

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Papel de las chaperonas moleculares en la resistencia al daño ocasionado por el estrés oxidativo en *Escherichia coli*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARÍA LUISA SANDOVAL ROMERO

MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

AGOSTO 2005.

m. 347315



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado asignado

Presidente	Profra. Bertha Reséndiz Vázquez
Vocal	Prof. Elpidio García Ramírez
Secretario	Prof. Jorge Membrillo Hernández
1er suplente	Prof. José I. Páramo Ramírez
2do suplente	Prof. David Guillermo Mendoza Cozatl

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM



Asesor:

Dr. Jorge Membrillo Hernández



Sustentante

María Luisa Sandoval Romero

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas aquellas personas que estuvieron y están presentes en mi vida durante esta gran experiencia. Con esto concluyo una etapa más de mi vida y espero con toda mi alma que esas mismas personas que me han ayudado brindándome su amistad, apoyo, confianza y paciencia, sigan presentes durante mucho tiempo más.

Gracias Ángeles Romero, mi madre (tú siempre has sido mi ejemplo a seguir; te admiro); gracias hermanos, Sergio, Ángeles y Rosario. Los quiero. Gracias a Sergio Sandoval, mi padre.

Miguel, formas una parte esencial en mi vida. Que nada nos separe nuevamente. Te amo.

Abuelas: Margarita y Rosa, me siento orgullosa de formar parte de su familia.

Tíos Tere, Rodrigo y Jorge: el apoyo brindado a mi familia me ha ayudado en muchísimos aspectos personales. Muchas gracias.

A mis grandes amigos Katy, Hebe, Mago y Paco les doy gracias por nunca dejarme sola (realmente son los mejores).

Eli, Tecilli y Nora, el conocerlas me ayudó muchísimo. Sin su apoyo y amistad todo hubiera sido más difícil. Gracias.

Don Miguel Páez Silva, muchísimas gracias por su ayuda y su sonrisa. Gracias Sra. Julia Granados.

Dr. Jorge Membrillo-Hernández, gracias por su confianza, apoyo y guía. Es un gran maestro. Gracias por permitirme formar parte de su equipo. Fue una experiencia inolvidable y muy enriquecedora.

Gracias a las instituciones que otorgaron los donativos que hicieron posible la realización del proyecto. Al CONACyT proyecto 42580-Q y al PAPIIT-UNAM proyecto 207703.

RESUMEN

El estrés oxidativo se ha definido como un desbalance entre la producción y desecho de especies reactivas de oxígeno a favor de su producción. Dicho desbalance se ha asociado con el envejecimiento celular y carcinogénesis, también se le ha involucrado con diferentes padecimientos como el Alzheimer. El estrés oxidativo puede dañar todas las estructuras celulares ocasionando que gran parte de las funciones normales de la célula no se lleven a cabo. Es por ello que los organismos tienen sistemas de defensa que ayudan a hacer frente a este tipo de estrés. En *Escherichia coli* se ha estudiado la respuesta genética al estrés oxidativo en la cual están involucrados dos regulones: *oxyR* y *soxRS*. Sin embargo, recientemente se ha descrito la participación de algunas chaperonas moleculares en la protección de proteínas ante estrés oxidativo, con lo cual se ha abierto un campo de estudio bastante promisorio.

Es muy importante hacer notar que el hábitat natural de *Escherichia coli* es el tracto gastrointestinal de mamíferos, lo que implica que mucha de su existencia se da en condiciones anaeróbicas y en fase estacionaria de crecimiento. A pesar de esto, no han sido aún reportados estudios de la respuesta al choque térmico de *Escherichia coli* bajo condiciones anaeróbicas .

En esta Tesis se pretende avanzar en el conocimiento sobre la participación de los factores sigma H, σ^H , (factor sigma involucrado en la inducción de síntesis de chaperonas en respuesta a estrés térmico) y sigma S, σ^S , (factor sigma involucrado en la inducción de genes específicos de fase estacionaria de crecimiento en respuesta a condiciones de inanición y estrés en general) durante condiciones de estrés térmico y oxidativo en aerobiosis y anaerobiosis.

Los resultados de este estudio utilizando diferentes cepas mutantes mostraron que la síntesis de proteínas de choque térmico se sostiene durante un periodo más largo de tiempo bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento que en condiciones aeróbicas; una mutación en el gene *rpoS* resulta en una incrementada sensibilidad al estrés oxidativo bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento. Una mutante en el gene *rpoH* crecida anaeróbicamente mostró un incremento en la sensibilidad al choque térmico pero únicamente en fase exponencial de crecimiento.

ABSTRACT

Oxidative stress has been defined as the lost in the balance between the production and disposal of reactive oxygen species favouring the production. This imbalance has been associated with cellular ageing and carcinogenesis, it has also been involved in several diseases such Alzheimer. The oxidative stress can damage all cellular structures causing disruption of many cellular processes. For these reasons, all organisms posses defence mechanisms against the oxidative damage. In *Escherichia coli*, two genetic responses to oxidative stress have been described: the *oxyR* and *soxRS* regulons. In addition, recent studies have proposed the involvement of some molecular chaperones in the protection of proteins against oxidative damage. These findings have opened a novel field of research.

It is important to note that, as the natural living style of *Escherichia coli* occurs in the gastrointestinal tract, much of its existence is spent under anaerobic conditions and in stationary phase of growth. Despite this, studies on the genetic heat shock response under anaerobic conditions of the facultative bacteria *Escherichia coli* have yet to be reported.

The present work was focused on the understanding of the role of the sigma factors σ^H (sigma factor of RNA polymerase involved in the induction of molecular chaperones) and σ^S (sigma factor involved in the induction of síntesis of stationary phase specific genes) under aerobic and anaerobic heat and oxidative stresses.

Our studies using different mutant strains showed that the heat shock response is sustained for a longer period of time under anaerobic growth conditions than in the presence of oxygen and that a mutation in *rpoS* renders the bacterium sensitive to oxidative stress under anaerobic growth conditions. Interestingly, an *rpoH* mutant growing anaerobically shows an increase sensitivity to heat shock but only in exponentially phase of growth.

PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES

Presentaciones

- Seminario departamental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Junio 20, 2005).
Título: Papel de los factores RpoH y RpoS en la resistencia al estrés térmico y al estrés oxidativo en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de fase exponencial y estacionaria de crecimiento en *Escherichia coli*.
- Díaz- Acosta, a., Sandoval-Romero, L., Membrillo-Hernández, J., “DnaK (Hsp70) protection of aerobic AdhE (ethanol oxidoreductase) activity from oxidative inactivation requires the apoenzyme AcnB (Aconitase B) in *Escherichia coli* K-12”. 2005 EMBO-FEBS Workshop on Biology of Molecular Chaperones que se llevó a cabo en Zakopane, Polonia en Mayo del 2005.

Publicación en proceso:

Sandoval-Romero, L., Díaz-Acosta, A., Membrillo-Hernández, J. Heat shock response in *Escherichia coli* under stationary phase and anaerobic grow conditions. *Archives of Microbiology*.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	vii
Índice de Tablas.....	x
Índice de Figuras.....	x
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	
I.I Estrés oxidativo (EO).....	1
I.I.I Definición de EO.....	1
I.II Papel del EO en diversos procesos biológicos.....	2
I.II.I Efectos de las ERO en los sistemas biológicos.....	2
I.III Mecanismos de protección ante el EO.....	3
I.IV Mecanismos de protección ante el EO en la bacteria <i>Escherichia coli</i>	4
I.IV.I El regulón OxyR.....	5
I.IV.II El regulón SoxRS.....	5
I.IV.III Glutarredoxinas y tiorredoxinas.....	6
I.IV.IV Chaperonas moleculares.....	7
I.V Sistema global de regulación de la respuesta al estrés térmico en <i>E. coli</i>	8
I.V.I Chaperonas moleculares. Definición.....	9
I.V.II Clasificación de chaperonas moleculares.....	9
I.V.III Función de las chaperonas.....	11
I.V.IV Papel de las chaperonas moleculares en el estrés celular.....	12
I.VI Justificación de este proyecto de investigación.....	13
I.VII Objetivo general.....	14
I.VIII Objetivo específico.....	14

<Capítulo II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.I Cepas bacterianas.....	15
II.II Medios y condiciones de cultivo.....	15
II.II.I Medio LB.....	15
II.II.II Medio Mínimo con glucosa al 0.2% y 19 aminoácidos (MM-19aa).	16
II.II.III Medio de dilución (MD).....	16
II.III Métodos de fisiología bacteriana.....	16
II.III.I Curva de crecimiento.....	16
II.III.II Cuentas viables.....	17
II.IV Marcaje radiactivo.....	18
II.IV.I Obtención de cultivos.....	18
II.IV.II Electroforesis.....	19
II.IV.III Tinción y secado de los geles.....	20
II.IV.IV Exposición de los geles y revelado.....	21

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.I Curvas de crecimiento.....	22
III.II Viabilidad de las cepas MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>) y BB7224 (<i>rpoH</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en aerobiosis y anaerobiosis.....	23
III.II.I Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (<i>rpoH</i>) bajo estrés térmico (ET) y oxidativo (EO) en aerobiosis.....	24
III.II.II Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (<i>rpoH</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en anaerobiosis.....	25
III.II.III Análisis de resultados.....	26
III.II.IV Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (<i>rpoS</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en aerobiosis.....	27
III.II.V Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (<i>rpoS</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en anaerobiosis.....	28
III.II.VI Análisis de resultados.....	29

III.III Cinéticas de marcaje radiactivo.....	30
III.III.I Cinética de síntesis proteica de MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>) y BB7224 (<i>rpoH</i>) y ante ET en aerobiosis.....	30
III.III.II Análisis de resultados.....	32
III.III.III Cinética de síntesis proteica de MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>) y BB7224 (<i>rpoH</i>) ante ET en anaerobiosis.....	33
III.III.IV Análisis de resultados.....	34
 Capítulo IV. DISCUSIÓN	
IV.I Discusión general.....	35
 Capítulo V. REFERENCIAS.....	39

ABREVIATURAS

Todas las abreviaturas empleadas en este trabajo se enlistan a continuación; las no mencionadas son acorde a la Sociedad Bioquímica del Reino Unido. (*Biochem. J.* (1991) **273**: 1-19)

EO	Estrés oxidativo
ET	Estrés térmico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
kDa	kilo Daltons
HSP	Heat Shock Proteins
σ	Factor sigma de la RNA polimerasa
σ^S	Factor sigma S
σ^H	Factor sigma H
OD _{600nm}	Densidad Óptica
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MM	Medio Mínimo
MD	Medio de Dilución
rpm	Revoluciones por minuto
aa	Aminoácidos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TA	Temperatura Ambiente

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales familias de chaperonas en <i>E. coli</i>	11
Tabla 2 Cepas bacterianas.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 sistemas globales de regulación genética OxyR y SoxRS.....	6
Figura 2. Funcionamiento esquematizado de los diferentes tipos de chaperonas presentes en <i>E. coli</i>	10
Fig. 3.1 Cinéticas de crecimiento de las cepas MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>) y BB7224 (<i>rpoH</i>) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de crecimiento....	22
Fig. 3. 2 Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (<i>rpoH</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en aerobiosis.....	24
Fig. 3. 3 Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (<i>rpoH</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en anaerobiosis.....	25
Fig. 3. 4 Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (<i>rpoS</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en aerobiosis.....	27
Fig. 3. 5 Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (<i>rpoS</i>) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en anaerobiosis.....	28
Fig. 3.6 Cinéticas aeróbicas de síntesis de proteínas de las cepas MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>) y BB7224 (<i>rpoH</i>) ante estrés térmico en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.....	31
Fig. 3.7 Cinéticas anaeróbicas de síntesis de proteínas de las cepas MC4100, JMH0039 (<i>rpoS</i>)y BB7224 (<i>rpoH</i>) ante estrés térmico en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.....	33

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

I.1 Estrés oxidativo

I.1.1 Definición

Los primeros seres vivos que aparecieron en nuestro planeta lo hicieron bajo una atmósfera reductora. Con la aparición de los microorganismos fotosintéticos, la atmósfera primitiva comenzó a sufrir cambios importantes al acumular O_2 en el ambiente como resultado de este proceso biológico. La acumulación progresiva de esta molécula ocasionó que los microorganismos evolucionaran hacia un metabolismo aeróbico en el cual tuvieran la capacidad de utilizar O_2 para producir energía (Lengeler *et al.*, 1999).

El utilizar O_2 resultó benéfico en el aspecto energético para estos organismos, sin embargo, la reducción en la cadena respiratoria de esta molécula a H_2O genera inevitablemente especies reactivas de oxígeno (ERO) como el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y como resultado de la reacción de Fenton, radicales libres hidroxilo ($HO\cdot$) los cuales pueden reaccionar irreversiblemente con los diferentes componentes celulares poniendo en peligro la viabilidad celular. Se ha acuñado el término **paradoja del oxígeno** para aludir precisamente a la dualidad de efectos del oxígeno en los sistemas biológicos.

El término **estrés oxidativo** fue introducido por Sies para referirse a una situación en la que existe un desequilibrio entre los niveles de ERO y las defensas antioxidantes celulares (Sies, 1991). Actualmente el estrés oxidativo se define

como “un desbalance entre la producción y el desecho de las ERO a favor de su producción” (Sies, 1991).

Existen dos situaciones que conducen a estrés oxidativo: 1) Niveles bajos de defensas antioxidantes, lo que sucedería si se dieran mutaciones que afecten a enzimas tales como las superóxido dismutasas o las catalasas y, 2) un incremento en los niveles ERO.

I.II Papel del estrés oxidativo en diversos procesos biológicos

El estrés oxidativo ha sido involucrado tanto en procesos celulares como el envejecimiento celular (Sies, 1991), en el mecanismo inmunológico de macrófagos ante microorganismos fagocitados así como en etiologías como cáncer (Cerutti, 1985) y la enfermedad de Alzheimer (Luft, 1994; Yan, *et al.*, 1994).

I.II.I Efectos de las ERO en los sistemas biológicos

Hoy en día existen una gran cantidad de trabajos referentes al daño que representa la exposición de las ERO en los organismos. El problema actual consiste en ofrecer un panorama en conjunto de los tipos de modificaciones que provocan estas moléculas y en entender los mecanismos de defensa de las células para contender con ellas.

Entre las modificaciones de macromoléculas celulares en las que están implicadas las ERO, se encuentran aquellas que causan daño en DNA, membranas y proteínas. En el DNA puede haber modificación de las bases nitrogenadas lo cual aumentaría la probabilidad de mutaciones espontáneas; las hebras de DNA pueden romperse y formar enlaces covalentes entre las bases y aminoácidos, lo cual interferiría en el proceso de reparación, replicación y transcripción del material genético (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Otra modificación es la formación de peróxidos lipídicos los cuales disminuyen la fluidez de la membrana, incrementan la posibilidad del intercambio

de fosfolípidos en la bicapa, afectan su permeabilidad e inactivan las proteínas asociadas a la misma (Richter, 1987). Hay que tener en cuenta que en muchas bacterias, el DNA se encuentra unido a la membrana celular y puede ser blanco de la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las proteínas sufren modificaciones bajo condiciones de estrés oxidativo, sin embargo, los estudios que se han realizado al respecto son limitados debido a la dificultad en la identificación de los productos de la oxidación proteica. Se ha demostrado la importancia biológica del daño oxidativo a proteínas modificadas oxidativamente ya que son más susceptibles de ser degradadas por parte de las proteasas celulares, tanto en bacterias como en células de mamífero (Davies y Goldberg, 1987).

La sensibilidad al estrés oxidativo es distinta para cada proteína. Depende de factores tales como: localización celular, presencia de centros metálicos, cúmulos Fe-S, grupos hemo presentes, por citar algunos.

Entre las modificaciones que sufren las proteínas están aquellas que se dan en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos como la formación de hidróxidos, hidroperóxidos y aldehídos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Es importante mencionar que también se da la formación de grupos carbonilo durante la oxidación de algunos residuos de aminoácidos como treonina y tirosina (Levine *et al.*, 1994).

I.III Mecanismos de protección al estrés oxidativo

En la actualidad sabemos que las células cuentan con un complejo sistema que les permite contender contra el estrés oxidativo. Halliwell y Gutteridge clasificaron a las defensas antioxidantes celulares de la siguiente manera:

- Compuestos de bajo peso molecular. Por ejemplo el glutatión es el antioxidante de bajo peso molecular más abundante en la bacteria *Escherichia coli*.

- Proteínas que eliminan catalíticamente radicales libres y otras especies reactivas como la superóxido dismutasa y catalasas.
- Proteínas que minimizan la disponibilidad de iones de Fe^{2+} , Cu^+ y de grupos hemo.
- Proteínas que protegen las moléculas celulares contra el estrés en general, por ejemplo, las proteínas de choque térmico.

I.IV Mecanismos de protección al estrés oxidativo en la bacteria *Escherichia coli*

En *E. coli* se conocen aproximadamente 40 actividades diferentes de proteínas con capacidad antioxidante (Storz y Zheng, 2003). Se han descrito algunas actividades antioxidantes nuevas. Por ejemplo, la flamoheoglobina (Hmp) presente en *E. coli* es una defensa contra el efecto oxidante del óxido nítrico y es esencial para determinadas respuestas genéticas antioxidantes (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999).

En *E. coli* se han descrito dos sistemas globales de repuesta al estrés oxidativo: **OxyR** y **SoxRS**. Tanto el regulon OxyR como el SoxRS constituyen dos ejemplos de respuestas genéticas específicas para el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical superóxido (O_2^-) respectivamente ya que la mayoría de los genes que son activados por OxyR o por SoxRS tienen un papel antioxidante bien definido (Greenberg *et al.*, 1990), además de que algunos participan en la protección y reparación del material genético, también regulan parte del metabolismo celular como la utilización de hierro. La descripción de ambos sistemas dio a conocer la existencia de una respuesta adaptativa al estrés oxidativo a nivel molecular. Al parecer existen mecanismos similares de respuesta al estrés oxidativo a lo largo de la escala evolutiva, lo cual nos sugiere la importancia que tiene el poder contender contra las ERO en los organismos.

I.IV.I El regulón OxyR

La expresión de un limitado número de proteínas inducibles por H_2O_2 es regulada por *oxyR*. El gene *oxyR* de *E. coli* codifica para una proteína de 34 kDa la cual presenta en el dominio N-terminal un motivo hélice-giro-hélice de unión ADN (Zheng *et al.*, 1998). Esta proteína en la célula se encuentra como homotetrámero el cual puede existir en dos formas: reducida u oxidada y sólo en esta última forma puede funcionar como activador transcripcional (Storz *et al.*, 1990; Fig. 1). El estado redox de esta proteína está en función de la concentración de H_2O_2 en la célula: si la concentración de H_2O_2 aumenta, es detectada por OxyR por medio de la formación de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína (Zheng *et al.*, 1998).

Entre los genes que son activados por OxyR se encuentran la *gorA*, *grxA* y *trxC* los cuales codifican para glutatión reductasa, glutarredoxina I y tiorredoxina 2 respectivamente y que están involucrados con el mantenimiento del equilibrio intracelular entre tioles y puentes disulfuro (Zheng *et al.*, 1998); el gene *dps* que codifica para una proteína de protección a daño al ADN es inducido por OxyR; *fur* codifica para una proteína que actúa como represor global de la internalización de hierro, de manera que su inducción disminuye la probabilidad de que el H_2O_2 reaccione con el hierro intracelular para generar radical hidroxilo, proceso que se conoce como la reacción de Fenton (Zheng *et al.*, 1998; Fig. 1).

I.IV.II El regulón SoxRS

Este regulón responde a la oxidación causada por el O_2^- (anión superóxido). La respuesta se encuentra regulada en dos pasos: en primer lugar la proteína sensora SoxR pasa a su forma activa y actúa como factor transcripcional del gene *soxS* que codifica para el factor transcripcional SoxS. Una vez sintetizado en cantidad suficiente es SoxS quien activa la expresión de cada uno de los integrantes del regulón (Wu y Weiss, 1992).

-SoxR es una proteína que se presenta como homodímero en solución, con dos centros [2Fe-2S] por dímero. Existe evidencia de que la activación de SoxR tiene lugar mediante la oxidación de la forma reducida [2Fe-2S]¹⁺ a la forma oxidada [2Fe-2S]²⁺ (Ding *et al.*, 1993).

Se ha encontrado que el superóxido no es el único activador de SoxR, pudiendo activarse también en presencia de NO y oxígeno en singulete (¹O₂). También se piensa que la activación del sistema SoxRS puede ser considerada como la respuesta a xenobióticos más que a estrés oxidativo (Storz y Zheng, 2003).

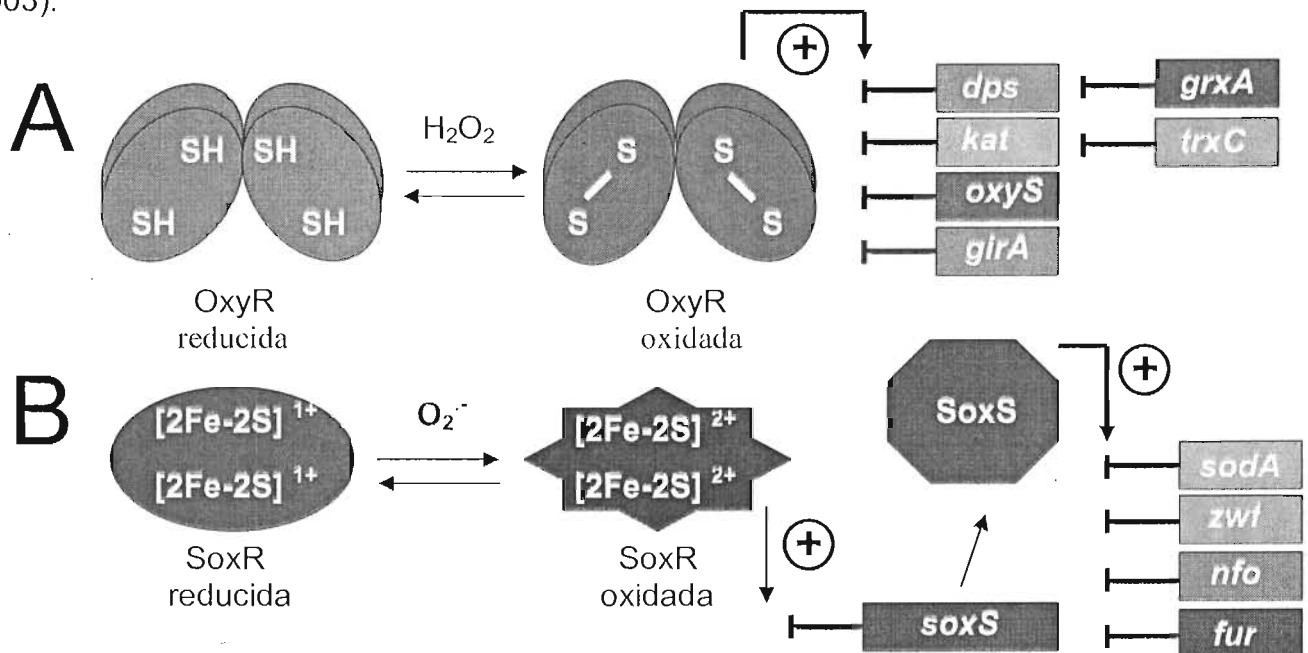


Figura 1.1 Sistemas globales de regulación genética OxyR (A) y SoxRS (B).

I.IV.III Glutarredoxinas y tiorredoxinas

En condiciones normales, el citoplasma de *E. coli* se encuentra en condiciones reductoras. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el mantenimiento del ambiente reductor en el citoplasma es de vital importancia ya que el potencial redox cambia; *E. coli* dispone de varios sistemas para mantener el estado

reductor: las tiorredoxinas, glutarredoxinas y el glutatión. Estas vías reducen los puentes disulfuro que puedan aparecer en las proteínas del citoplasma: las glutarredoxinas se encargan de mantener al glutatión en su forma reducida; las tiorredoxinas suministran equivalentes de reducción a la proteína periplásmica DsbC a través de la proteína de membrana interna DsbB (Rietsch *et al.*, 1997).

Aunque la estrategia anterior puede actuar con rapidez para reestablecer las condiciones reductoras del citoplasma después de un estrés oxidativo, y la respuesta celular mediada por los factores de transcripción SoxR y OxyRS proporciona una respuesta a largo plazo, ninguna de las dos estrategias soluciona las consecuencias asociadas a un daño inmediato de las proteínas celulares diferente de la aparición de puentes disulfuro (Ruddock y Klappa, 1999). Por lo tanto, es posible que existan sistemas adicionales para proporcionar respuestas rápidas a una situación de estrés oxidativo.

I.IV.IV Chaperonas moleculares

Además de los sistemas globales de respuesta al estrés oxidativo, se ha descrito que el regulón de estrés térmico también es importante durante la protección contra dicho estrés (Dukan y Nyström, 1999). Recientemente se ha comenzado a vislumbrar a las chaperonas moleculares como elementos importantes en la protección contra el estrés oxidativo.

Para que una proteína lleve a cabo su correcto funcionamiento es necesario que tenga una conformación tridimensional específica (conformación nativa). En el plegamiento de una proteína participan diferentes tipos de interacciones moleculares, generalmente no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y también enlaces disulfuro, entre otras. Dada la naturaleza de estas interacciones, existen diversos factores que pueden influir en ellas y por lo tanto, en el plegamiento de las proteínas. Entre estos factores se

encuentran la temperatura, ambiente oxidativo e incluso la concentración de las proteínas (Mogk *et al.*, 2001).

Es por esta razón que los organismos han tenido que desarrollar sistemas que prevengan el desdoblamiento o que corrijan el mal plegamiento; estas funciones son llevadas a cabo por proteínas llamadas chaperonas moleculares. El papel de estas proteínas será discutido más adelante.

Recientemente se ha descrito en *E. coli* que la sobreexpresión de pequeñas chaperonas moleculares (sHSP) producto de los genes *ibpA* e *ibpB*, no solo les proporciona resistencia al calor, sino que aumenta su resistencia al estrés oxidativo causado por O_2^- (Kitagawa *et al.*, 2000). Hasta la fecha, Hsp33 es la única chaperona conocida en *E. coli* cuya función está regulada por las condiciones redox del citoplasma, ya que cuando hay una situación de estrés oxidativo se activa mediante la formación de puentes disulfuro (Jakob *et al.*, 1999). Así, Hsp33 parece tener un papel protector importante en situaciones de estrés oxidativo y térmico, condiciones que están íntimamente ligadas *in vivo* a través del daño que se ejerce en las proteínas celulares. Muy recientemente se describió cómo esta chaperona Hsp33 actúa bajo un estrés oxidativo severo donde DnaK es inactivada (Winter *et al.*, 2005).

I.V Sistema global de regulación de la respuesta al estrés térmico en *E. coli*.

Otro estrés que es importante discutir en la introducción de esta Tesis es el estrés térmico. En *Escherichia coli* un sistema de control complejo regula la expresión de los genes de choque térmico (Arsene *et al.*, 2000). En *E. coli* existen dos regulones que controlan esta respuesta. Uno de estos regulones es el regulón de sigma 24, σ^{24} ó σ^E , que consiste en los genes *rpoE* y *htrA* (*degP*). El gene *htrA* se requiere para la sobrevivencia y el crecimiento a temperaturas mayores de 42°C. El otro regulón es el de sigma 32, σ^{32} ó σ^H que es el que más se conoce y que regula la transcripción de más de 30 genes. La proteína reguladora de este

regulón es el factor σ^{32} que sólo puede reconocer promotores de genes de estrés térmico (Connolly *et al.*, 1999). El factor sigma para condiciones de no estrés, σ^{70} , en si es una proteína de choque térmico y puede transcribir algunos genes de estrés térmico y de no estrés (Bloom *et al.*, 1986).

La mayoría de los genes cuya transcripción es inducida por estrés térmico son chaperonas moleculares, por lo que ahondaremos en la definición y descripción de las mismas.

I.V.I Definición de chaperonas moleculares

Las chaperonas moleculares son proteínas cuya función es la de reconocer a otras proteínas que no tengan o que hayan perdido su conformación espacial específica y las asisten para que la readquieran, de lo contrario, sean degradadas (Hayes y Dice, 1996).

I.V.II Clasificación

A las chaperonas se les ha clasificado en dos grupos: chaperonas y chaperoninas. La diferencia entre ambos grupos es el mecanismo mediante el cual asisten a las proteínas desplegadas para que adquieran su conformación espacial funcional.

Las chaperonas reconocen a su substrato mediante interacciones hidrofóbicas. El mecanismo mediante el cual actúan es propiciando un microambiente en la zona de interacción con sus substrato el cual puede adquirir o readquirir su conformación inicial (Song y Morimoto, 2001; Fig. 2 A).

Las chaperoninas reconocen a su substrato mediante interacciones hidrofóbicas; la diferencia consiste en que las chaperoninas forman mullímeros con una estructura similar a la de un barril. Así, las proteínas que necesitan ser

asistidas son introducidas en dicha estructura y es ahí donde tienen el ambiente propicio para adquirir su conformación nativa (Ranson *et al.*, 1998; Fig. 2 B).

Existen proteínas que, aunque no se han reconocido como otro grupo de chaperonas, participan en la degradación de péptidos de forma dependiente de ATP. Algunas se han descrito como chaperonas asociadas a proteasas (ClpXP y ClpAP) o sólo proteasas (Lon y Ftsh) y tienen una estructura similar a las chaperonas, por lo que algunos autores les han denominado **charoninas** (Maurizi, 2001; Fig. 2 C).

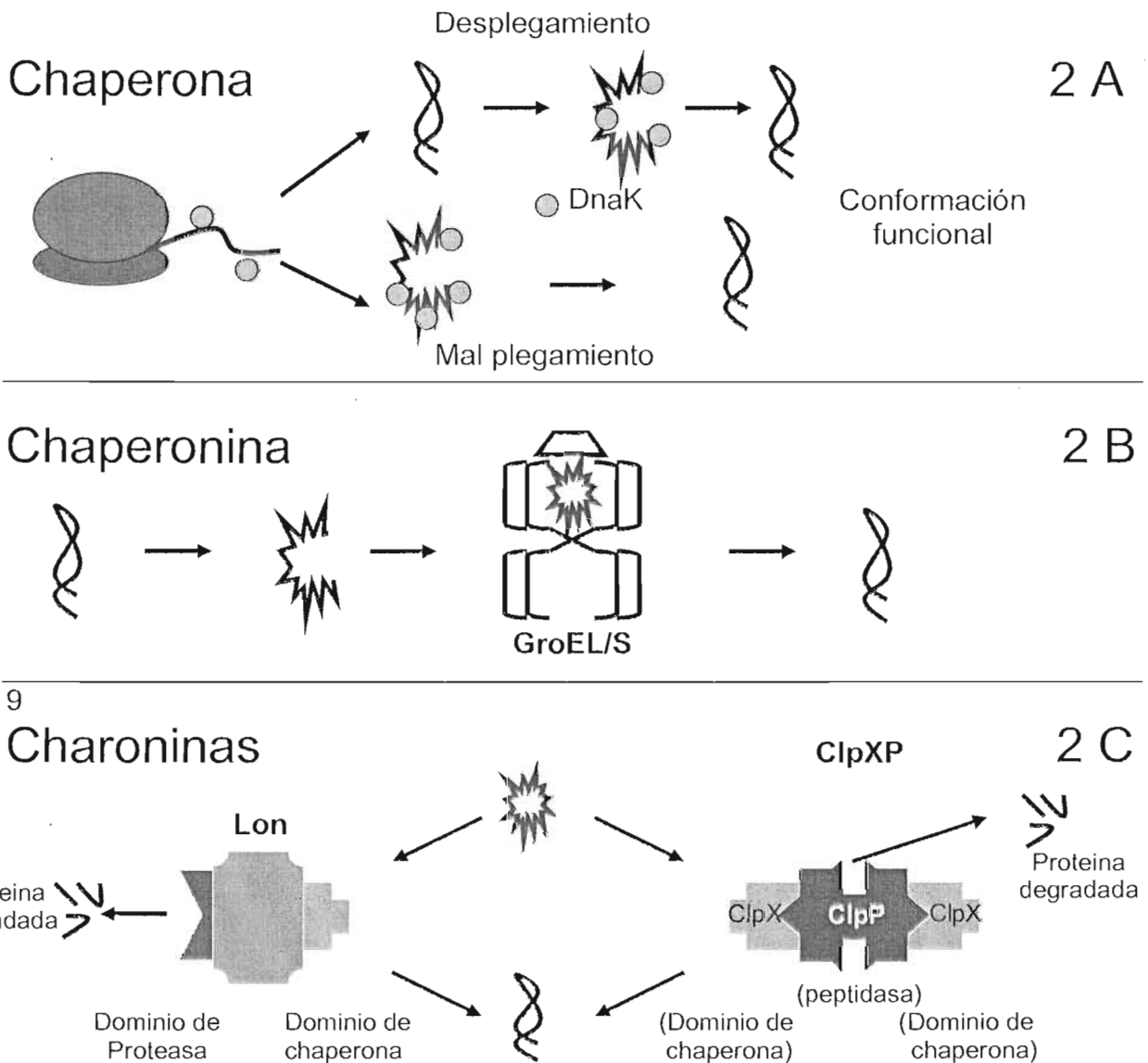


Figura 2. Funcionamiento esquematizado de los diferentes tipos de chaperonas presentes en *E. coli*.

La importancia de las chaperonas radica en que cerca del 90% de la degradación de proteínas es dependiente de ATP, lo que implica que una gran parte de este proceso lo llevan a cabo las chaperonas (Maurizi, 2001).

Las chaperonas han sido agrupadas en familias basándose en su masa molecular. En la Tabla 1 se encuentran las principales chaperonas de *E. coli*.

Familia de chaperonas	Chaperona en <i>E.coli</i>	Homólogo en eucariote	Función
Hsp 100	ClpA	Hsp104, Hsp78	Proteólisis dependiente de ATP
	ClpB	Afg3p, Rcalp	Desagregación de proteínas dependiente de ATP
	ClpX	Lon	Proteólisis dependiente de ATP
	ClpY		Proteólisis dependiente de ATP
	FtsH		Proteólisis dependiente de ATP
	Lon		Proteólisis dependiente de ATP
Hsp90	HtpG	Hsp82	Chaperona dependiente de ATP
Hsp70	DnaK	Hsc70, Hsp72, Bip	Chaperona dependiente de ATP
	Hsc66	Ssq1p	
	Hsc62		
Hsp60	GroEL	CCT, TriC	Chaperona dependiente de ATP
Hsp40	DnaJ	Hdj1, Scj1, Ydj1	Chaperona independiente de ATP
sHsp	IpbA, IpbB	Hsp25	Chaperona dependiente de ATP
Hsp33	Hsp33		Chaperona independiente de ATP regulada por el edo. redox.

Tabla 1. Principales familias de chaperonas en *E. coli* (Lund, 2001).

I.V.III Funciones de las chaperonas

Las chaperonas moleculares están involucradas en diversos procesos celulares además de la asistencia al correcto plegamiento de los péptidos nacientes y en la protección de proteínas ya sintetizadas. Muchas proteínas que se sintetizan en el citoplasma están destinadas a exportarse al periplasma; también pueden estar destinadas a insertarse en la membrana interna o externa

de la célula. Se ha demostrado que las proteínas deben encontrarse en un estado desplegado para que esto ocurra (Eilers y Schatz, 1988). Evidentemente, *in vivo*, debe existir alguna manera de mantener a las proteínas en este estado hasta que hayan alcanzado su destino. Las chaperonas, en parte, cumplen esta necesidad.

La chaperona SecB es un ejemplo de la participación de las mismas en el transporte de las proteínas a través de la membrana celular. Esta chaperona mantiene a los péptidos que serán transportados en un estado desplegado con la finalidad de que puedan pasar por el complejo de translocación. SecB unido a su substrato, puede interactuar con la proteína SecA la cual sirve como nexo entre SecB y el translocón (Driessen *et al.*, 1998).

La mayor parte de los polipéptidos implicados en el plegamiento en el periplasma son catalizadores más que chaperonas. Debido a la falta de evidencia experimental, resulta difícil determinar si una proteína periplasmática implicada en el plegamiento de polipéptidos es una chaperona, un catalizador del plegamiento o ambas cosas.

I.V.IV Papel de las chaperonas moleculares en el estrés celular

El desdoblamiento de las proteínas y su agregación es el mayor daño que causa el estrés térmico en las células. Las chaperonas son fundamentales en la respuesta a este estrés. Se ha descrito que las chaperonas ayudan a las proteínas sintetizadas a mantener su conformación funcional durante el estrés, lo cual permite que los procesos celulares se puedan llevar a cabo a elevadas temperaturas.

Antes se pensaba que las chaperonas eran proteínas importantes para el metabolismo celular únicamente bajo condiciones de estrés, particularmente durante un choque térmico, de ahí su denominación (Heat Shock Proteins, Hsp).

Posteriormente se demostró que las chaperonas también son necesarias para el metabolismo en condiciones normales de crecimiento

El estrés oxidativo se ha relacionado con el estrés térmico dado que la síntesis de algunas proteínas del estrés calórico es también inducida por el estrés oxidativo. Se debe mencionar que el mecanismo genético de la inducción de la síntesis de HSP por estrés oxidativo aún no es conocido, aunque se ha propuesto que el desdoblamiento de proteínas puede ser un factor importante (Van Bogelen *et al.*, 1987).

I.VI Justificación de este proyecto de investigación

Mucha de la información referente a la respuesta al choque térmico en *Escherichia coli* proviene de estudios de cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento bajo condiciones aeróbicas (Neidhart *et al.*, 1984; Morimoto *et al.*, 1999).

A pesar de que Benov y Fridovich (1995) demostraron que el choque térmico aeróbico provocaba estrés oxidativo, solo pocos estudios han relacionado la tensión de oxígeno con la respuesta al choque térmico (Guerra *et al.*, 2005; Bromberg *et al.*, 1998; Rockabrand *et al.*, 1995; Mizushima *et al.*, 1994). Es muy importante hacer notar que el hábitat natural de *Escherichia coli* es el tracto gastrointestinal, lo que implica que mucha de su existencia se da en condiciones anaeróbicas y en fase estacionaria de crecimiento. A pesar de esto, no han sido aún reportados estudios de la respuesta al choque térmico de *Escherichia coli* bajo condiciones anaeróbicas.

El estudio de la fase estacionaria de crecimiento ha tomado mucha atención en los años recientes. De hecho, el factor sigma S, σ^S , ha sido ampliamente estudiado y es claro que presenta una regulación transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional sumamente compleja (Hengge-

Aronis, 2002). Las células en fase estacionaria de crecimiento muestran resistencia hacia el estrés térmico, agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio (Kolter *et al.*, 1993). Esta resistencia intrínseca en la fase estacionaria es dependiente de la síntesis proteica (Jenkins *et al.*, 1988) y de regulones controlados por el factor σ^{32} . Las proteínas de choque térmico son preferencialmente producidas ante condiciones de inanición durante las primeras horas de la misma (Groat *et al.*, 1986) y se ha reportado que DnaK tiene un papel esencial en la termotolerancia y resistencia al peróxido de hidrógeno bajo estas condiciones (Rockabrand *et al.*, 1995).

Muy recientemente, King y Ferenci reportaron que σ^S presenta papeles divergentes en *Escherichia coli* bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (King y Ferenci, 2005). A pesar de estos hechos, no existen estudios reportados referentes a la respuesta de *Escherichia coli* al choque térmico en fase estacionaria bajo condiciones de crecimiento aeróbico y anaeróbico.

I.VII Objetivo general

El objetivo principal consiste en estudiar el papel de los factores σ^H y σ^S ante condiciones de estrés térmico y oxidativo en *Escherichia coli*.

I.VIII Objetivo específico

Analizar el efecto de la ausencia de los factores σ^H y σ^S bajo condiciones de estrés térmico y estrés oxidativo en *Escherichia coli* en fase de crecimiento exponencial y estacionaria tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Capítulo II.

MATERIAL Y MÉTODOS

II.I Cepas bacterianas

Se emplearon las siguientes cepas de *Escherichia coli*.

Tabla 2. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo	Resistencia	Concentración
MC4100	F'ΔlacU169 <i>rpsL</i>	Estreptomycin	200 μg/ml
JMH0039	MC4100 <i>rpoS::tet</i>	Tetracycline	25 μg/ml
BB7224	MC4100 Δ <i>rpoH::kan</i>	Kanamycin	100 μg/ml

II.II Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

II.II.I Medio LB

Composición:

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 1%

Triptona 1%

pH 7.4

Para medio sólido de agregó 1.5% de agar bacteriológico

II.II.II Medio Mínimo (MM) con glucosa al 0.2% y 19 aminoácidos (19 aa).

Composición:

NH₄Cl 0.1%

KH₂PO₄ 0.3%

Na₂HPO₄ 0.6%

NaCl 0.05%

pH 7.0

El medio fue suplementado con glucosa al 0.2% , tiamina (2 µg/ml) y todos los aminoácidos (20 µg/ml) excepto metionina.

II.II.III Medio de dilución (MD)

Composición

MgSO₄ 10 mM

II.III Métodos de fisiología bacteriana

II.III.I Curvas de crecimiento

Los cultivos bacterianos se hicieron a partir de un precultivo fresco. Este precultivo se preparó por la inoculación de la cepa correspondiente en un tubo de vidrio con 3 ml de MM 19aa, el cual se dejó incubando toda la noche a 30°C con agitación constante (250 rpm).

Para realizar las curvas de crecimiento aeróbicas se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, 30 ml de MM 19 aa con un volumen del precultivo

necesario para alcanzar una densidad óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0.1 (la OD_{600nm} se midió en un espectrofotómetro marca Armersham Ultrospec 3100 pro).

Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm. La densidad óptica se midió cada dos horas durante 12 horas (Fig. 3.1).

En el caso de las curvas de crecimiento anaeróbicas, se añadió al medio de cultivo nitrato de sodio a una concentración final de 40 mM y se realizó el mismo procedimiento pero dentro de una cámara de anaerobiosis marca Plas Labs, la cual contenía una mezcla de gases del 85% de N_2 , 10% de H_2 y 5% de CO_2 . las condiciones de anaerobiosis se verificaron utilizando un oxímetro marca Clark (Yellowsprings, USA) y tiras BBL indicadoras de anaerobiosis (Sparks, MD, USA).

II.III.II Cuentas viables

Una vez obtenidas las cinéticas de crecimiento de cada una de las cepas, se determinó a qué densidad óptica se realizaría el reto al estrés térmico ú oxidativo tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. En el caso de fase exponencial, la OD_{600nm} fue de 0.5, mientras que en fase estacionaria la OD_{600nm} fue > a 1.2. Establecidos las densidades ópticas con las cuales se realizarían los experimentos, se procedió a realizar el ensayo de viabilidad el cual se describe a continuación:

De un precultivo se tomó una alícuota de 200 μ l y se inocularon 10 ml de medio MM 19 aa. Este cultivo se incubó a 30°C con agitación constante hasta una OD_{600nm} de 0.5 o de 1.2 (según la fase de crecimiento a estudiar). Una vez que el cultivo alcanzó esta densidad celular, se tomaron 100 μ l y se diluyeron en 900 μ l de MD (dilución 10^{-1}). Esta muestra correspondió al control. Posteriormente se sometió al cultivo a estrés térmico (cambio de temperatura de 30 a 47°C) o a estrés oxidativo (adición de H_2O_2 hasta una concentración final de 5 mM). A partir del momento que se provocó el estrés, se comenzó a medir el tiempo y se

tomaron muestras de 100 μ l a los 5, 15, 30, 60 y 90 minutos diluyéndolas en 900 μ l de MD. Posteriormente se realizaron diluciones seriales de cada muestra (hasta una dilución de 10^{-6}). De cada dilución se tomaron 4 μ l y se colocaron en una caja Petri con medio selectivo ordenándolas para que en la misma caja se sembraran todas las diluciones (desde 10^{-2} hasta las 10^{-6}) correspondientes a cada tiempo de estudio (desde el tiempo cero hasta el noventa min). Las cajas se incubaron a 30°C de 18 a 24 horas. Posteriormente, se escanearon las cajas y se procedió al análisis de resultados.

En el caso de las cuentas viables anaeróbicas, el experimento se realizó en la cámara de anaerobiosis, pero las diluciones seriales y la siembra en las cajas Petri se realizaron en condiciones aeróbicas.

II.IV Técnicas de marcaje radiactivo

II.IV.I Obtención de cultivos

Para realizar el marcaje en fase de crecimiento exponencial, de un precultivo se tomó una alícuota de 2 ml y se inocularon 60 ml de MM 19 aa con el antibiótico correspondiente. Se incubó el nuevo cultivo a 30°C con agitación constante (250 rpm) hasta que alcanzara una OD_{600nm} de 0.5.

En el caso del marcaje en fase estacionaria, 60 ml del MM con glucosa al 0.2% y 19 aminoácidos y el antibiótico correspondiente se inocularon con 2 ml del precultivo correspondiente. Este cultivo se incubó a 30°C a 250 rpm toda la noche, midiendo la OD_{600nm} al día siguiente ajustándola para que estuviese a aproximadamente 1.2.

Una vez obtenidos los cultivos, se procedió a realizar el marcaje radiactivo de proteínas.

Marcaje radiactivo ante condiciones de estrés térmico. Una alícuota de 1 ml fue tomada antes de realizar el estrés y fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 25 μCi de L-³⁵S-metionina (Amersham, Bioscience) y fue incubado a 30 °C (tubo control). El marcaje se realizó durante un intervalo de tiempo de 2 minutos por, por lo que la ventana de marcaje fue 0-2, 2-4, 4-6 y así sucesivamente hasta 26-28-min, transcurridos los cuales se añadieron 40 μl de una mezcla que contenía L-metionina sin radiactividad (800 $\mu\text{g/ml}$) y cloramfenicol (40 $\mu\text{g/ml}$) con el fin de que la metionina “fría” compitiera con la “caliente” y se detuviera así la incorporación del aminoácido radiactivo y de que el antibiótico detuviera la síntesis de proteínas. Este mismo procedimiento se realizó después de realizar el estrés térmico (cambio de temperatura de 30 a 47°C) tomando alícuotas de 1 ml cada 2 minutos durante 28 min.

Las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 20 μl de buffer Laemmli (el cual contiene un colorante guía para la electroforesis, glicerol, SDS y β -mercaptoetanol para evitar que se agreguen las proteínas) y 5 μL de inhibidor de proteasas en el caso de los cultivos de fase exponencial; en el caso de los cultivos de fase estacionaria, se añadieron 90 μl del buffer y 10 μl del inhibidor de proteasas. Las muestras fueron agitadas vigorosamente y calentadas en agua hirviendo por 2 min. Se cargaron 5 μl de cada muestra de cada experimento en los pozos de un gel SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989).

I.IV.II Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamina

Esta se efectuó según la técnica reportada por Laemmli (1970). El gel separador contenía 1.5 ml de acrilamida al 30%. Se añadió 1.24 ml de una solución de Tris HCl 1.5 M pH 8.8 y 50 μl de SDS al 10% para desnaturalizar a las proteínas y minimizar su carga negativa. El gel se polimerizó químicamente por la adición de 5 μl de TEMED y 50 μl de persulfato de amonio al 10%.

El gel concentrador se preparó con 500 μ l de una solución de acrilamida al 30%, 750 μ l de una solución de Tris HCl 1.5 M pH 6.8 y 60 μ l de una solución de SDS al 10%. El gel se polimerizó con la adición de 3 μ l de TEMED y 30 μ l persulfato de amonio al 10%.

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 3 min. Los carriles en el gel concentrador se cargaron con 5 μ l de muestra. La electroforesis se corrió con el amortiguador de corrida Laemmli a 80 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador hasta que el frente llegó al final del gel.

Solución amortiguadora de electroforesis:

Tris-Hcl (pH 8.8) 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0.1% (w/v)

II.IV.III Tinción secado del gel

Después de haber realizado la corrida electroforética de las muestras, los geles se tiñieron por 5 minutos a temperatura ambiente con azul de Coomassie al 0.1%. Los geles se destiñeron lavando con ácido acético glacial y metanol al 10% por varias horas en agitación constante.

Tinción de Coomassie

Ácido acético 10% (v/v)

Azul brillante de Coomassie 0.01% (w/v)

Metanol 50% (v/v)

Los geles se secaron previamente entre papel celofán suave y sobre papel filtro Whatman en una plancha secadora de geles de Bio-Rad.

II.IV.IV Exposición del gel y revelado

Los geles secos fueron expuestos a una placa de rayos X marca Kodak X-Omat y se colocaron dentro de un casete de exposición durante 3 horas a TA. Las placas se revelaron en la oscuridad con luz roja con revelador fotográfico; se enjuagaron en agua corriente y se trataron con fijador fotográfico

Finalmente, las autorradiografías se escanearon para su posterior análisis.

Capítulo III. RESULTADOS

III.1 Curvas de crecimiento

A continuación se muestran los resultados de las curvas de crecimiento de las cepas MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

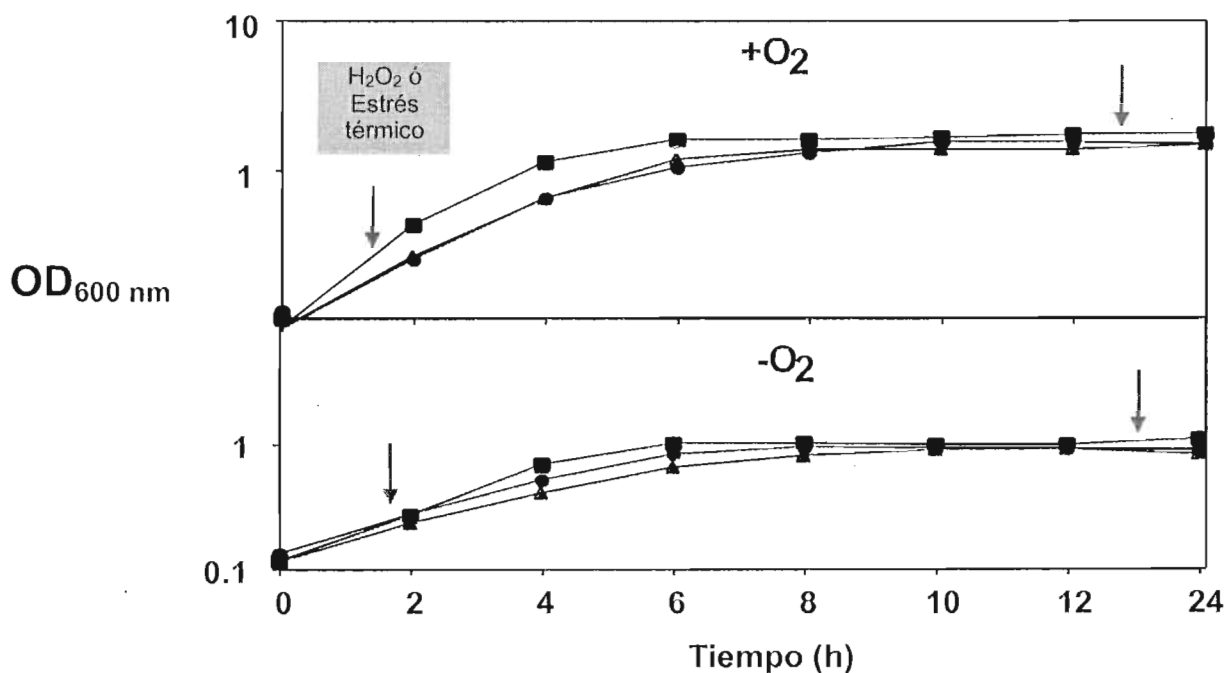


Fig. 3.1 Cinéticas de crecimiento de las cepas MC4100 (■), JMH0039 (●) y BB7224 (▲) en condiciones aeróbicas (+O₂) y anaeróbicas (-O₂). Las flechas indican la fase exponencial o estacionaria en la que los cultivos se sometieron a ET o EO.

En la Fig. 3.1 podemos observar la cinética de crecimiento de las cepas estudiadas; con una flecha roja se señala en qué momento de la cinética se sometió a los cultivos a las condiciones de estrés tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, esto con el fin de establecer la fase de crecimiento y la OD_{600nm} con la que se trabajaría tanto en fase exponencial como en fase estacionaria.

En el caso de fase exponencial, la OD_{600} fue de 0.5, mientras que en fase estacionaria la OD_{600} fue $>$ a 1.2. Una vez establecidos las densidades ópticas con las cuales se realizarían los experimentos, se procedió a realizar los ensayos de viabilidad.

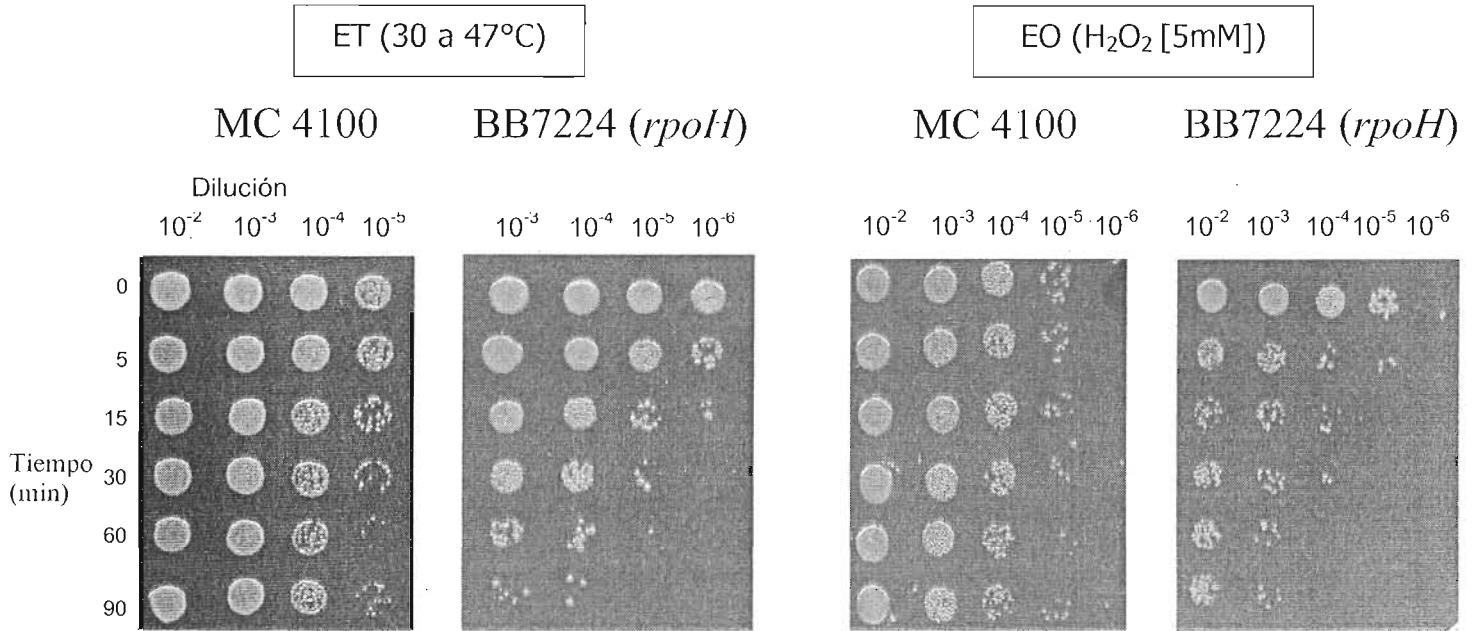
III.II Viabilidad de las cepas MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) bajo estrés térmico y oxidativo en aerobiosis y anaerobiosis

A continuación se muestran los resultados de las cuentas viables realizadas a la cepa parental MC4100, a la JMH0039 (*rpoS*) y a la BB7224 (*rpoH*) después de que los cultivos fueron sometidos a condiciones de estrés térmico (cambio de temperatura de 30 a 47°C) y a estrés oxidativo (adición de H_2O_2 5mM). Se analizó el efecto en la viabilidad de las células a diferentes intervalos de tiempo (de 0 hasta 90 min) después de que se efectuó el estrés mediante la realización de diluciones seriales (hasta 10^{-6}) de cada una de las muestras en los diferentes intervalos de tiempo. En las imágenes inferiores se observa el efecto en la viabilidad celular tanto en los cultivos de fase exponencial como los de fase estacionaria creciendo aeróbicamente y anaeróbicamente.

III.II.I Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (*rpoH*) bajo estrés térmico y oxidativo en aerobiosis

En las siguientes imágenes podremos observar el efecto en la viabilidad de las cepas analizadas como resultado de la exposición al estrés térmico y oxidativo en condiciones aeróbicas de crecimiento.

- **Fase exponencial**



- **Fase estacionaria**

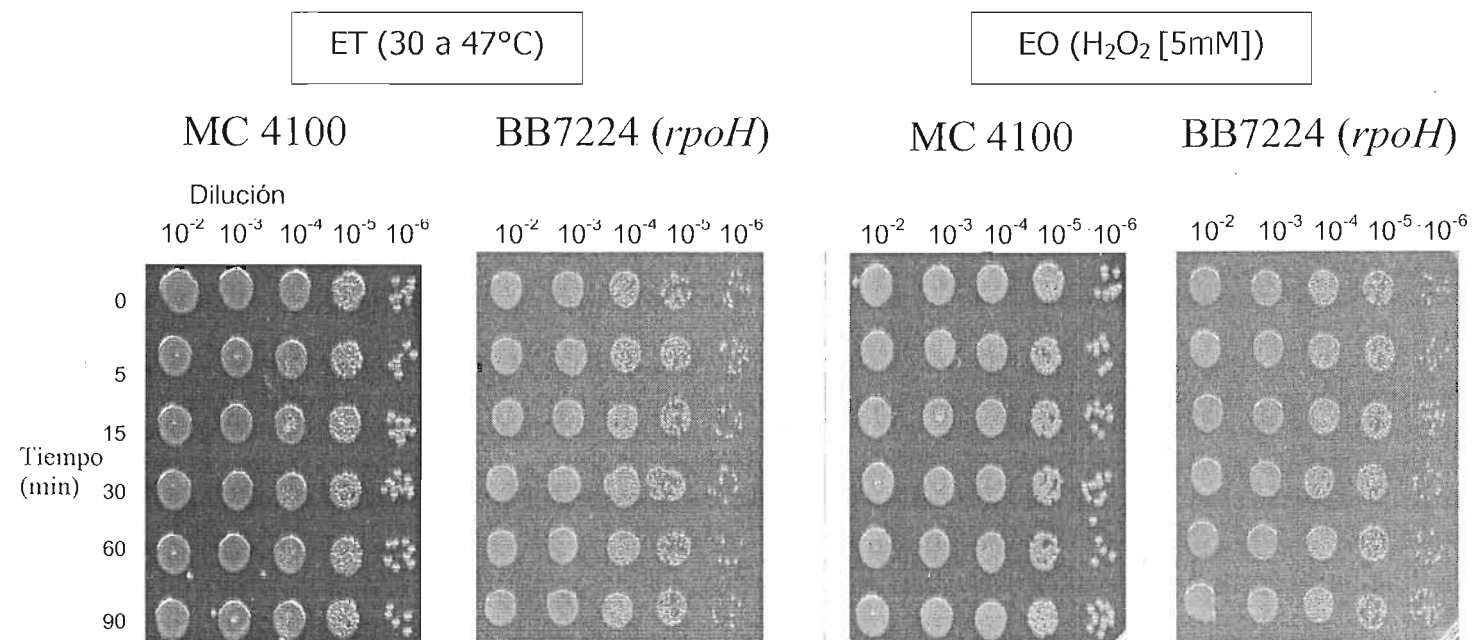
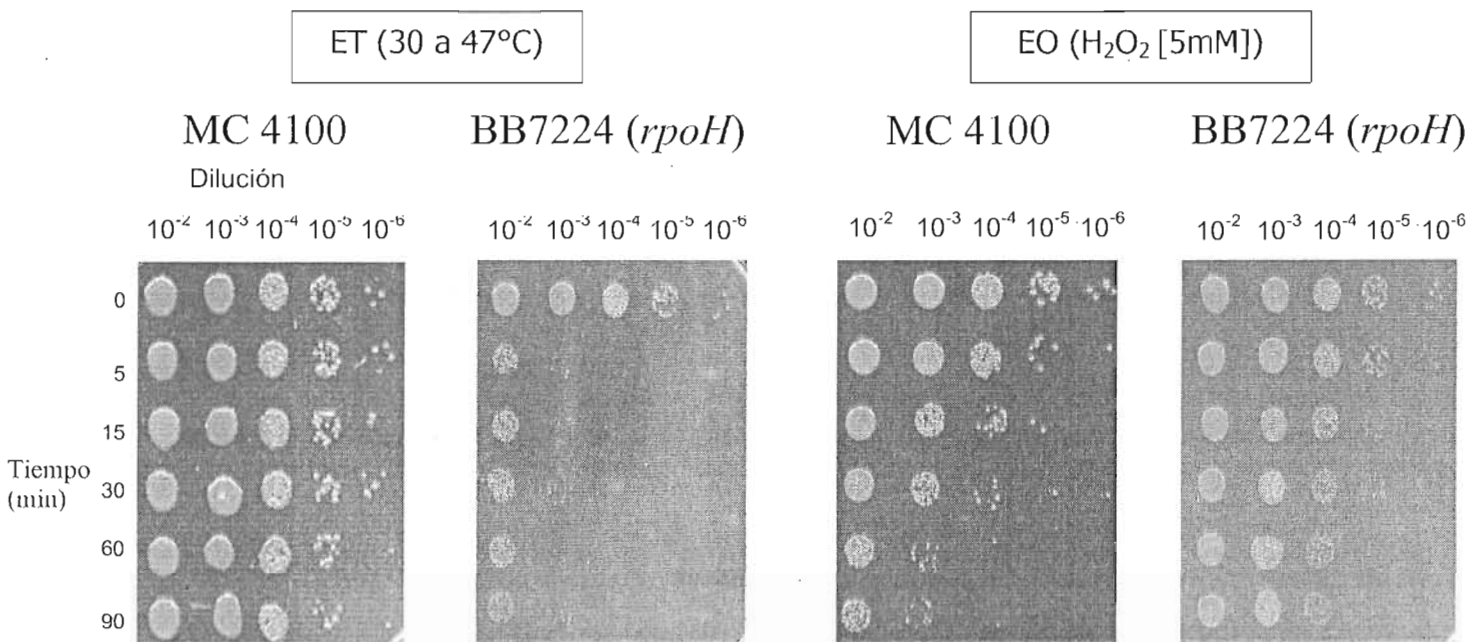


Fig. 3. 2 Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (*rpoH*) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en aerobiosis.

III.II.II Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (*rpoH*) bajo estrés térmico y oxidativo en anaerobiosis

En las siguientes imágenes podremos observar el efecto en la viabilidad de las cepas mutantes después de que se les sometió a estrés térmico y estrés oxidativo en condiciones anaeróbicas de crecimiento.

- **Fase exponencial**



- **Fase estacionaria**

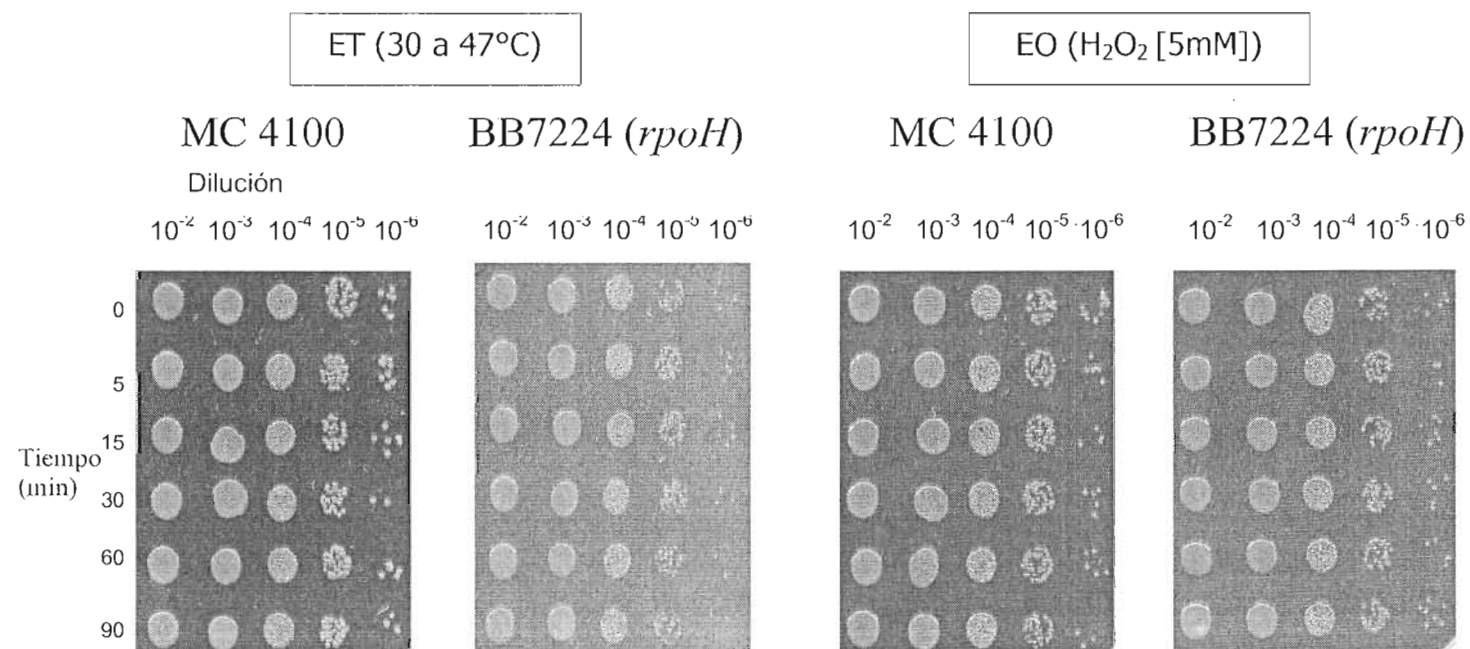


Fig. 3. 3 Viabilidad de las cepas MC4100 y BB7224 (*rpoH*) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en anaerobiosis.

III.II.III Análisis de resultados

Podemos observar que la mutante BB7224 (*rpoH*) en fase exponencial aeróbica es significativamente sensible al estrés térmico comparándola con la cepa control, esto debido a que al ser una mutante nula en *rpoH* no se transcriben los genes que codifican para las proteínas de choque térmico cuando se somete el cultivo al estrés por calor. Quizá esta sea la razón que explique la baja viabilidad de esta cepa. Esta sensibilidad se ve notablemente incrementada en condiciones anaeróbicas, probablemente debido a que en ausencia de oxígeno el metabolismo cambia y exista otro tipo de defensa intrínseco, lo que significa expresión o represión de genes que en este caso, no contribuyen al mantenimiento de la viabilidad ante estas condiciones.

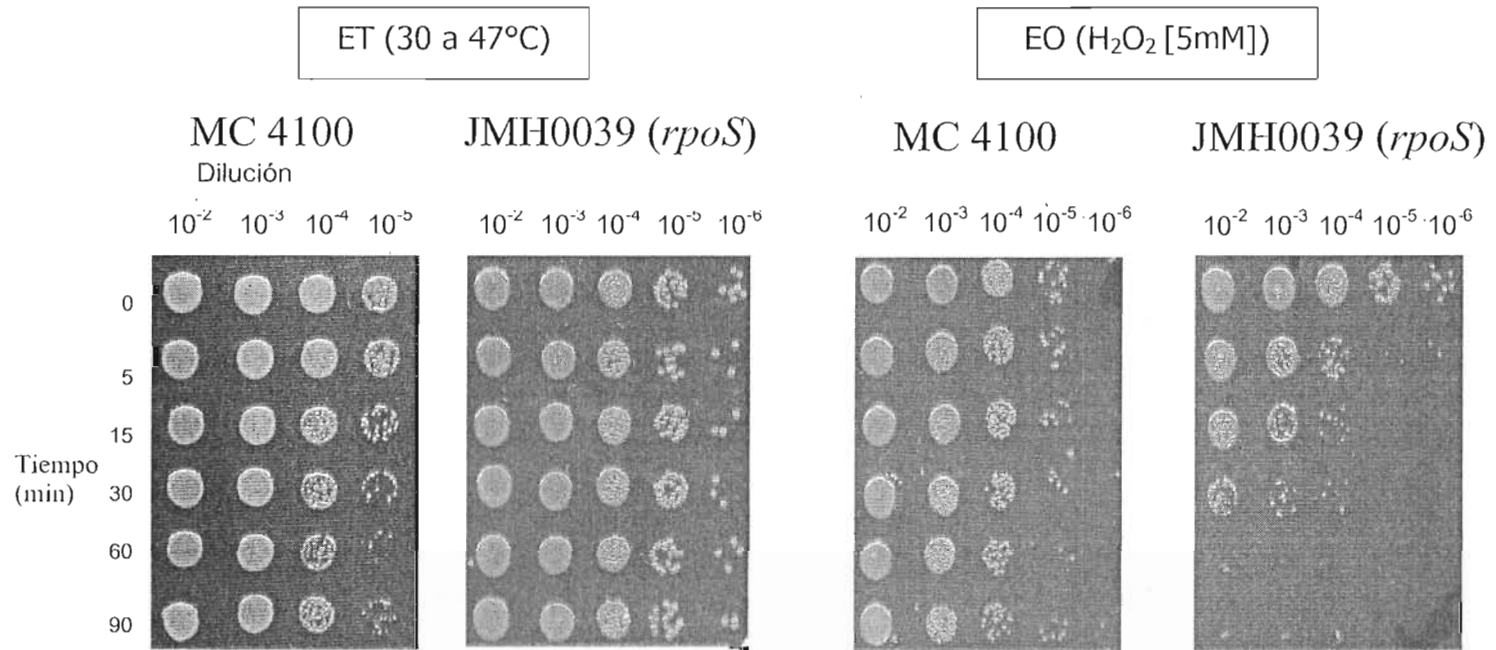
Ante estrés oxidativo, observamos que únicamente en condiciones aeróbicas, la viabilidad de la cepa BB7224 (*rpoH*) se ve significativamente afectada, comparada con el control. En condiciones anaeróbicas, la viabilidad en ambos casos es similar.

En fase estacionaria, tanto en aerobiosis como anaerobiosis, la viabilidad de la cepa BB7224 (*rpoH*) no se ve afectada cuando se someten a los cultivos tanto a condiciones de estrés térmico como estrés oxidativo, lo que sugiere que en ésta fase de crecimiento existen otros mecanismos (síntesis de proteínas de fase estacionaria, síntesis de moléculas como la trehalosa) que ayudan a contender contra el estrés térmico y oxidativo.

III.II.IV Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (*rpoS*) bajo estrés térmico y oxidativo en aerobiosis

En las siguientes imágenes podremos observar el efecto en la viabilidad de las cepas analizadas como resultado de la exposición al estrés térmico y oxidativo en condiciones aeróbicas de crecimiento.

- Fase exponencial**



- Fase estacionaria**

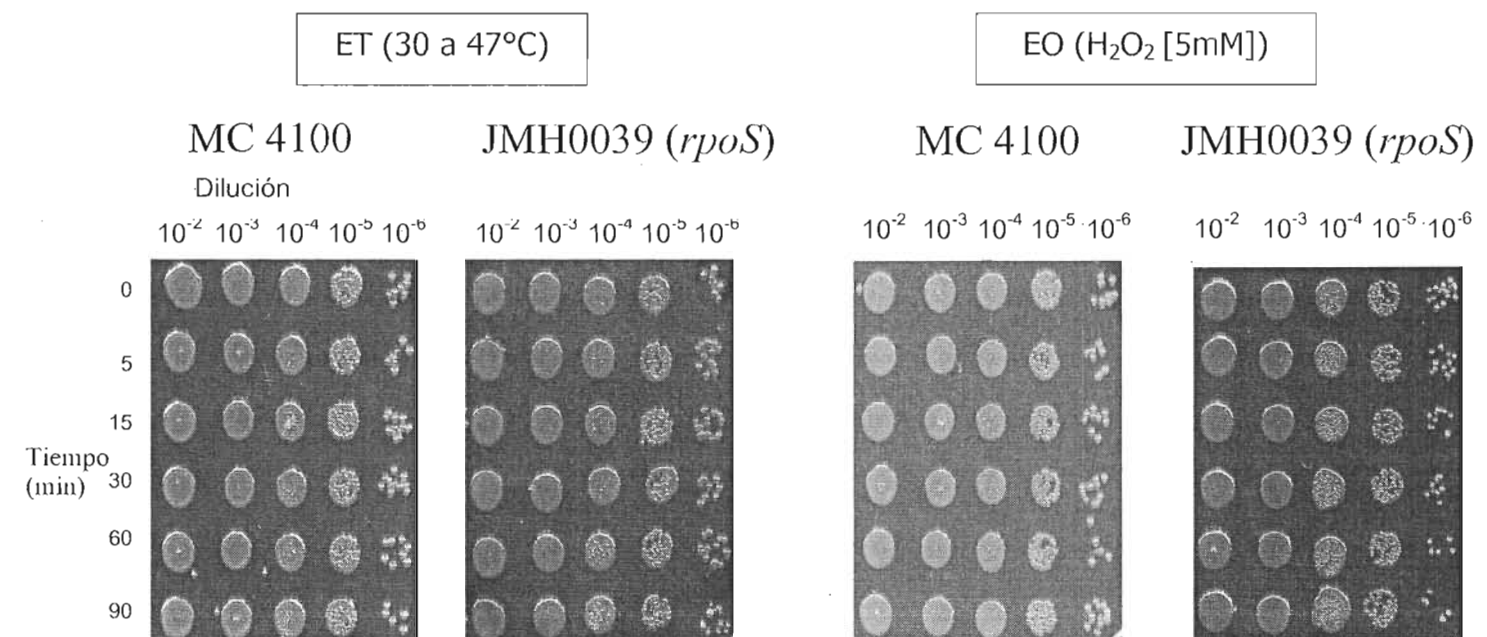
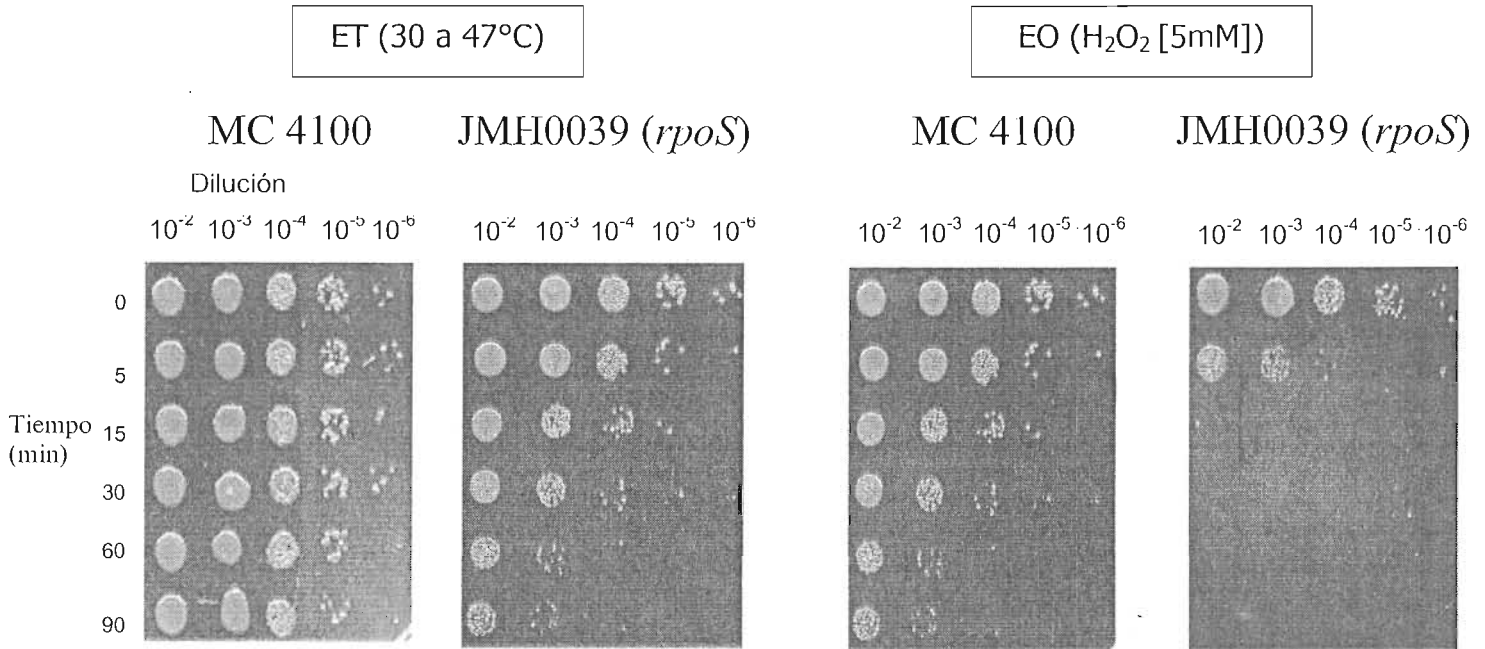


Fig. 3. 4 Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (*rpoS*) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en aerobiosis.

III.II.V Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (*rpoS*) bajo estrés térmico y oxidativo en anaerobiosis

En las siguientes imágenes podremos observar el efecto en la viabilidad de las cepas mutantes después de que se les sometió a estrés térmico y estrés oxidativo en condiciones anaeróbicas de crecimiento.

- **Fase exponencial**



- **Fase estacionaria**

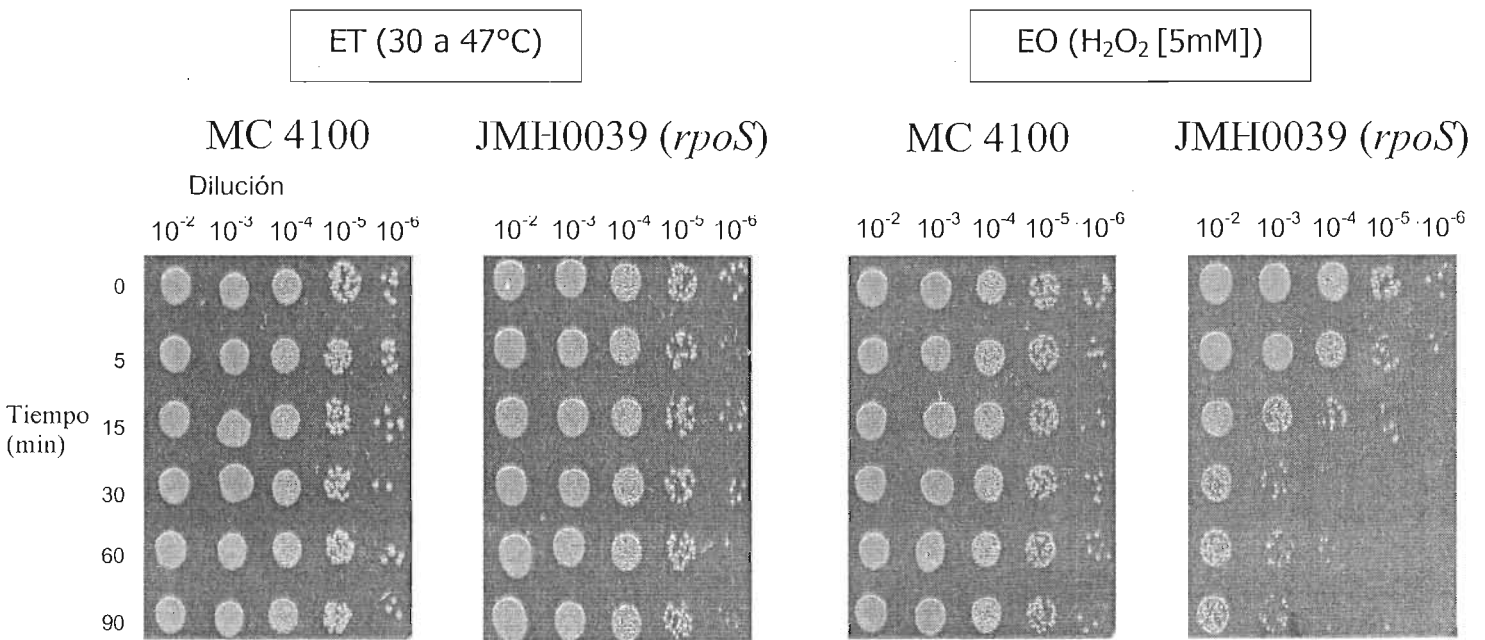


Fig. 3. 5 Viabilidad de las cepas MC4100 y JMH0039 (*rpoS*) bajo estrés térmico y oxidativo en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en anaerobiosis.

II.II.VI Análisis de resultados

Podemos observar que para el caso de la mutante JMH0039 (*rpoS*) los cultivos de fase exponencial de crecimiento sometidos al estrés oxidativo, presentaron una disminución significativa en su viabilidad comparada con el control. Esto tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Ante estrés térmico la viabilidad de esta cepa fue similar a la control.

Al analizar la fase estacionaria, no se observa que la viabilidad se afecte cuando se somete al cultivo a ambos tipos de estrés. Este resultado es interesante ya que *rpoS* se ha involucrado en la regulación de genes de fase estacionaria, entre los cuales se encuentran genes que codifican proteínas encargadas de la reparación de procesos celulares (incluyendo adaptación y protección) tales como KatE (hidroperoxidasa II), UspB (proteína requerida contra el estrés por etanol), OsmY (proteína periplásmica cuya síntesis es inducida ante osmolaridades altas), por mencionar algunas, que le ayudan a contender contra el estrés en general. Uno esperaría que, al estar afectada la cepa en el gene *rpoS*, ésta fuera más sensible al estrés tanto térmico como oxidativo, pero no fue así, lo que nos sugiere que existen mecanismos adicionales (síntesis de proteínas que ayuden a contender contra el estrés) que escapan de la regulación de RpoS y que le permiten a la célula resistir ante el daño causado tanto por estrés térmico como el oxidativo.

III.III Cinéticas de marcaje radiactivo.

La finalidad de realizar el experimento de marcaje radiactivo (pulso y caza) fue el analizar la síntesis de novo de proteínas en cultivos de fase exponencial y estacionaria de las cepas MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) tanto en aerobiosis como en anaerobiosis únicamente bajo condiciones de estrés térmico (ET). Este experimento se realizó para analizar la síntesis de proteínas por intervalos de 2 min durante 28 min consecutivos. A continuación se muestran las autorradiografías de los geles radiactivos obtenidos.

III.III.I Cinética de síntesis proteica de la cepa MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) ante ET en aerobiosis

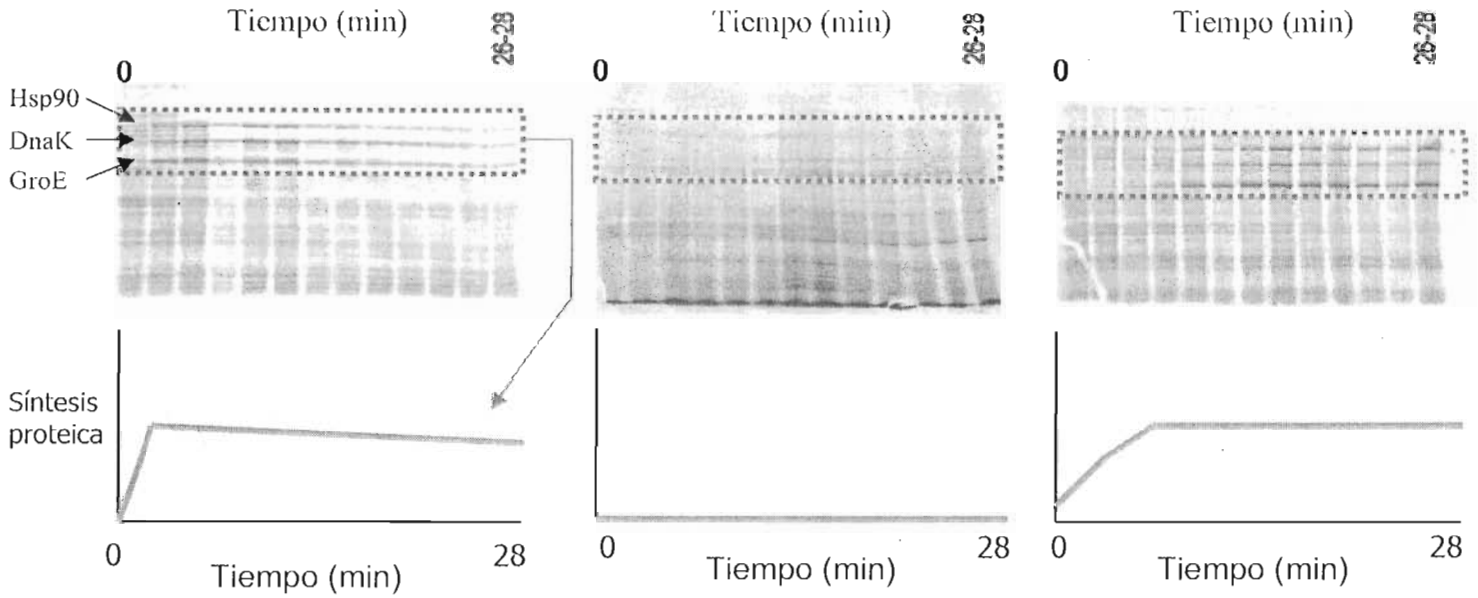
En las siguientes imágenes se observa la cinética de la síntesis de proteínas de las cepas estudiadas. Nos enfocamos al análisis de la síntesis del triplete de proteínas características del choque térmico Hsp90, DnaK y GroE.

- Fase exponencial

MC4100

BB7224 (*rpoH*)

JMH0039 (*rpoS*)

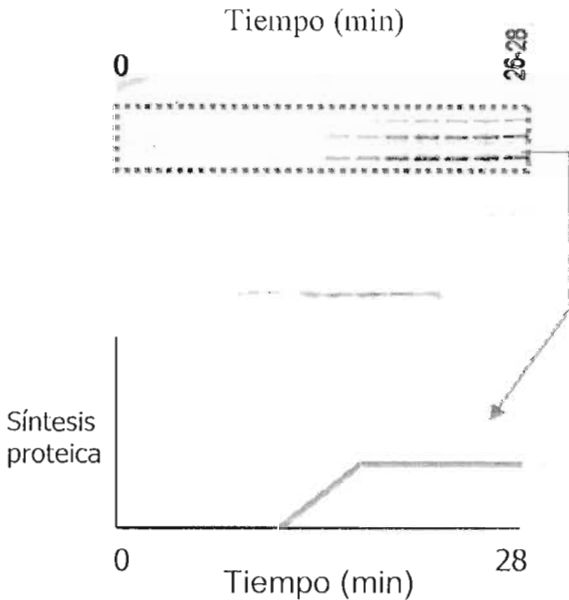


- Fase estacionaria

MC 4100

BB7224 (*rpoH*)

JMH0039 (*rpoS*)



**No se observó
Marcaje radiactivo**

Fig. 3.6 Cinéticas aeróbicas de síntesis de proteínas de las cepas MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) ante estrés térmico en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.

III.III.II Análisis de resultados

Es importante señalar que nos enfocaremos al análisis del triplete de proteínas características de la respuesta al estrés por calor. Este triplete consta de las proteínas de choque térmico Hsp90, DnaK y GroE (90, 70 y 60 kDa, respectivamente). En las gráficas inferiores a las imágenes de las autorradiografías se pretende esquematizar la síntesis proteica de estas proteínas en ventanas de 2 min durante 28 min que fue el que duró el estrés térmico.

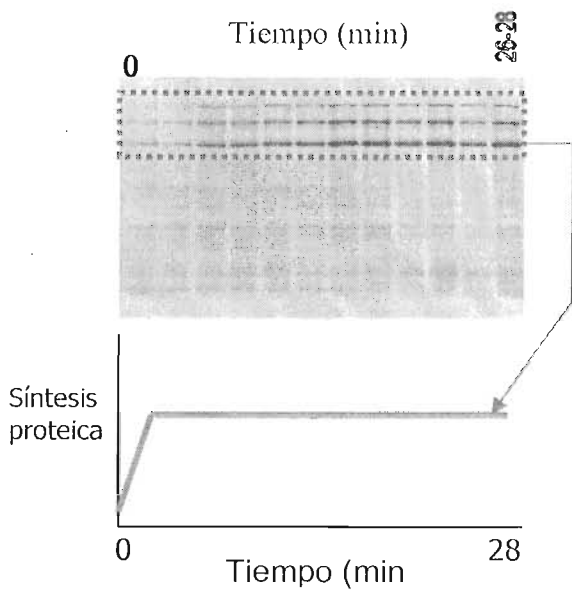
En aerobiosis y en la fase exponencial de crecimiento observamos que en la cepa parental, la síntesis del triplete se presenta desde el primer minuto después de que se sometió el cultivo al estrés. Esta síntesis proteica se mantiene pero conforme transcurre el tiempo, va disminuyendo. Esto está en perfecta concordancia con resultados publicados anteriormente (Morimoto *et al.*, 1997). En el caso de la mutante BB7224 (*rpoH*), la síntesis de estas proteínas no se presenta ya que al estar ausente el factor σ^H éste no se une a las regiones promotoras de los genes de choque térmico y por este motivo no observamos la síntesis de al menos estas tres proteínas de choque térmico. La mutante JMH0039 (*rpoS*) presenta una síntesis tardía del triplete proteico, dándose aproximadamente al minuto 4-6 y manteniéndose conforme transcurre el tiempo sin observar disminución en su síntesis.

En fase estacionaria, se observa que la síntesis proteica de estas proteínas se da tardíamente, aproximadamente entre los minutos 10-12 después del estrés térmico. Esto nos indica que la respuesta ante estrés térmico en fase estacionaria implica la síntesis de proteínas de choque térmico que aunque es tardía, se presenta ayudando así a la célula a contender contra este tipo de estrés. Con respecto a las mutantes en *rpoH* y *rpoS*, no se observaron bandas en la autorradiografía que indicaran síntesis proteica. Esto se podría atribuir a un mal desarrollo de la técnica experimental.

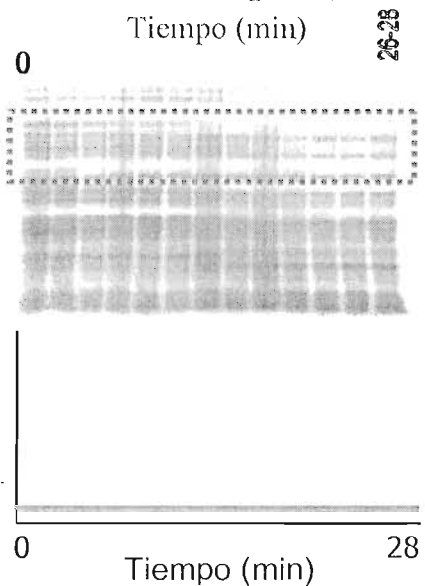
III.III.III Cinética de síntesis proteica de MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) ante ET en anaerobiosis

En las siguientes imágenes se observa la cinética de la síntesis de proteínas de las cepas estudiadas.

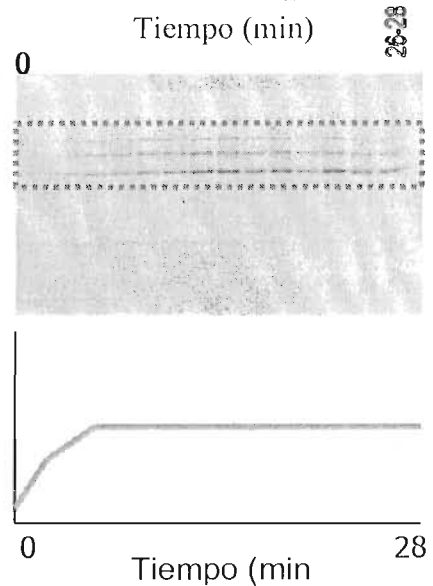
- **Fase exponencial**
MC 4100



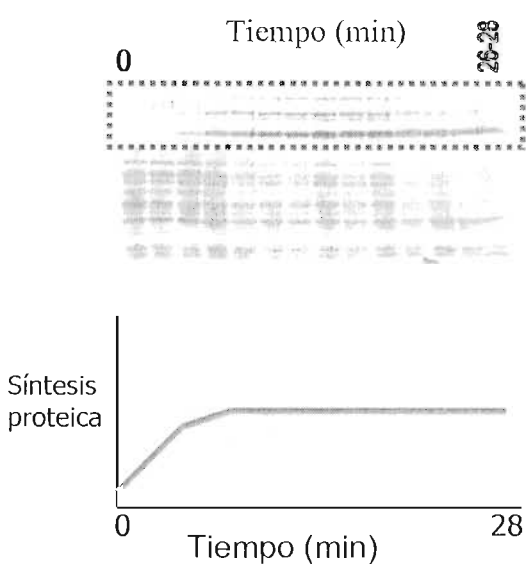
BB7224 (*rpoH*)



JMH0039 (*rpoS*)



- **Fase estacionaria**
MC 4100



BB7224 (*rpoH*)

JMH0039 (*rpoS*)

No se observó
Marcaje radiactivo

Fig. 3.7 Cinéticas anaeróbicas de síntesis de proteínas de las cepas MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*) ante estrés térmico en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.

III.III.IV Análisis de resultados

En condiciones anaeróbicas, la cepa MC4100 presenta una síntesis del triplete de proteínas inmediato (como en condiciones aeróbicas). Interesantemente y a diferencia de la cinética aeróbica, la síntesis proteica se mantiene durante los 28 min que duró el estrés térmico sin disminuir. En el caso de la mutante en *rpoH* se observó nuevamente síntesis de estas proteínas debido a la ausencia del factor σ^H por lo que no se transcriben los genes de choque térmico. En la mutante en *rpoS* se observa la síntesis de estas proteínas después de aproximadamente 4 min después del estrés y esta síntesis, al igual que en condiciones aeróbicas, se mantiene conforme transcurre el tiempo.

En la fase esacionaria de crecimiento anaeróbico la respuesta al choque térmico es más temprana (a los 4 min después del estrés) y se mantiene durante el lapso de tiempo analizado sin disminuir. Nuevamente, no se observa síntesis proteica en las cepas *rpoH* y *rpoS* debido probablemente a error en el desarrollo de la técnica experimental.

Capítulo IV. DISCUSIÓN

IV.1 Conclusiones generales

Escherichia coli es una bacteria facultativa donde uno de sus hábitats naturales es el tracto gastrointestinal. Dado este hecho, mucha de su existencia transcurre en condiciones anaeróbicas y en fase estacionaria de crecimiento. La importancia del presente trabajo radica en que la mayoría de los estudios realizados para analizar la respuesta al choque térmico se han llevado a cabo en condiciones aeróbicas de crecimiento y en este trabajo por primera vez se analizó la respuesta al estrés térmico y oxidativo en condiciones anaeróbicas y en fase estacionaria. En esta Tesis analizamos el efecto del estrés oxidativo y del estrés térmico en el mantenimiento de la viabilidad de tres cepas: MC4100, JMH0039 (*rpoS*) y BB7224 (*rpoH*), estudiando las fases de crecimiento exponencial y la estacionaria, analizando el efecto de realizar el experimento en condiciones aeróbicas o anaeróbicas de crecimiento. También se analizó el efecto del estrés térmico en la síntesis proteica estudiando ambas fases de crecimiento tanto aeróbicas como anaeróbicas.

Referente a los resultados de los ensayos de viabilidad, en el caso de la cepa BB7224 (*rpoH*), se observó que al ser sometida tanto a estrés térmico como estrés oxidativo en condiciones aeróbicas de crecimiento, la viabilidad de la cepa se observa significativamente afectada pero únicamente en fase exponencial de

crecimiento. En fase estacionaria, la viabilidad de la cepa se observa semejante a la de la cepa control. En condiciones anaeróbicas de crecimiento, se observó que esta cepa mutante es extremadamente sensible en fase exponencial al estrés térmico, lo que sugiere que en anaerobiosis se encuentran ausentes proteínas que ayudan a contender contra el estrés y que, aunado a la ausencia de las chaperonas en esta cepa mutante, la sensibilidad al estrés térmico de ésta cepa se ve incrementada. La sensibilidad al estrés oxidativo también es mayor, aunque no en la misma intensidad que en condiciones de estrés térmico.

En cuanto a los ensayos de viabilidad de la cepa JMH0039 (*rpoS*) se observó que es más sensible a estrés oxidativo que a estrés térmico cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial de crecimiento y esta sensibilidad se incrementa en condiciones de anaerobiosis. En cuanto al estrés térmico, sólo en anaerobiosis la viabilidad de la cepa se observa significativamente disminuida en fase exponencial de crecimiento.

En esta cepa no se expresa el factor σ^S ; por lo tanto, en fase estacionaria hay niveles bajos de transcripción de genes de esta fase de crecimiento que ayudan a contender contra el estrés en general. Se esperaría entonces que la viabilidad de esta cepa estuviera significativamente afectada al ser sometida a estrés térmico y oxidativo en fase estacionaria, sin embargo, esto no sucede, ni en aerobiosis ni en anaerobiosis. Únicamente se observó disminución en la viabilidad cuando se sometió a estrés oxidativo anaeróbico. El hecho de que la mutante no fuese sensible al estrés en fase estacionaria nos sugiere que existen mecanismos adicionales que escapan de la regulación de RpoS permitiendo a la célula contender contra estos tipos de estrés.

Los resultados obtenidos referentes a la síntesis proteica en la cepa MC4100 mostraron que la respuesta al choque térmico se sostiene durante un periodo largo de tiempo bajo condiciones anaeróbicas de crecimiento. En condiciones aeróbicas, esta respuesta se presenta, pero disminuye conforme

transcurre el tiempo (Figs. 3.6 y 3.7). Estos resultados nos muestran que la respuesta al choque térmico es diferente en condiciones aeróbicas que anaeróbicas, debido a que el metabolismo en ambas condiciones es diferente. En este caso, en ambas situaciones se sintetizan las proteínas de choque térmico que analizamos (Hsp90, DnaK y GroE), sin embargo, ésta síntesis no es igual. En ambos casos, la síntesis de estas proteínas es inmediata pero mientras que en condiciones aeróbicas la respuesta disminuye con el transcurso del tiempo, en condiciones anaeróbicas ésta se mantiene constante durante el periodo de tiempo analizado.

En cuanto a la cepa BB7224 (*rpoH*), ésta al no tener el gene que codifica para el factor σ^H , no puede llevarse a cabo la transcripción de los genes de choque térmico y por esta razón, no se observa en las imágenes de las autorradiografías la síntesis de las proteínas estudiadas (Hps90, DnaK y GroE) esto ni en condiciones aeróbicas ni en anaeróbicas. En el caso de la cepa JMH0039 (*rpoS*) se observó síntesis proteica de este triplete de proteínas. Se esperaba que, al tener esta cepa intacto el gene *rpoH* y al estar presente en ambas el factor σ^{70} , la síntesis proteica fuera similar a la de la cepa MC4100 sin embargo, esto no fue así. Esto nos sugiere que por algún motivo, en esta cepa mutante, σ^H no activa inmediatamente la transcripción de los genes de choque térmico. Lo que nos sugiere que la presencia de σ^S es indispensable para la activación temprana de σ^H como factor transcripcional de los genes de choque térmico.

Se debe de repetir el marcaje radiactivo en fase estacionaria de ambas cepas mutantes, la JMH0039 (*rpoS*) y la BB7224 (*rpoH*) ya que debido muy probablemente a un mal desarrollo experimental de la técnica, no se logró obtener el marcaje proteico de ambas cepas mutantes. Esto con el fin de reevaluar si se sintetizan estas proteínas bajo dichas condiciones, lo que nos ayudaría, por ejemplo, en el caso de la cepa JMH0039 a entender por qué en fase estacionaria la viabilidad de esta cepa no se observa significativamente alterada comparada

con el control. También sería de gran interés observar el efecto del estrés oxidativo en la síntesis de estas proteínas, analizando ambas fases de crecimiento y en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de crecimiento.

Capítulo V. REFERENCIAS

1. Arsene, F., Tomoyasu, T. y Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Intl. J. Food Microbiol.* **55**: 3-9.
2. Bloom, M., Skelly, S., VanBogelen, R., Neidhart, F., Brot, N. y Weissbach, H. (1986). *In vitro* effect of the *Escherichia coli* heat shock regulatory protein on expression of heat shock genes. *J. Bacteriol.* **166**: 380-384.
3. Bromberg, R., George, S. M. y Peck, M. W. (1998). Oxygen sensitivity of heated cells of *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl. Microbiol.* **85**: 231-237.
4. Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**: 327-381.
5. Connolly, L., Yura, T. y Gross, C. A. (1999). Autoregulation of the heat shock response in prokaryotes. *In Molecular Chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanism.* (ed. B. Bukau), Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
6. Davies, K. J. y Goldberg, A. L. (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 8227-8234.

7. Ding, H., Hidalgo, E. y Dimple, B. (1996). The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J. Biol. Chem.* **271**: 33173-33175.
8. Driessen, A. J., Fekkes, P. y Van der Wolk, J.P. (1998). The Sec System. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 216-222.
9. Dukan, S. y Nyström, T. (1999). Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 26027-26032.
10. Eilers, M. y Schatz, G. (1988). Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes. *Cell* **52**: 481-483.
11. Greenberg, J. T. y Dimple, B. (1988) Overproduction of peroxide-scavenging enzymes in *Escherichia coli* suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agents in *oxyR*-mutants. *EMBO J.* **7**: 2611-2617.
12. Groat, R. G., Schultz, J. E., Zychlinsky, E., Bockman, A. y Matin, A. (1986). Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* **186**: 486-693.
13. Guerra, E., Chye, P. P., Berardi, E. y Piper, P. W. (2005). Hypoxia abolishes transience of the heat-shock response in the methylotropic yeast *Hansenula polymorpha*. *Microbiology* **151**:805-811.
14. Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1996), *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York, Oxford Science Publications.

15. Hayes, S. A y Dice, J. F. (1996). Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J. Cell. Biol.* **132**: 255-258.
16. Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS selective?. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 591-595.
17. Jacob, U., Muse, W., Eser, M. y Bardwell, J. C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**: 341-351.
18. Jenkins, D. E., Schultz, J. E. y Matin, A. (1988). Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3910-3914.
19. King, T. y Ferenci, T. (2005). Divergent roles of RpoS in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **244**: 323-327.
20. Kitagawa, M., Matsumura, Y. y Tsuchido, T. (2000). Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**: 165-171.
21. Kolter, R., Siegele, D. A. y Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 855-874.
22. Lengeler, J.W., Drews, G. y Shelegel, H.G. (1999). *Biology of the prokaryotes*, Lengeler, J.W., Drews, G. y Shelegel, H. G. (eds), Thieme.
23. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadman, E. R. Y Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**: 346-357.

24. Luft, R. (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 8731-8738.
25. Maurizzi, M. R. (2001). The function of chaperones and proteases in protein quality control and intracellular protein degradation. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press.
26. Membrillo-Hernández, J., Kwon, O., De Wulf, P., Finkel, S. E., y Lin, E. C. C. (1999). Regulation of *adhE* (encoding ethanol oxidoreductase) by the Fis protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 7390-7393.
27. Membrillo-Hernández, J. y Lin, E. C. C. (1999). Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: transcription from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS. *J. Bacteriol.* **181**: 7571-7579.
28. Mizushima, T., Ohtsuka, Y., Miki, T. y Sekimizu, K. (1994). Temperature shift-up leads to simultaneous and continuous plasmid DNA relaxation and induction of DnaK and GroEL proteins in anaerobically growing *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiol Lett.* **121**: 333-336.
29. Morimoto, R. I., Kline, M. P., Blimston, D. N. y Cotto, J. J. (1997). The heat-shock response: regulation and function of heat shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* **32**: 17-29.
30. Mogk, A., Bukau, B. y Deuerling, E. (2001). Cellular functions of cytosolic *Escherichia coli* chaperones. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press.

31. Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A. y Vaugh, V. (1984). The genetics and regulation of the heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **18**: 295-329.
32. Ranson, N. A., White, H. E. y Saibil, H. R. (1998). Chaperonins. *Biochem. J.* **333**: 233-242.
33. Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G., y Beckwith, J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* **179**: 6602-6608.
34. Rockabrand, D., Arthur, T., Korinek, G., Livers, K. y Blum, P. (1995). An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H₂O₂ resistance and reductive division. *J. Bacteriol.* **177**: 3695-3703.
35. Ruddock, L. W. y Klappa, P. (1999) Oxidative stress: Protein folding with a novel redox switch. *Curr. Biol.* **9**: R400-2.
36. Sambrook, J. y Rusell, D. W. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
37. Sies, H. (1991). En "Oxidative Stress: Antioxidants", (Siesm H. eds.) Academic Press London.
38. Song, J. y Morimoto, R. I. (2001). Hsp70 chaperones net works: the role of regulatory co-chaperones in coordinating stress responses with growth and death. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press.

39. Storz, G., Tartaglia, L.A. y Ames, B. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
40. Storz, G. y Zheng, M. (2003). Oxidative Stress. In *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. y Hengge-Aronis, R., (eds), Washington, D.C., ASM Press.
41. VanBogelen, R. A., Acton, M. A. y Neidhart, F. C. (1989). Induction of heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Gen. Dev.* **1**: 525,531.
42. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. y Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell.* **17**: 381-392.
43. Wu, J y Weiss, B. (1992). Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 3915-3920.
44. Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, M, Brett, J., Godman, G., Zou, Y.S., Scott, C. W., Caputo, C., Frappier, T., Smith, M.A., Perry, G., Yen, S.H. y Stern, D.R. (1994). Glycated Tau protein in Alzheimer disease; a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 7787-7791.
45. Zheng, M., Aslund, F. y Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.