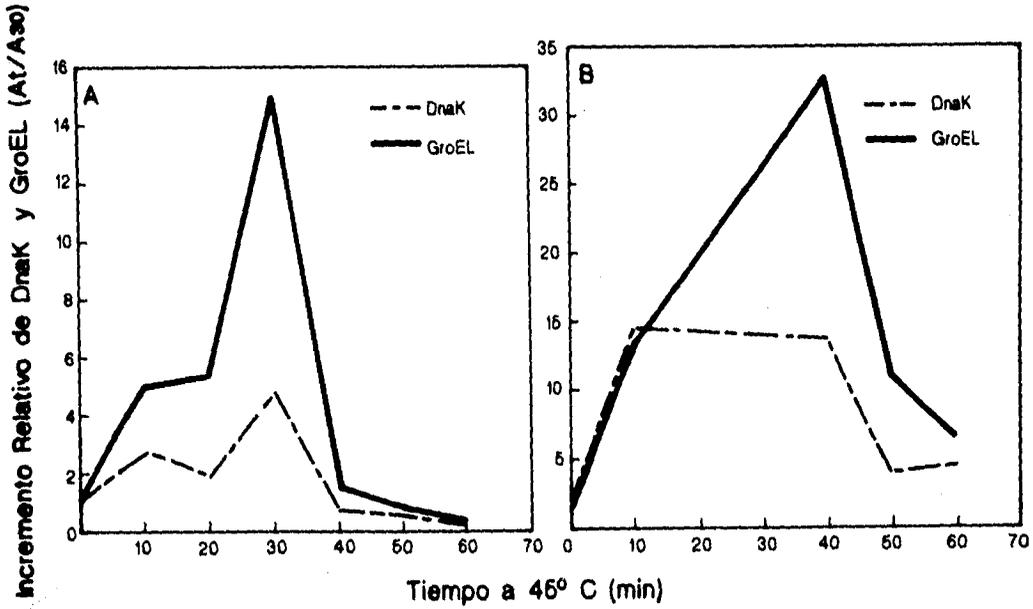


Figura 26. Incremento relativo de la síntesis de HSPs en un estrés calórico de 30 a 45°C. El incremento relativo se obtuvo al dividir las áreas correspondientes a DnaK y GroEL (expresadas en U de absorbencia/mm) del análisis densitométrico a una temperatura de 45°C (A1) entre el área respectiva a 30°C (A30) para cada tiempo específico. (A) C600, datos de las Figuras 23 y 24. (B) GM30, datos de la Figura 25.

4.3 Estrés calórico de 47°C

El estrés calórico de 30 a 47°C es un estrés fuerte y subletal. En la cepa C600 el incremento en la síntesis de HSPs se observó a los 20 y 35 minutos del cambio a 47°C (Fig. 27 B, carril 3 y 4). Estas proteínas disminuyeron a partir de los 50 minutos (Fig. 28 B, carriles 3, 4 y 5). En la cepa GM30, a diferencia de la anterior, la síntesis de las proteínas de 90 kDa., DnaK y GroEL se ve claramente inducida aún a los 40 minutos (Fig. 29 B, carril 5). Este comportamiento de las dos cepas se resume en la Figura 30. En A se observa que en la cepa C600, a los 10 minutos de iniciado el estrés, GroEL y DnaK aumentaron 8 a 10 veces y 6 a 8 veces respectivamente. A los 20 minutos la síntesis de éstas aumentó de 10 a 12 veces para DnaK y de 12 a 14 veces para GroEL. Nuevamente C600 alcanzó antes que GM30 su pico máximo. A los 30 minutos la síntesis de DnaK disminuyó de 6 a 8 veces. La síntesis de GroEL permaneció elevada. A los 50 minutos ambas proteínas decayeron bruscamente a un nivel similar al de 30°C. En B se presentan los resultados con la cepa GM30. En esta cepa, a los 35 minutos DnaK aumentó 6 veces y GroEL 12 veces. A los 60 minutos, la síntesis de estas proteínas disminuyó, sin embargo, ésta disminución fue notablemente superior del nivel basal a 30°C. Después de los 60 minutos la síntesis de estas proteínas permaneció por arriba del nivel a 30°C.

Para comprobar esta diferencia se marcaron en forma simultánea las dos cepas a los 50 minutos del cambio de temperatura de 30 a 47°C (Fig. 31 A). En la cepa C600, a los 50 minutos disminuyeron las proteínas de 90 kDa. y DnaK (Fig. 31 A, carril 3). En la cepa GM30, a los 50 minutos se observó totalmente inducida la síntesis de HSPs (Fig. 31 A, carril 7). En el análisis densitométrico de la autoradiografía (Fig. 30 B), en la línea 2 hay 3 picos marcados con las letras a, b y c que corresponden a las proteínas de 90 kDa., DnaK y GroEL, respectivamente. En este análisis, incluso, al comparar la inducción de la proteína GroEL a los 50 minutos del cambio de temperatura en la cepa C600 (Fig. 31 B, línea 3) con la cepa GM30 (Fig. 31 B, línea 7) hay una menor inducción en la cepa C600.

La disparidad que se observó en la duración del estrés calórico puede deberse a diferencias en la termosensibilidad de las cepas. También puede ser porque particularmente en la cepa C600 la duración del estrés calórico de 30 a 47°C posiblemente es un poco más corta y tiene una menor cantidad de HSPs que a una temperatura basal de 30°C antes del cambio de temperatura. Esto apoyaría el fenómeno que ocurre en la metilación en esta cepa. La inhibición de la metilación que presenta esta cepa podría estar relacionada con la presencia de una respuesta a estrés calórico un poco más corta y, al salir del estrés, una menor cantidad de HSPs en relación con otras cepas. Para probar esto, se seleccionó a la cepa W3110. Esta cepa presentó un patrón de termosensibilidad similar a la C600; sin embargo, presenta la metilación Dcm a 47°C. Por tal motivo se marcaron en estrés calórico de 47°C a las cepas C600 y GM30 junto con la cepa W3110, que es una cepa termorresistente (Fig. 32). La respuesta al estrés calórico es la misma a los 10 minutos del cambio a 47°C para las tres

Resultados

cepas (Fig. 32 A, carriles 2, 5 y 7). Sin embargo, a los 50 minutos, en las cepas W3110 y GM30 (Fig. 32 A, carriles 3 y 8) las tres HSPs están totalmente inducidas, mientras que en la C600 las proteínas de 90 kDa y DnaK disminuyeron notablemente (Fig. 32 A, carril 6). En la Fig. 32 B se muestra el análisis densitométrico de la respuesta al estrés calórico presentada en la Figura 31 A. En la línea 2 que corresponde a los 10 minutos del cambio de temperatura a 47°C se marcan tres picos con las letras (a), (b) y (c) que corresponden al incremento de la síntesis de una proteína de 90 kDa, DnaK y GroEL, respectivamente. A los 50 minutos en las cepas W3110 y GM30 continúan estos picos; sin embargo, en la cepa C600 el pico de DnaK y el de la proteína de 90 kDa han disminuído notablemente (Fig. 32 B, líneas 3, 6 y 8).

En un estrés calórico subletal como es de 47°C, la cepa C600 mostró tener menor duración de esta respuesta en relación con las otras cepas. Esta diferencia no se debió a una mayor termosensibilidad, sino más bien a una característica particular de la cepa. Esta característica podría ser la causa de que esta cepa a 47°C no metile a la segunda citosina de la secuencia 5'CC(A/T)GG 3', es decir, puede relacionarse al hecho de que la cepa C600 tenga una respuesta al estrés calórico de menor duración. Lo anterior puede implicar que la concentración celular total de DnaK y GroE durante el estrés y al final de éste sea menor en la cepa C600 que en la cepa GM30 y W3110. Estas proteínas probablemente funcionen como chaperonas de la metilasa Dcm. Esto se fundamenta, como ya se mencionó, porque al transformar a esta cepa con pLN44, el plásmido multicopia que tiene clonado a *groEL* y *groES*, no hay inhibición de la metilación Dcm. De esta forma, al estar presente GroEL en menor cantidad, la metilasa Dcm no es activa a 47°C.

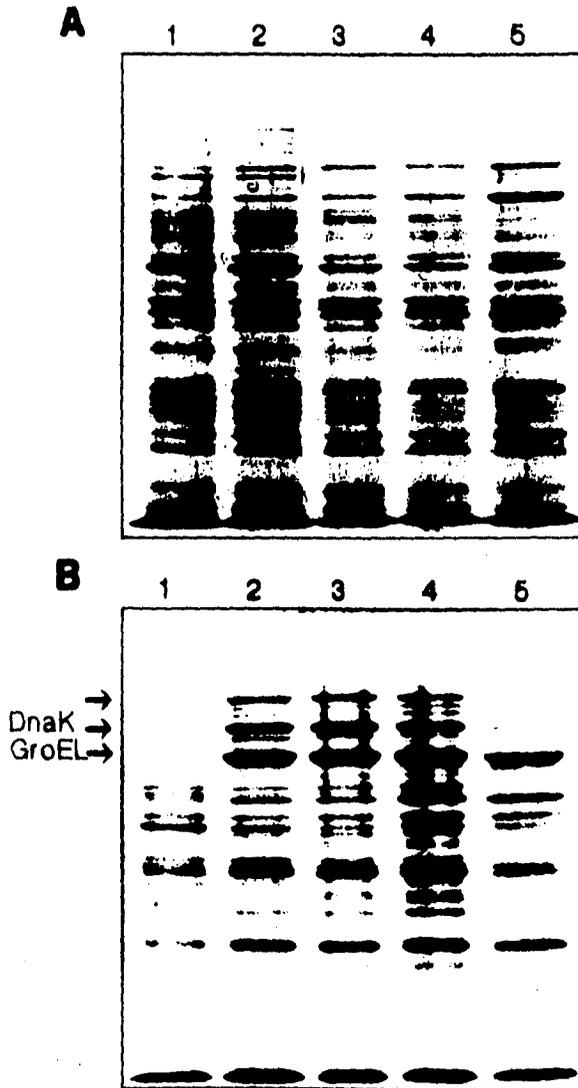


Figura 27. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 47°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 47°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con [³⁵S]-L-met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 47°C (carriles 1 y 5); estrés calórico a 47°C de 10, 20 y 35 minutos (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

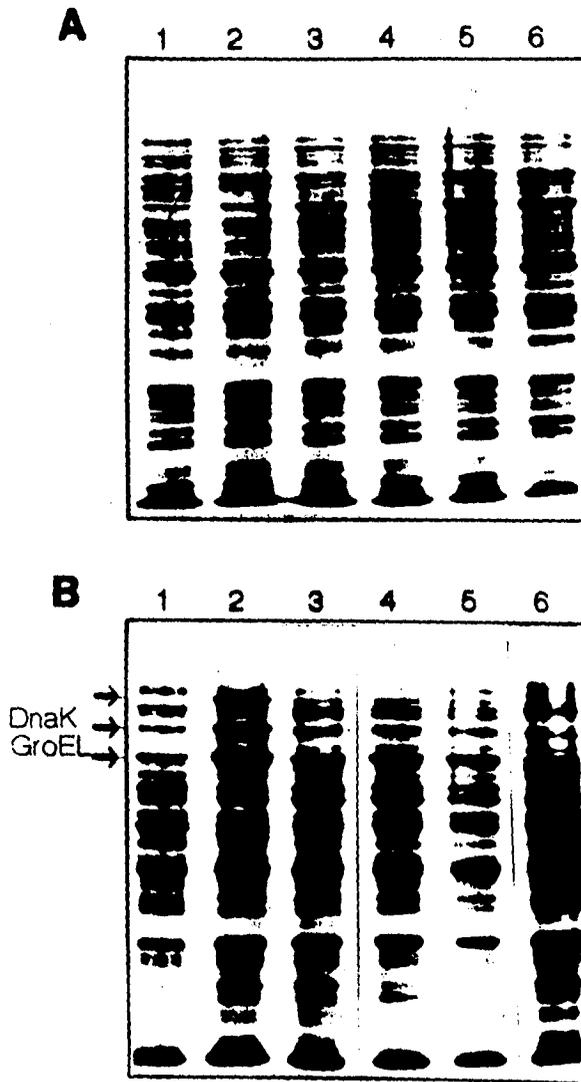


Figura 28. Síntesis de proteínas durante un estrés calórico de 47°C. La cepa C600 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expuso a 47°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con [³⁵S]-L- met y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos controles a 30 y 47°C (carriles 1 y 6); estrés calórico a 47°C de 10, 50, 60 y 70 minutos (carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

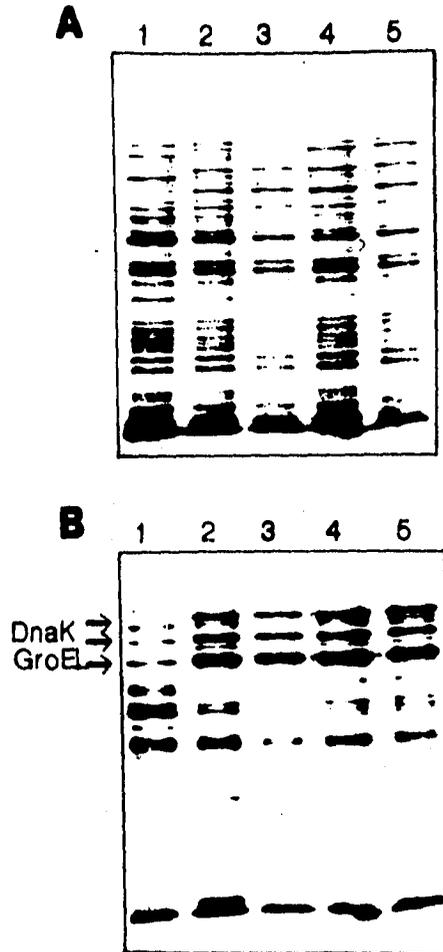


Figura 29. Síntesis de proteínas durante el estrés calórico de 47°C. La cepa GM30 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. se expuso a 47°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con $[^{35}\text{S}]$ -L-met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cultivos control a 30°C (carril 1); estrés calórico a 47°C de 10, 20, 30 y 40 minutos (carriles 2, 3, 4 y 5, respectivamente). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

Resultados

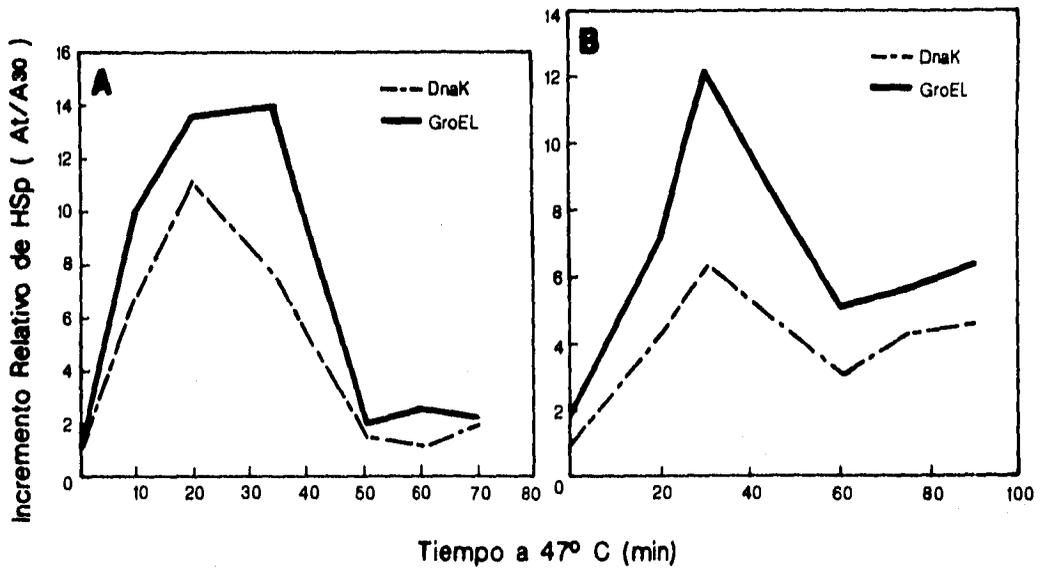
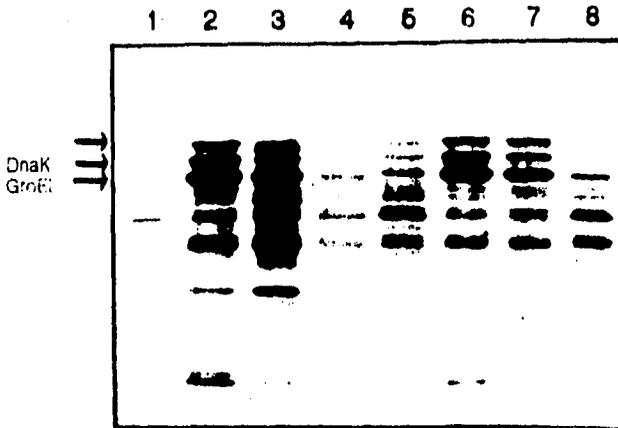


Figura 30. Incremento relativo en la síntesis de HSPs durante el estrés calórico de 30 a 47°C. El incremento relativo se obtuvo al dividir las áreas correspondientes a DnaK y GroEL (expresadas en U de absorbencia/mm) del análisis densitométrico a una temperatura de 47°C (A₁) entre el área respectiva a 30°C (A₃₀) para cada tiempo especificado. (A) C600, datos de las Figuras 27 y 28. (B) GM30, datos de la Figura 29.

A



B

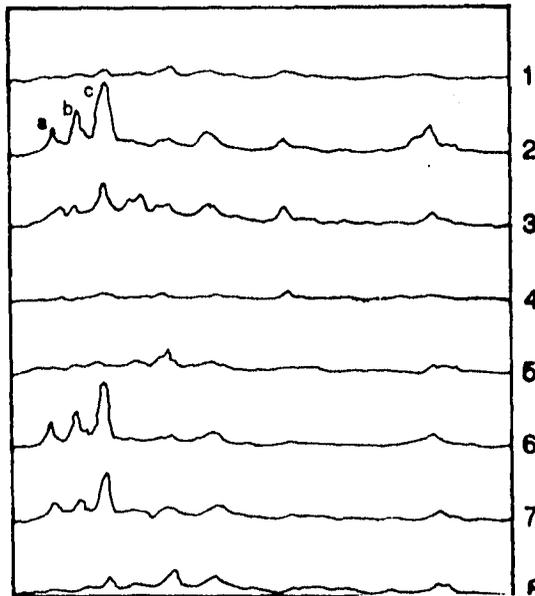


Figura 31. Síntesis de proteínas durante el estrés calórico de 47°C. Las cepas C600 y GM30 se cultivaron a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expusieron a 47°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con [³⁵S]-L- met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A) Autorradiografía. (B) Análisis densitométrico de las proteínas de A. Se observa la inducción de tres proteínas que corresponden a: (a) una proteína de 90 kDa., (b) DnaK y (c) GroEL. Cepa C600 (carriles y líneas 1 a 4). Cepa GM30 (carriles y líneas 5 a 8). Cultivos controles a 30°C (carriles y líneas 1 y 5) y a 47°C (carriles y líneas 4 y 8); estrés calórico a 47°C de 10 minutos (carriles y líneas 2 y 6) y 50 minutos (carriles y líneas 3 y 7). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

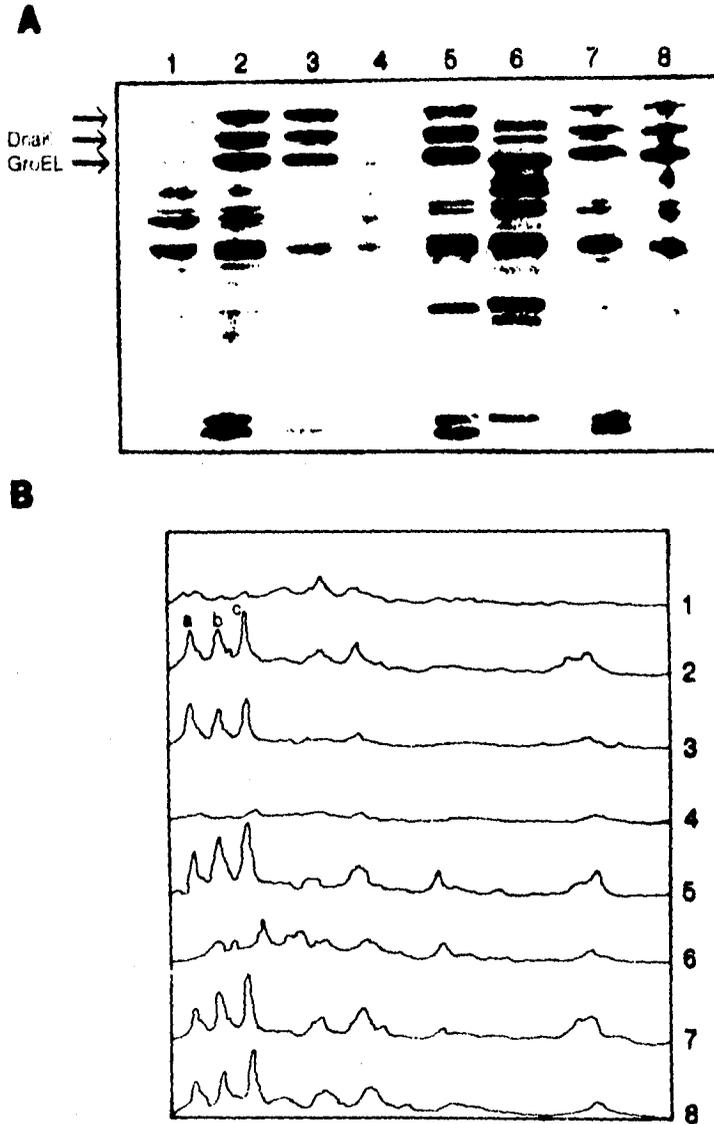


Figura 32. Síntesis de proteínas durante el estrés calórico de 47°C. Las cepas W3110, C600 y GM30 se cultivaron a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se expusieron a 47°C. Las proteínas que se sintetizaron durante el estrés calórico se marcaron con [35 S]-L- met y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11%. (A) Autorradiografía. (B) Análisis densitométrico de las proteínas de A. Se observa la inducción de tres proteínas que corresponden a: (a) una proteína de 90 kDa, (b) DnaK y (c) GroEL. Cepa W3110 (carriles y líneas 1 a 4). Cepa C600 (carriles y líneas 5 y 6). Cepa GM30 (carriles y líneas 7 y 8). Cultivos controles a 30 y 47°C (carriles y líneas 1 y 4); estrés calórico a 47°C de 10 minutos (carriles y líneas 2, 5 y 7) y 50 minutos (carriles y líneas 3, 6 y 8). El pulso de marcaje con metionina radiactiva en todos los casos fue de 5 minutos.

5. ACUMULACION DE HSPs DURANTE EL ESTRES CALORICO DE 30 A 47°C

En los experimentos anteriores se observaron las proteínas que se sintetizaron durante el período de marcaje con [35 S]- L- metionina, es decir, se observa un promedio de las proteínas que se sintetizan y degradan. Sin embargo, esto es diferente de la acumulación total de proteínas. Para poder visualizar esta acumulación, en primer lugar se buscó utilizar un medio de tinción de mayor sensibilidad que el azul de Coomassie. Para ello se usó tinción con plata. Sin embargo, con esta técnica no se lograron identificar diferencias entre la concentración de HSPs entre las cepas y los tiempos de estrés calórico (Fig. 33). Otro intento para observar esta acumulación fue realizar marcajes largos de una hora (Fig. 34). La acumulación total de HSPs durante un estrés de calor a 47°C fue similar en las cepas W3110, C600 y GM30 (Fig. 34 B, carriles 4, 6 y 8). A una temperatura de 30°C la cepa C600 (Fig. 34 B, carril 5) tuvo mayor acumulación de HSPs que las cepas W3110 y GM30. Estos datos son válidos aún cuando en el carril 7 hubo menor concentración de proteína (Fig. 34 B, carriles 3 y 7).

Para determinar de un modo más directo la acumulación de GroEL en un estrés calórico de 30 a 47°C se realizó un Western blot (Fig. 35). Se usó un anticuerpo policlonal antiGroEL de *Mycobacterium tuberculosis* que identificó a la proteína GroEL de *E. coli*. En la cepa C600 la acumulación de GroEL a los 40 y 60 minutos del cambio de 30 a 47°C fue incluso mayor que en la cepa W3110 y GM30 (Fig. 35, carriles 7-8 y 11-12, respectivamente). Además de la proteína GroEL, el anticuerpo detectó otra proteína de aproximadamente 35 kDa.

Los resultados mostraron que la duración del incremento en la síntesis de HSPs en un estrés calórico de 30 a 47°C es menor en la cepa C600 que en las cepas W3110 y GM30. A pesar de ello, los resultados del experimento tipo Western sugieren que la acumulación total de la proteína GroEL es incluso mayor en la cepa C600 que en las otras dos cepas. Sin embargo, estos son datos preliminares que se realizaron con un anticuerpo policlonal no dirigido contra *E. coli*, aunque se trata de una proteína conservada en bacterias.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

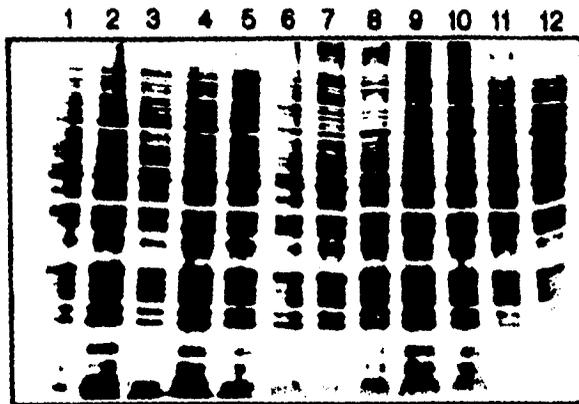


Figura 33. Proteínas de *E. coli* sintetizadas en condiciones de estrés calórico teñidas con nitrato de plata. Cepa W3110 (carriles 1 a 4), cepa C600 (carriles 5 a 8) y cepa GM30 (carriles 9 a 12). Se realizaron cultivos a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 se mantuvieron a esa misma temperatura durante 15 minutos (carriles 1, 5 y 9) y 50 minutos (carriles 3, 7 y 11). Parte de estos mismos cultivos al llegar a dicha D.O. se cambiaron repentinamente a 47°C durante 15 minutos (carriles 2, 6 y 10) y 50 minutos (carriles 4, 8 y 12).

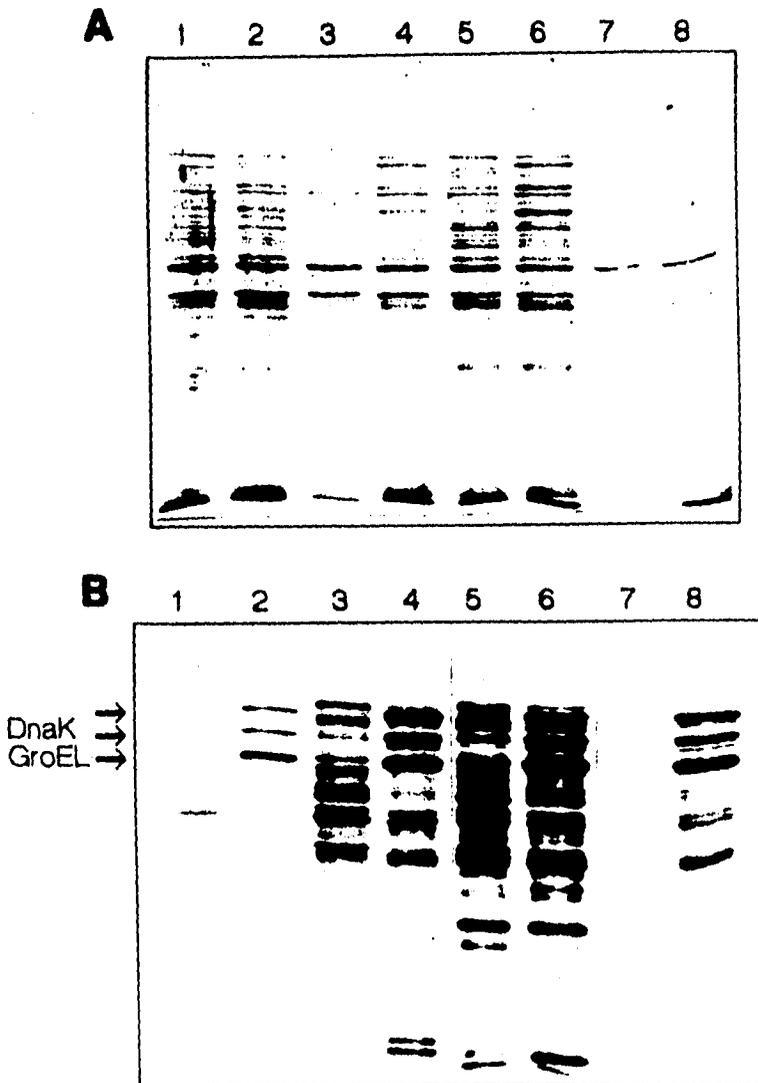


Figura 34. Acumulación de proteínas de *E. coli* durante una hora. (A) Proteínas teñidas con azul de Coomassie. (B) Autorradiografía de A. Cepa W3110 (carriles 1 a 4); cepa C600 (carriles 5 y 6) y cepa GM30 (carriles 7 y 8). Se realizaron cultivos a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.4 parte de estos cultivos se mantuvieron a esa misma temperatura y se marcaron con metionina radiactiva durante una hora (carriles 3, 5 y 7). Otra parte de estos cultivos se cambiaron repentinamente a 47°C y también se marcaron con metionina radiactiva durante una hora (carriles 4, 6 y 8).

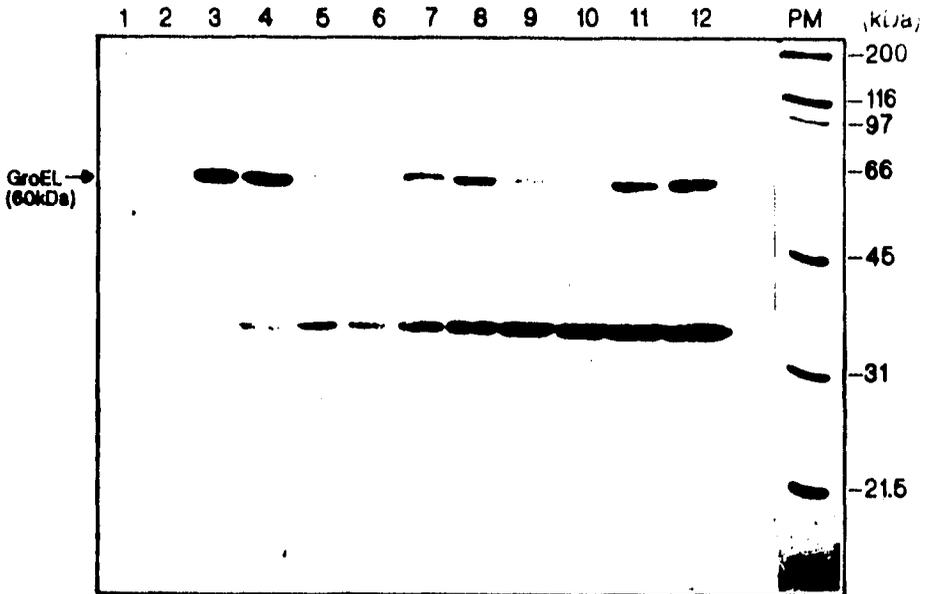


Figura 35. Proteínas de *E. coli* que se sintetizan durante estrés calórico de 30 a 47°C. Análisis de Western blot con anticuerpo antiGroEL. Cepa C600 (carriles 1 a 4), cepa W3110 (carriles 5 a 8) y cepa GM30 (carriles 9 a 12). Se realizaron cultivos a 30°C (carriles 1, 5 y 9) y cultivos que se sometieron a estrés calórico por 10 minutos (carriles 2, 6 y 10), 40 minutos (carriles 3, 7 y 11) y 60 minutos (carriles 4, 8 y 12). Línea kDa., estándar de P.M.: Miosina (200 kDa.), β -galactosidasa (116 kDa.), fosforilasa B (97.4 kDa.), BSA (66 kDa.), ovoalbúmina (45 kDa.), anhidrasa carbónica (31 kDa.), inhibidor de tripsina (21.5 kDa.).

DISCUSION

El estrés calórico es una respuesta universal que se presenta a nivel celular. Esta respuesta presenta diferentes características según el incremento de temperatura. Hay muy pocos estudios acerca de la duración de esta respuesta. Los principales estudios reportados se realizaron en un cambio de temperatura de 28 a 42°C, por lo que el estrés calórico de 30 a 45°C y el de 30 a 47°C han sido poco estudiados. En nuestro laboratorio se encontró que en un estrés subletal (30 a 47°C) se suspende por cuatro horas la metilación Dcm del DNA únicamente en las cepas C600 y C600 Nal^r (Ramírez-Santos, 1993). La metilación Dam de las adeninas, por el contrario, no se afecta a esta temperatura en ninguna cepa. Este fenómeno no se observa si se transforma a estas cepas con el plásmido pLN44, el cual codifica para las proteínas GroEL y GroES (Ramírez-Santos, 1993). Una posible explicación de estos datos es que durante este tiempo se acumule alguna proteína que ayude a la metilasa Dcm a realizar su actividad. Además, al transducir el gen *dcm* de la cepa C600 a la cepa GM31, que carece de este gen, esta cepa metila el DNA normalmente. Estos datos indican que esta alteración en la metilación Dcm no se debe a defectos en la metilasa Dcm de la cepa C600, sino que posiblemente GroE tiene actividad de chaperonina sobre la metilasa Dcm. Por lo tanto, en esta cepa es probable que haya una menor cantidad de estas proteínas durante un estrés calórico de 47°C.

Para comprobar lo anterior, en este proyecto se estudió la termosensibilidad a diferentes temperaturas de las cepas que se emplearon en el trabajo previo sobre la metilación del DNA y que además se utilizan mucho en estudios de estrés calórico, pero en los cuales no se menciona su termosensibilidad. Asimismo, en estas cepas se estudió el crecimiento bacteriano y la filamentación celular durante el estrés calórico en relación a la intensidad y la duración de éste.

En las Figuras 9 a 13 se muestran curvas de crecimiento a temperaturas diferentes donde se observa el comportamiento de seis cepas que, como se mencionó, se emplean mucho en

estudios sobre estrés calórico. A 30°C las cepas crecieron de manera muy similar. A 42°C el crecimiento de las diferentes cepas fue también similar; sin embargo, las cepas crecieron a mayor velocidad y la población alcanzó una mayor capacidad de carga que a 30°C. A 45°C, aunque la capacidad de carga de la población disminuyó en relación al crecimiento a 42°C, ésta fue mayor que a 30°C. En los trabajos de Herendeen *et al* (1979), se menciona que el crecimiento es balanceado de 10 a 41°C y que a partir de 42°C el crecimiento empieza a ser progresivamente más lento. La diferencia entre los estudios mencionados y los que se presentan en este trabajo puede deberse a que aquellos fueron realizados en un medio de cultivo diferente y en la cepa B/r que pertenece a una línea celular distinta a la K12, línea en que están incluidas las cepas estudiadas en este trabajo.

A 47°C la temperatura tuvo un efecto negativo en la velocidad de crecimiento y la capacidad de carga de todas las cepas. Este efecto, sin embargo, no fue el mismo en todas ellas. A esta temperatura, como se observa en la Figura 12, las cepas se comportaron de manera heterogénea. Algunas cepas, aunque disminuyeron de manera importante su crecimiento, sí tuvieron un crecimiento considerable, mientras que otras cepas presentaron crecimiento escaso. Esto muestra que sí existen diferencias en la termosensibilidad entre distintas cepas en una misma especie.

Estas diferencias se deben a que la termosensibilidad es una característica intrínseca de cada organismo. *E. coli* es una enterobacteria que se aisló por primera vez en 1922 de las heces de un paciente convaleciente con difteria (Bachman, 1987). En 1950 se reportó que ya no tenía la misma estructura antigénica que otras cepas silvestres y en 1970 fue incapaz de colonizar el intestino humano. Además de estos cambios espontáneos, a lo largo del tiempo se han aislado otras cepas que se utilizan para hacer muchas investigaciones. En este tiempo las cepas de *E. coli* K12 se han tratado repetidamente con rayos X, UV y otros mutágenos. Por ejemplo, la cepa AB1157 se ha tratado 3 veces con rayos X, con UV 9 veces y con gas nitrógeno una vez (Bachman, 1987). Además se han aislado cepas con pérdida parcial o total de diferentes genes, así como con inserciones de transposones, transformaciones con plásmidos y transducciones con fagos. Por lo anterior, es probable que estas manipulaciones afecten la termosensibilidad en las diferentes cepas de *E. coli* K12.

De acuerdo a los resultados de las Figuras 13 a 16, no existe una correlación entre el patrón de termosensibilidad y el crecimiento posterior a un incremento brusco de temperatura. La exposición de una cepa a una temperatura alta constante es diferente a someter a una célula a estrés calórico. Durante una exposición constante a una temperatura alta el registro del crecimiento de las células es posterior al período de estrés y las células ya están en un crecimiento estable. Además, como el inóculo es pequeño (2×10^7 células/ml) se asegura nuevamente que el registro del crecimiento se inicia posterior al estrés cuando las células están en un nuevo equilibrio fisiológico característico de esa temperatura. De forma inversa, al someter a unas células en la mitad de la fase logarímicamente de crecimiento a una temperatura de estrés, dicho crecimiento se registra inmediatamente después del cambio de temperatura.

De estas forma las células llegan a la fase estacionaria antes de recuperarse del estrés calórico. Así, al transcurrir el tiempo del cambio de temperatura, además del estrés calórico puede haber un estrés por carencia de nutrientes.

En la cepa C600, que es una cepa sin metilación Dcm a 47°C, a una temperatura alta constante su comportamiento es similar a la cepa W3110 la cual metila el DNA normalmente. El crecimiento durante el estrés calórico a 47°C es mayor en C600 que en W3110 y GM30. Estos datos son diferentes a los esperados, ya que se pronosticaba que fuera C600 y no GM30 la cepa con una respuesta a estrés más limitada, debido a que es probable que su problema en la metilación se deba a que sintetiza una menor cantidad de GroEL o DnaK.

En las Figuras 9 a 13 se observa cómo la temperatura afecta la velocidad de crecimiento y la capacidad de carga de una población. Estas Figuras también muestran, aunque de un modo indirecto, cómo se afecta la división celular. Las bacterias durante el intervalo de Arrhenius se dividen en ciclos constantes. En mutantes en el gen regulador *rpoH* y en los genes de estrés calórico, las células no se dividen correctamente y se forman filamentos. La respuesta al estrés calórico es probablemente una respuesta que seleccionó a los organismos para sobrevivir a las temperaturas altas. De esta manera, se pensó que las cepas que sobreviven menos a temperatura alta, es decir, las termosensibles, pueden tener una respuesta a estrés de calor deficiente y se afecta más su división celular. Sin embargo, de acuerdo a las Figuras 17 y 18 no existe ninguna relación entre la termosensibilidad y la filamentación de las cepas. La única cepa que filamentó es la C600 Nal^f , la cual al ser resistente al ácido nalidíxico presenta una mutación en el gen que codifica para la girasa (Cozzarelli, 1980). La girasa se requiere para el desplazamiento de la horquilla de duplicación. Muchas mutantes en girasa presentan incremento en su termosensibilidad, lo cual se observa en la cepa C600 Nal^f si se compara con la C600. Se sabe además que si se muta a l gen de la girasa, se inhibe la duplicación del DNA y por lo tanto la división celular. Además del efecto directo de la duplicación del DNA en la división celular, es posible que la mutación en este gen, al inducir cambios en el superenrollamiento del DNA, afecte la transcripción de varios genes y evite que se forme el septo transversal cerca del centro de la célula, o bien, provoque que éste se forme a destiempo y en un lugar más alejado. Sin embargo, estos estudios son limitados, por lo que se requieren estudios más detallados al respecto.

Por otro lado, el estrés calórico varía de acuerdo a la magnitud del cambio de temperatura (Neidhard *et al.*, 1984). En temperaturas letales (v.gr. 50°C) la respuesta es continua hasta que la célula muere. En temperaturas no letales la respuesta es transitoria y la síntesis de HSPs tiene lugar en un tiempo determinado. Al cabo de este tiempo, se empieza a normalizar el patrón de la síntesis de la mayoría de las proteínas. Este patrón es diferente al de la síntesis de proteínas a 30°C. Durante este tiempo, es muy probable que haya cambios que permitan la adecuación de *E. coli* a las nuevas condiciones de crecimiento y de esta forma se pueda establecer un nuevo patrón de síntesis de proteínas. El tiempo que se

requiere para la adecuación no se conocía y, por esta razón, se efectuó el marcaje radioactivo de proteínas de células de *E. coli* que se sometieron al estrés calórico. El tiempo de duración de la respuesta al estrés calórico se siguió indirectamente por la síntesis durante el estrés de las proteínas de 90 kDa., DnaK y GroEL. Aunque el incremento relativo de estas tres proteínas no es de los más grandes dentro de las HSPs (Neidhardt y VanBogelen, 1987), por su abundancia y caracterización electroforética son fáciles de analizar por electroforesis en geles de una dimensión.

Se sabe que en un estrés calórico de 50°C la síntesis de las HSPs continúa hasta que la célula muere. Por lo que es posible que el tiempo de duración del estrés calórico sea más largo entre mayor es la diferencia entre la temperatura basal y la temperatura del estrés. Sin embargo, en un estrés de 30 a 42°C y de 30 a 45°C no se encontró ninguna diferencia notable en la duración del estrés y en ambos casos duró alrededor de 50 minutos. Estos datos sugieren que aunque el incremento en la temperatura sea más alto no es mayor la duración del estrés calórico. El tiempo de duración que se encontró en este trabajo difiere al que encontraron Neidhardt y VanBogelen (1987), que fue entre 20 y 30 minutos. Esta diferencia posiblemente se debe a que ellos trabajaron con la cepa W3110 y en otro medio de cultivo en un estrés calórico de 28 a 42°C. Por esta misma razón, posiblemente también difiere con la duración de 15 a 30 minutos que se encontró en la cepa Tsn-K165 (Yamamori y Yura, 1982). En las Figuras 26 y 30 se presentan datos que muestran que al salir del estrés calórico, la síntesis de DnaK y GroEL en GM30 es superior al nivel basal de 30°C, mientras que en C600 es inferior. Estos datos, como se explicará más adelante, se hicieron más notables en un estrés calórico a 47°C. Esta puede ser la causa de la falta de la metilación Dcm a 47°C en esta cepa, y a que apoya nuevamente la hipótesis de que GroEL interacciona con la metilasa Dcm y permite su función.

En este trabajo se encontró que la inducción máxima de HSPs tiene lugar generalmente primero en la cepa C600 que en la cepa GM30. Esto puede ser porque C600 a 30°C tiene mayor cantidad de HSPs, específicamente DnaK y GroEL. Así, su menor duración de respuesta puede deberse a que las mismas HSPs actúan como moduladores negativos de la misma, al actuar en la represión de la traducción del mRNA de *rpoH* y en la degradación y en la desactivación de σ^{32} . Por consiguiente, la mayor cantidad de HSPs a 30°C más la síntesis durante el estrés calórico pueden provocar que estas proteínas interactúen con la RNA polimerasa y con σ^{32} , provocando que σ^{32} se separe de la RNA polimerasa y se una a DnaK, DnaJ y GrpE. El σ^{32} unido a estas proteínas es más lábil al ataque de proteasas, con lo que finalmente se produce un decremento en la síntesis de las HSPs.

En los experimentos realizados, la duración del estrés calórico fue aproximadamente de 50 minutos. En este tiempo disminuyeron las proteínas de 90 kDa., la de 70 kDa.(DnaK) y la de 60 kDa.(GroEL), pero no se llegó al nuevo patrón de síntesis de proteínas típico de la temperatura nueva. Probablemente, esto se debe a que se requiere más tiempo para que

se alcance dicho patrón. En la cepa GM30 en algunas ocasiones, como en un estrés calórico de 30 a 47°C, la síntesis de las proteínas DnaK y GroEL disminuyó, pero después nuevamente se incrementó. Este incremento posiblemente se debe a que a tiempos largos las células inician su entrada a fase estacionaria. En esta fase al menos se sabe que existe un incremento en los niveles de la proteína GroEL (Subramanian *et al.*, 1976), por lo que es muy probable que además de GroEL se incrementen otras HSPs. Debido a esto, podría ser que el estrés calórico sea una respuesta en la cual no haya un momento final y definitivo donde se llegue a la síntesis del estado estático que explican Yamamori y Yura (1980). La síntesis de proteínas a una temperatura elevada es específica de cada temperatura y de cada cepa. En la cepa C600 en un estrés calórico mayor de 42°C la síntesis de DnaK y GroEL es superior al nivel basal de 30°C, lo cual nuevamente explica que ocurra antes el abatimiento en esta cepa.

En la cepa C600 la duración de un estrés calórico de 30 a 47°C fue de aproximadamente 50 minutos, sin embargo, en las cepas GM30 y W3110 a los 50 minutos todavía se observa inducido el terceto de las proteínas de 90 kDa., DnaK y GroEL. Esto sugiere que no hay diferencias entre la duración del estrés de calor entre las cepas termosensibles y termorresistentes. La menor duración del estrés calórico en la cepa C600 parece ser una característica particular de la cepa. No obstante, al ver la acumulación total por marcajes radioactivos y Western blot se observó que C600 acumula una cantidad de dichas HSPs incluso mayor a las cepas W3110 y GM30. A los 30°C durante una hora, C600 tiene mayor cantidad de GroEL y en general de HSPs, por lo que puede ser que esta cepa antes de un estrés calórico tenga mayor cantidad de HSPs. No obstante, éstas pueden no estar lo suficientemente sintetizadas durante un estrés calórico para ayudar a la metilasa Dcm. A pesar de ello, esto no aclara la falta de metilación del DNA, ya que al observar la acumulación total de GroEL sí hay cantidad suficiente de esta proteína para ayudar a la metilasa Dcm. Estos datos son preliminares, ya que se observaron con un anticuerpo policlonal que reconoce a GroEL de *Mycobacterium tuberculosis* y a otras proteínas. Además, la concentración total de proteínas en los diferentes carriles no fue similar. En este caso el anticuerpo antiGroEL reconoce también a una proteína que tiene un peso molecular entre 32 y 44 kDa. que se encuentra en mayor cantidad principalmente en GM30 y en menor cantidad en C600. Esta proteína podría ser una HSP, ya que se incrementa con temperatura alta. Debido a que GroEL en la cepa C600 se encuentra en cantidades mayores a otras cepas y a que es DnaK y la proteína de 90 kD las que disminuyen primero su síntesis al salir de la respuesta al estrés calórico y no GroEL, una explicación alternativa es que es DnaK y no GroEL la que tiene actividad de chaperona sobre la metilasa Dcm. Esto se fundamenta porque se sabe que DnaK es la proteína que está en mayor cantidad a temperaturas por arriba de 45°C. Sin embargo, se deben realizar estudios específicos a este respecto.

CONCLUSIONES

- Las cepas que se utilizan en estudios de estrés calórico son heterogéneas en cuanto a su termosensibilidad, crecimiento durante estrés por calor y respuesta a estrés calórico.
- No existe una correlación entre la termosensibilidad y el crecimiento durante estrés calórico.
- El efecto sobre la división celular observado, como son la formación de filamentos durante el estrés calórico a 47°C, es independiente de la termosensibilidad de la cepa.
- En la cepa C600 Nal^r existe filamentación al exponerla al estrés calórico de 47°C y a temperatura constante de 47°C. Esto puede deberse a la presencia de la mutación en el gen *gyrA* que le confiere resistencia a ácido nalidíxico y asimismo puede afectar la duplicación del DNA.
- En las cepas estudiadas, la duración de la respuesta a un estrés débil y a uno medio (42°C y 45°C, respectivamente) es similar. Tampoco existen diferencias notables en la duración de éstos entre una cepa termosensible y una termorresistente.
- En un estrés intenso como es el de 47°C, sí existen diferencias en la duración de la respuesta entre las cepas C600 y GM30. En la cepa C600, al final de la respuesta, la síntesis de GroEL y de DnaK disminuye por abajo del nivel basal a 30°C, mientras que en la GM30 esta síntesis se mantiene claramente por arriba de dicha basal. Estas diferencias en la respuesta al estrés de 47°C entre las cepas C600 y GM30 podrían explicar la inhibición de la metilación Dcm del DNA en la cepa C600 a 47°C.
- La proteína GroEL no parece ser la chaperonina necesaria para mantener la metilación Dcm a temperaturas altas en la cepa C600. Es posible que sea DnaK, una proteína

Conclusiones

importante a temperaturas por arriba de 45°C, y no GroEL la chaperonina para la metilación Dcm.

PERSPECTIVAS

- **Analizar la respuesta al estrés por calor en células en un punto más temprano de la fase exponencial para evitar que el estrés nutricional del inicio de la fase estacionaria se sume al estrés calórico. Esto es particularmente importante en los estudios de estrés a tiempos largos (40 o más minutos).**
- **Los experimentos de acumulación de GroEL son experimento preliminares que se realizaron con un anticuerpo policlonal antiGroEL de *M. tuberculosis*. Es necesario realizarlos con un anticuerpo monoclonal antiGroEL de *E. coli*. De igual modo, es preciso conocer también la acumulación total de DnaK que es probablemente la proteína que ayude a la metilasa Dcm a realizar su función. Para ello, se emplearía un anticuerpo monoclonal antiDnaK de *E. coli*.**
- **Para comprobar que GroEL y/o DnaK funcionan como chaperoninas en la metilasa Dcm, se podría estudiar la actividad *in vitro* de esta metilasa a distintas temperaturas en presencia y ausencia de GroEL y DnaK.**
- **Se sabe que DnaK junto con otras proteínas tiene un efecto en la regulación negativa de la respuesta al estrés calórico de 42°C, por lo que sería interesante comparar la duración de estrés calórico a 47°C en la mutante total *dnaK*.**
- **Sería importante estudiar también el papel del grado de superenrollamiento del DNA en la respuesta a estrés calórico. Se sabe que novobiocina, un inhibidor de la girasa, relaja al DNA e induce un aumento en la cantidad de las proteínas DnaK y GroEL.**

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Los reactivos que se emplearon en el presente trabajo fueron de alta pureza. Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 110 °C y 15 libras de presión durante 25 minutos. Las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtrado (filtro Millipore HA 0.25 µm). Los medios de cultivo con agar se vaciaron calientes en las cajas de Petri (25 ml/caja) y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

- **Medio Luria (LB)**

- Bacto triptona 10.0 g
- Extracto de levadura 5.0 g
- Cloruro de Sodio 10.0 g
- Timina 0.002 gr.
- Hidróxido de Sodio 2.5 N (1.0 ml)
- Agua desionizada cbp 1000 ml

pH final 7.0

• **Medio en placa de agar semisólido (L1)**

- Bacto agar 20 g
- Medio LB cbp 1000 ml

• **Placas con antibióticos**

Quando se usó algún antibiótico en las placas de agar, éste se agregó después de esterilizar al medio. Los antibióticos que se usaron y sus concentraciones fueron:

- Estreptomicina (200 µg/ml)
- Acido nalidixico (20 µg/ml)

• **Placas de medio mínimo (M1)**

- Cloruro de Amonio 1.0 g
- Fosfato de Potasio 3.0 g
- Fosfato de Sodio monobásico hidratado 6.0 g
- Cloruro de Sodio 0.5 g
- Bacto agar 20.0 g
- Dextrosa 20% 10 ml
- Sulfato de Magnesio 25% 1.0 ml
- Vitamina B1 0.1% 0.16 ml
- Agua desionizada cbp 1000 ml

• **Medio mínimo (M5)**

Medio M1 con la adición de:

-Treonina 20 µg/ml

-Leucina 20 µg/ml

• **Medio mínimo (M7)**

- Medio M1 con la adición de:

- Histidina 20 µg/ml

- Leucina 20 µg/ml

- Treonina 20 µg/ml

• **Medio mínimo (M12).**

Medio mínimo M1 con la adición de:

- Histidina 20 µg/ml

- Leucina 20 µg/ml

- Metionina 20 µg/ml

- Prolina 20 µg/ml

- Timina 20 µg/ml

- Arginina 20 µg/ml

- **Medio en Placa McConkey.**

- Medio McConkey 50 g

- Agua desionizada cbp 1000 ml

- **Medio para almacenar cepas en condiciones de microaerofilia (STAB)**

- Medio nutritivo (Difco) 1.0 g

- Cloruro de Sodio 0.8 g

- Bacto agar 0.6 g

- Triptofano 20 µg/ml

- Agua desionizada cbp 100 ml

- **Medio para fijar cepas en cubreobjetos**

- 0.2 g agarosa

- Agua desionizada cbp 100 ml

SOLUCIONES PARA ANALISIS ELECTROFORETICO DE PROTEINAS RADIOMARCADAS

- **Solución Laemmli**

- Glicerol 10%

- SDS 2.3%

- Tris-HCl pH 6.8 0.0625 M

Apéndice

- Azul de Bromofenol 0.001%

- β - Mercaptoetanol 5.0%

• **Inhibidor de proteasas**

- Floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10mM en isopropanol

• **Solución Acrilamida-bisacrilamida**

- Acrilamida 30 g

- Bis-acrilamida 0.8 g

- Agua desionizada cbp 100 ml

Guardar en la oscuridad a 4°C

• **Tris- HCl 1.5 M pH 8.8**

- Tris-HCl 181.65 g

- Agua desionizada cbp 100 ml

• **Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10%**

• **Tris- HCl 0.5 M pH 6.8**

- Tris-HCl 60.55 g

- Agua desionizada cbp 100 ml

- **Persulfato de amonio 10%**

- **N,N,N',N'- Tetrametilendiamina (TEMED) 0.05%**

- **Amortiguador de corrida Laemmli**
 - Tris-HCl base 0.025 M
 - Glicina 0.192 M
 - SDS 10% 10 ml
 - pH 8.4
 - agua desionizada cbp 1000 ml

- **Marcador de peso molecular de intervalo amplio (Bio-Rad)**
 - Marcador de peso molecular 1 µl
 - Laemmli 20 µl

PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

	MINIGEL 10% (7 cm X 10 cm)	GEL 11% (10 cm X 14 cm)
• Gel separador (inferior)		
- Agua desionizada	2.10 ml	12.38 ml
- Tris 1.5 M pH 8.8	1.25 ml	3.12 ml

Apéndice

- SDS 10%	5 0 µl	250 µl
- Acrilamida- Bisacrilamida	1.66 ml	9.15 ml
- Persulfato de amonio 10%	12.5 µl	100 µl
- TEMED	2.5 µl	4 µl

MINIGEL 10%

GEL 11%

• **Gel concentrador (superior)**

- Agua desionizada	3.45 ml	3.77 ml
- Tris 0.5 M pH 6.8	1.25 ml	0.625 ml
- SDS 10%	50 µl	50 µl
- Acrilamida- Bisacrilamida	0.665 ml	0.5 ml
- Persulfato de amonio 10 %	0.25 µl	80 µl
- TEMED	5 µl	4 µl

• **Solución colorante para proteínas**

- Metanol 40%
- Acido acético 10%
- Azul de Coommasie 0.1 %

• **Solución para desteñir geles**

- Acido acético glacial 10%

SOLUCIONES PARA TINCION DE PLATA

- **Solución A para desteñir geles con Azul de Coomasie**

- Acido acético 7.5 ml
- Metanol 45 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

- **Solución B desteñidora**

- Acido Acético 7 ml
- Metanol 50 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

- **Solución C desteñidora**

- Metanol 50 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

- **Solución teñidora**

- Nitrato de Plata 0.8 g
- Agua destilada 4 ml
- Hidróxido de Sodio 0.36% 21 ml
- Hidróxido de Amonio 13 M 1.3 ml

Se mezclaron los dos hidróxidos y se agregó el nitrato de plata gota a gota en agitación constante.

- **Solución reveladora**

- Acido cítrico 1% 2.5 ml
- Formadehido 37% 0.25 ml
- Agua destilada cbp 500 ml

- **Solución para freno del revelado**

- Acido acético glacial 10 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

SOLUCIONES PARA FLUOROGRAFIA

- **Dimetil Sulfóxido (DMSO)**

- **Líquido de centelleo**

- 2,5- difeniloxazol (PPO) 22%
- DMSO 100 ml

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOTTING

- **Anticuerpo AntiGroEL**

Este anticuerpo fue cedido por el Dr. Raúl Mancilla (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Es un anticuerpo policlonal

monoespecífico que se obtuvo al inyectar proteína GroEL (60 kDa.) de *Mycobacterium tuberculosis* en ratón.

• **Amortiguador de transferencia**

- Tris base 3.0 g
- Glicina 14.48 g
- Metanol 200 ml
- Agua destilada cbp 100 ml

pH final 8.3

• **Amortiguador de Fosfatos-Salina (PBS)**

- Fosfato de Sodio anhidro 2.044 g
- Fosfato de Sodio monobásico hidratado 0.772 g
- Cloruro de Sodio 14.8 g
- Agua desionizada cbp 2000 ml

pH final 7.2

• **Solución para lavar**

- Monolaurato de plioxietilén sorbitan (Tween 20) 0.3%
- PBS 100 ml

- **Solución bloqueadora**

- Albúmina de suero de bovino (BSA) 3%

- PBS- Tween 20 0.3% 100 ml

- **Proteína A de *Staphylococcus aureus* conjugada a biotina (Amersham)**

- **Conjugado de Estreptavidina- Peroxidasa de rábano (Amersham)**

- **Solución reveladora (sustrato para la Peroxidasa)**

- 4-Cloro-1- naftol 30 mg

- Metanol 10 ml

- PBS 50 ml

- Peróxido de Hidrógeno (30%) 50 μ l

Se disuelve primero el o- cloronaftol en el metanol y después poco a poco se le añade el PBS. Inmediatamente antes de usarla se le agrega el peróxido de hidrógeno.

LITERATURA CITADA

Abravaya, K., B. Phillips y R. I. Morimoto (1991) Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factor and the human *hsp70* promoter examined by *in vivo* footprinting. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 586-592.

Aschburner, M. y J.J. Bonner. (1979) The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* **17**, 241-254.

Bachman, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* **36**, 525- 557.

Bachman, B.J. (1987) Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K12. En: Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low., B. Magasanick, M. Schaechter y H.E. Umbarger. (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. pp. 1190-1219.

Baker, T.A., A.D. Grossman y C.A. Gross (1984) A gene regulating the heat shock response in *Escherichia coli* also affects proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6779-6783.

Bhagwat, A., A. Sohail y J. Roberts (1986) Cloning and characterization of *dcm* locus of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **166**, 751-755.

- Bloom, M., S. Skelly, R. VanBogelen, F. Neidhardt, N. Brot y H. Weissbach (1986) *In vitro* effect of the *Escherichia coli* heat shock regulatory protein on expression of heat shock genes. *J. Bacteriol.* **166**, 380-384.
- Bonner, W.M. y R.A. Laskey (1974) A film detection method for tritium- labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-86.
- Boulikas, T. (1994) A compilation and classification of DNA binding sites por protein transcription factors from vertebrates. *Crit. Rev. in Eukaryot. Gene Exp.* **4**, 117-321.
- Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**, 671-180
- Bukau, B., P. Reilly, J. McCarty y G.C. Walker (1993) Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. *J. Gen Microbiol.* **139**, 95-99.
- Bukau, B. y G. Walker (1990) Mutations altering heat shock specific subunit of RNA polymerase suppress major cellular defects of *E. coli* mutants lacking the DnaK chaperone. *EMBO J.* **9**, 4027-4036.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Burton, Z.F., C.A. Gross, K.K. Watanabe y R.R. Burges (1983) The operon that encodes the sigma subunit of RNA polymerase also encodes ribosomal protein S21 and DNA primase in *E. coli* K-12. *Cell* **32**, 335- 349.
- Chuang, S.E. y F.R. Blattner (1993) Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 5245-5252.
- Cooper, S.T. y T. Ruettinger (1975) A temperature sensitive nonsense mutation affecting the synthesis of a major protein of *E. coli* K12. *Mol Gen. Genet.* **139**, 167- 176.
- Cowing, D.W., J.C.A. Bardwell, E.A. Craig, C. Woolford, R.W. Hendrix y C.A. Gross (1985) Consensus sequence for *E. coli* heat shock gene promoter. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* **82**, 2679-2683.
- Cozzarelli, N.R. (1980) Dna gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**, 953-960.
- Craig, E.A. y C.A. Gross (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? *TIBS* **16**, 135- 140.

Literatura Citada

Crickmore, N. y G.P. Salmond (1986) The *Escherichia coli* heat shock regulatory gene is immediately downstream of a cell division operon: the *fam* mutation is allelic with *rpoH*. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 535-539.

Darnell, J., H. Lodish y D. Baltimore (1990) Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. N.Y. pp. 481-482, 983.

DiDomenico, B.J., G.E. Bugaisky y S. Lindquist (1982 a) The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Cell* **31**, 593- 603.

DiDomenico, F.J., G.E. Bugaisky y S. Lindquist (1982 b) Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6181-6185.

Duncan, R.F. y J.W.B. Hershey (1989) Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J. Cell Biol.* **109**, 1467- 1481.

Ellis, R.J. y van der Vies, S.M. (1991) Molecular chaperones. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.

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

Erikson, J.W., V. Vaughn, W.A. Walter, F. C. Neidhardt y C.A. Gross (1987) Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* **1**, 419- 432.

Fisher, G.A., R.L. Anderson y G.M. Hahn (1986) Glucocorticoid-induced heat resistance in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* **128**, 127-132.

Fuge, E.K. y S.B. Farr (1993) AppppA-binding protein E89 is the *Escherichia coli* heat shock protein ClpB. *J. Bacteriol.* **175**, 2321-2326.

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

Georgopoulos, C.D., D. Ang, A. Maddock, S. Raina, B. Lipinska y M. Zylicz (1990) Heat shock response of *Escherichia coli*. En: K. Drlica y M. Riley (eds). The Bacterial Chromosome. Washington, DC. Am. Soc. Microbiol. pp 405-419.

Literatura Citada

Glover, C.V.C. (1982) Heat shock induces rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 1781-1785.

Goff, S.A. y A.L. Goldberg (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates a transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**, 587-595.

Gottesman, S., P. Trisler, A. Torres-Cabassa y R. Maurizi (1985) Regulation via proteolysis: the *Escherichia coli* *lon* system. En: Leive L. (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology. pp.350-354.

Gross, C.A., F.R. Blattner, W.E. Taylor, P.A. Lowe y R.R. Burgess (1979) Isolation and characterization of transducing phage coding for sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5789- 5793.

Gross, C.A., D.B. Straus, J.W. Drikson y T. Yura (1990) The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. En: Morimoto, T., A. Tissieres Y C. Georgopoulos (eds) *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor, NY. pp. 167-189.

Grossman, A.D., J.W. Erikson y C.A. Gross (1984) The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat shock promoters. *Cell* **38**, 383-390.

Grossman, A.D., D.B. Straus, W.A. Walter y C.A. Gross (1987) σ^{32} synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *E. coli*. *Genes Dev.* **1**, 179-184.

Hackett, R.W. y F. T. J. Lis (1983) Localization of the *hsp83* transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus of *D. melanogaster*. *Nucleic Acid. Res.* **11**, 7011-7030.

Hahn, G.M y G.C. Li (1990) Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization. En: Morimoto, R.I., A. Tissiers y C. Georgopoulos. *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 79-100.

Hanahan, D.C. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Hendrick, J.P. y F. U. Hartl (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Ann. Rev Biochem* **62**, 349-384.

Herendeen, S.L. R. VanBogelen y F.C. Neidhardt (1979) Levels of major protein of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**, 185-194.

Literatura Citada

- Herman, G.E. y P. Modrich (1982) *Escherichia coli* dam methylase. *J. Biol. Chem.* **257**, 2605-2612.
- Holmgren, R., V. Corces, R. Morimoto, R. Blackman y M. Meselson (1981) Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3775- 3778.
- Hunt, C. y R. Morimoto (1985) Conserved features of eukariotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6455-6559.
- Ingraham, J. (1987) Effect of temperature, pH, water, activity and pressure on growth. En: Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanick, M. Schaechter y H.E. Umbarger. (eds) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. pp. 1543- 1554.
- Jenkins, D.E., E.A. Auger y A. Martin (1991) Role of *rpoH*, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* **173**, 1992-1996.
- Johnson, W.C., C.P. Jr. Moran y R. Losick (1983) Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature* **302**, 800- 804.
- Kamath-Loeb, A.S. y C.A. Gross (1991) Translational regulation of σ^{32} synthesis: requirement for an internal control element. *J. Bacteriol.* **173**, 3904-3906.
- Kaul, S.C. (1990) Effect of heat shock on growth and division of *Styloynchia amytillus*. *Biochem. Cell. Biol.* **69**, 23-28.
- Keene, M.A., V. Corces, K. Lowenhaupt y S.C.R. Elgin (1981) DNAsa I hypersensitive sites in *Drosophila* chromatin occur at the 5' ends of region of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 143- 146.
- Kenyon, C.J., R. Brent, M. Ptashne y G.C. Walker (1982) Regulation of damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **160**, 445- 457.
- Krebs, C.J. (1985) Crecimiento de las poblaciones. En: Krebs, C.J. Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia. Harla. México. pp. 199-227.
- Krüger, C. y B. Benecke (1981) *In vitro* translation of *Drosophila* heat- shock and non-heat shock mRNAs in heterologous and homologous cell-free systems. *Cell* **23**, 595- 603.

Kusukawa, N. y T. Yura (1988) Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* **2**, 874-882.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Landick, R.A., V. Vaughn, E.T. Lau, R.A. VanBogelen, J.W. Erikson y F.C. Neidhardt (1984) Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests that its protein product may be a transcription factor. *Cell* **38**, 175-182.

LaRossa, R.A. y T.K. Van Dyk (1991) Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalyst of protein folding or macromolecular sponges? *Mol. Microbiol.* **5**, 529-534.

Lee, P.C., B.R. Bochner y B.N. Ames (1983) AppppA, heat-shock stress and cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7496-7500.

Lee- Rivera, I. y M.C. Gómez- Eichelmann (1994) *Escherichia coli* cell with mutation in the gene for adenylated cyclase (*cya*) exhibits a heat shock response. *Fems Microbiol. Lett.* **121**, 35-38.

Liberek, K., J. Marszaleck, D. Ang, C. Georgopoulos y M. Zylicz (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2874- 2878.

Liberek, K., T.P. Galitshi, M. Zylicz y C. Georgopoulos (1992) The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the σ^{32} transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3516-3520.

Liberek, K. y C. Georgopoulos (1993) Autoregulation of the *Escherichia coli* heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11019-11023.

Lindquist, M.S., S. Henikoff y M. Meselson (1975) Localization of RNA from heat-induced polysomes at puffs sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1117-1121

Lindquist, S. (1986) The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem* **55**, 1151- 1191.

Marinus, M.G. y N.R. Morris (1975) Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (*dam-3*) in *Escherichia coli* K12. *Mutation Res.* **28**, 15-26.

Literatura Citada

Martin, J.A. y F.U. Hartl (1992) Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science* **258**, 995- 998.

McCarty, J.S. y G.C. Walker (1991) DnaK as thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9513-9517.

Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Lab. (Ed.) New York 466 pp.

Missiakas, D., C. Georgopoulos y S. Raina (1993) The *Escherichia coli* heat shock gene *htpY*: mutational analysis, cloning, sequencing and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **175**, 2613-2624.

Morimoto, R.I., K.D. Sargeš y K. Abravaya (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 21987- 21990.

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

Nagai, H., H. Yuzawa, M. Kanemori y T. Yura (1994) A distinct segment of the sigma 32 polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10282-10284.

Neidhardt, F.C. (1987) Multigene systems and regulons. En: Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, Brooks-Magasanick, M. Shaechter y H.E. Umbarger. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. pp. 1313-1317.

Neidhardt, F.C., L. Bloch, S. Peterson y S. Reeh (1977) Chemical measurement of steady state levels of ten aminoacyltransfer ribonucleic acid synthetases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **129**, 378-387.

Neidhardt, F.C. y R.A. VanBogelen (1981) Positive regulatory gene for temperature-controlled protein in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 894-900.

Neidhardt, F.C. y R.A. VanBogelen. (1987) Heat shock response. En: Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanich, M. Shaechter y H.E. Umbarger. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. pp. 1326-1333.

Literatura Citada

- Neidhart, F.C., R.A. Van Bogelen y E.T. Lau (1982). The high- temperature regulon in *Escherichia coli*. En: Schlesinger, M.J., M. Aschburner y A. Tissieres. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Lab, N.Y. pp. 139-145.
- Neidhardt, F.C., R.A. VanBogelen y E.T. Lau (1983) Molecular cloning and expression of a gene that controls the high- temperature regulon of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **153**, 597- 603.
- Neidhardt, F.C., R.A. VanBogelen y V. Vaughn (1984) The genetic and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **18**, 295-329.
- Newlands, J.T., T. Gaal, J. Meesus y R.L. Gourse (1993) Transcription of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 by the heat shock RNA polymerase ($E\sigma^{32}$) in vitro. *J. Bacteriol.* **175**, 661-668.
- Osawa, T. y T. Yura (1981) Effects of reduced amount of RNA polymerase sigma factor on gene expression and growth of *Escherichia coli*. Studies of the *rpoD40* (ambar) mutation. *Mol Gen. Genet.* **184**, 166-173.
- Paek, K. H. y G.C. Walker (1987) *Escherichia coli* *dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* **169**, 283-290.
- Parsell, D.A. y R.T. Sauer (1989) Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on a protein level not protein degradation. *Gene. Dev.* **3**, 1226-1232.
- Pechan, P.M. (1991) Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS Lett.* **280**, 1-4.
- Pederson, D.S. y T. Fidrych (1994) Heat shock factor can activate transcription while bound to nucleosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 189-199.
- Pelham, H.R.B. (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* **30**, 517-528.
- Peruski, L.F. Jr. y F.C. Neidhardt (1994) Identification of a conditionally essential heat shock protein in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 165-172.
- Raina, S. y C. Georgopoulos (1990) A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only a high temperatures. *J. Bacteriol.* **172**, 3417- 3426.
- Raina, S., M. Leanne y C. Georgopoulos (1991) The *Escherichia coli* *htrP* gene product is essential for bacterial growth at high temperatures: mapping, cloning, sequencing, and transcriptional regulation of *htrP*. *J. Bacteriol.* **173**, 5999-6008.

Literatura Citada

Raina, S., D. Misiakias y C. Georgopoulos (1995) The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**, 1043-1045.

Ramirez- Santos, J. (1993) Distribución de adeninas y citosinas metiladas en el DNA de *Escherichia coli* K12 y su metilación durante estrés calórico. Tesis Maestría. Fac. Ciencias, UNAM. 83 pp.

Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571- 573.

Ron, E.Z. y B.D. Davis (1971) Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine. *J. Bacteriol.* **107**, 391-396.

Rouviere, P.E., A. De Las Peñas, J. Mecsas, C.Z. Lu, K.E. Rudd y C.A. Gross (1995) *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**, 1032-1042.

Russnak, R.H., D. Jones y E.P.M. Candido (1983) Cloning and analysis of cDNA sequences coding for two 16 kilodalton heat shock proteins (hsps) in *Caenorhabditis elegans*: homology with the hsp of *Drosophila*. *Nucleic Acid. Res.* **11**, 3187-3205.

Sain, B. y N.E. Murray (1980) The *hsd* (host specificity) genes of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **180**, 35-46.

Saito, H. y H. Uchida (1978) Organization and expression of the *dnaJ* an *dnaK* genes of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **164**, 1-8.

Scharf, K.D. y L. Nover (1982) Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* **30**, 427-437.

Sherman, M.Y. y A.L. Goldberg (1993) Heat shock of *Escherichia coli* increases binding of *dnaK* (the *hsp70* homolog) to polypeptides by promoting its phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8648-8652.

Sherman, M.Y. y A.L. Goldberg (1994) Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 31479-31483.

Shi, W., Y. Zhou, J. Wild, J. Adler y C.A. Gross (1992) DnaK, DnaJ and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 6256- 6263.

- Smith, H.S. y A.B. Pardee (1970) Accumulation of a protein required for division during the cell cycle of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **101**, 901-909.
- Sorger, P.K. (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* **65**, 363-366.
- Straus, D.B., W.A. Walter y C.A. Gross (1987) The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* **329**, 348-351.
- Straus, D.B., W.A. Walter y C.A. Gross (1990) DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Gene Dev.* **4**, 2202-2209.
- Subramanian, A.R., C. Haase y M. Giesen (1976) Characterization of a growth weight protein associated with *Escherichia coli* ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **67**, 591-601.
- Takano, R. y T. Kaffefuda (1972) Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid. *Nature New Biol.* **239**, 34-37.
- Tanguay, R.M. (1983) Genetic regulation during heat shock and function of heat-shock proteins: a review. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **61**, 387-394.
- Tatti, K.M. y C.P. Jr. Moran (1985) Utilization of one promoter by two forms of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Nature* **314**, 190-192.
- Taylor, W.E., D.B. Straus, A.D. Grossman, Z.F. Burton, C.A. Gross y R. Burgess (1984) Transcription for a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Cell* **38**, 371- 381.
- Tilly, K., N. McKittrick, M. Zyliczy y C. Georgopoulos (1983) The DnaK proteins modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell* **34**, 641-646.
- Towbin, H., T. Staehelin y J. Gordon (1979) Electrophoretic transfers of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tsuchido, T., R.A. VanBogelen y F.C. Neidhardt (1986) Heat shock response in *E. coli* influences cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6959-6963.
- VanBogelen, R.A., V. Vaughn y F.C. Neidhardt (1983). Gene for heat-inducible lysil-tRNA synthetase (*lysU*) maps near *cadA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**, 1066-1068.

VanBogelen, R.A. y F.C. Neidhardt (1990) Ribosomes as sensor of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5589- 5593.

Velázquez, J.M., S. Sonoda, G. Bugaisky y S. Lindquist (1983) Is the mayor *Drosophila* heat shock protein present in cell that have not been heat shocked? *J. Cell Biol.* **96**, 386-290.

Velázquez, J.M. y S. Lindquist (1984) hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* **36**, 655-662.

Voet, D. y J.G. Voet (1990) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 879-880.

Wada, C., M. Imai y T. Yura (1987) Host control of plasmid replication requirement for the σ factor σ^{32} in transcription of mini-F replication initiator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8849-8853.

Wada, M. y H. Itikawa (1984) Participation of *Escherichia coli* K-12 *groE* gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA. *J. Bacteriol.* **157**, 694- 696.

Wadsworth, S., E.A. Craig y B.J. McCarthy (1980) Genes for three *Drosophila* heat-shock-induced proteins at a single locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2134-2137.

Wang, P.Z. y R.H. Doi (1984) Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* σ^{55} and σ^{37} RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *J. Biol. Chem.* **259**, 8619- 86125.

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

Wang, Q. y J.M. Kaguni (1989 b) A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 4248- 4253.

Wu, B., D. Ang, M. Snavely y C. Georgopoulos (1994) Isolation and characterization of point mutations in the *Escherichia coli* *grpE* heat shock gene. *J. Bacteriol.* **176**, 6965-6973.

Yamamori, T. y T. Yura (1980) Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control. *J. Bacteriol.* **142**, 843-851.

Yamamori, T. y T. Yura (1982) Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *E. coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 860-864.

Literatura Citada

Yamamori, T. T. Osawa, T. Tobe, K. Ito y T. Yura. (1982) *Escherichia coli* gene (*hin*) controls transcription of heat-shock operons and cell growth at high temperatures. En: Schlesinger, M. J., M. Ashburner y A. Tissieres. Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Lab. pp. 131-137.

Yano, R., H. Nagai, K. Shiba y T. Yura (1990) A mutation that enhances synthesis of σ^{32} and suppresses temperature-sensitive growth of the *rpoH15* mutant of *Escherichia coli* J. *Bacteriol.* **172**, 2124-2130.

Young, D.B. y T.R. Garbe (1991) Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity.* **59**, 3086-3093.

Yura, T., H. Nagai y H. Mori (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 321-350.

Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori y T. Yura (1993) Heat induction of sigma 32 synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids. Res.* **21**, 5449-5455.

Zhou, Y.N., N. Kusakawa, J.W. Erikson, C.A. Gross y T. Yura (1988) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32} . *J. Bacteriol.* **170**, 3640-3649.