

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Respuesta al estrés por calor y oxidativo en fase estacionaria y anaerobiosis y papel de Aconitasa B en la protección de proteínas contra el daño por oxidación en *Escherichia coli* K12

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Presenta

Q.F.B. Alondra Elizabeth Díaz Acosta

México, D.F. Abril 2009



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.

RESUMEN

Entender los mecanismos moleculares de la respuesta a estrés en bacterias nos provee de información valiosa. Esta información pudiera ser usada, por ejemplo, en el diseño de antibióticos específicos para combatir diversas enfermedades causadas por estos microorganismos.

La primera parte de este proyecto analiza los posibles mecanismos moleculares de respuesta ante estrés por calor en las condiciones naturales de la bacteria *Escherichia coli*: la fase estacionaria anaeróbica. El hábitat natural de *Escherichia coli* es el tracto gastrointestinal de mamíferos, donde prevalecen condiciones anaeróbicas y condiciones nutricionales que llevan a las células a subsistir en fase estacionaria. Este trabajo investigó la respuesta a estrés por calor de *Escherichia coli* K-12 en aerobiosis y anaerobiosis. Una mutante en *rpoH* (factor transcripcional σ^{32}) muestra una mayor sensibilidad al calor sólo en la fase exponencial aeróbica. Esto no sucede ni en fase exponencial anaeróbica ni en fase estacionaria aeróbica, lo que indica que existen mecanismos σ^{32} -independientes que protegen a las células del estrés por calor. Nuestros resultados demuestran que σ^S no es parte de este sistema de protección. Asimismo encontramos, a partir del análisis de las cinéticas de síntesis de Heat Shock Proteins (Hsps), que en anaerobiosis ante un abrupto cambio de temperatura, la síntesis de Hsps es activada más rápido y se mantiene por más tiempo, lo que no sucede en fase exponencial aeróbica. Nuestros resultados demuestran que las células en estrés por calor en fase exponencial aeróbica tienen una alta concentración de proteínas oxidadas en presencia de 4 mM H_2O_2 . Esto no se observa en fase estacionaria aeróbica y fase exponencial anaeróbica.

La segunda parte de este proyecto analiza un mecanismo de protección de proteínas ante la oxidación y usamos como modelo a la enzima AdhE. La proteína AdhE cataliza las reducciones secuenciales que convierten acetil-CoA en acetaldehído y éste en etanol, consumiendo NADH durante la fermentación

de ácidos mixtos de *Escherichia coli*. Dado que estas reacciones son reversibles, esto sugiere que *Escherichia coli* podría utilizar etanol como única fuente de carbono y energía; sin embargo, en aerobiosis esto no sucede debido principalmente a la inactivación por oxidación de AdhE. Anteriormente se había reportado que la mutante JE52 puede crecer en etanol aerobicamente debido a dos mutaciones puntuales que mejoran las propiedades catalíticas y la estabilidad de AdhE por medio de la interacción física con la chaperona molecular DnaK. Buscando nuevos componentes del mecanismo de protección de proteínas ante oxidación aislamos mutantes derivadas de JE52 por inserción de un transposón las cuales perdieron la capacidad de crecer en etanol. Una de estas mutantes se encuentra en el gen *acnB* que codifica para Aconitasa B (AcnB). En ausencia de AcnB, se abate la actividad aeróbica de AdhE y aumenta la oxidación de muchas otras proteínas. Por medio de experimentos de complementación y coinmunoprecipitación demostramos que la actividad catalítica de AcnB no es necesaria para proteger proteínas de la oxidación y que AdhE y AcnB interactúan físicamente. De esta forma proponemos un modelo donde AcnB en su forma no catalítica y junto con DnaK protege proteínas del daño oxidativo.

ABSTRACT

The response to stress in bacteria is an interesting area of research in Molecular Biology. The understanding of these mechanisms might provide useful information in the design of specific antibiotics. In this research project, we analysed the possible molecular mechanisms of the heat shock response in the natural living condition of *Escherichia coli*: anaerobic stationary phase. Furthermore, we propose a mechanism of protein protection from oxidative stress.

Escherichia coli occurs naturally in the gastrointestinal tract, under anaerobic conditions and stationary phase. We analysed the heat shock response of *E.coli* K-12 in the presence or absence of oxygen. A *rpoH* null mutant exhibited an increased sensitivity to heat shock but only aerobic exponential phase. Interestingly, this is not the case in anaerobic growth conditions, or in aerobic stationary phase, suggesting that there must be σ^{32} -independent mechanisms in protecting cells from heat stress. Surprisingly, σ^S is not involved in this protection mechanism. We also showed in this work, based on the analysis of the kinetics of synthesis of Heat shock proteins (Hsps) after an abrupt rise in temperature, that in the absence of oxygen, a faster synthesis of Hsp occurs and is maintained for a longer period of time compared to aerobic growth conditions. Finally, we found that, heat shocked cells in aerobic exponential phase displayed a higher concentration of oxidatively damaged proteins in the presence of 4 mM H_2O_2 , in sharp contrast to cultures of stationary phase or anaerobic growth.

We used the enzyme AdhE as a model to study mechanisms of protein protection to oxidative stress. AdhE catalyzes successive reductions of acetyl-CoA to acetaldehyde and then to ethanol at the expense of NADH. Since these reactions are reversible, it is possible that *Escherichia coli* could grow on ethanol. However, under aerobic conditions this does not occur, due to the low level of

adhE expression, and oxidative inactivation of the AdhE protein. It has been reported that the JE52 mutant (AdhE^{A267T E568K}) is able to grow aerobically on ethanol, due to with improved catalytic properties and stability. In addition, aerobic AdhE activity requires the molecular chaperone DnaK. In order to look for new components in the protection of the aerobic activity of AdhE, we isolated a JE52-derived transposon mutant that lost the ability to grow on ethanol. The insertion mapped in *acnB*. Loss of AdhE activity upon exposure to oxygen was more severe in an *acnB* mutant and protein carbonyl content was dramatically enhanced. Complementation and immunoprecipitation experiments demonstrated that 1) The catalytic activity of AcnB is not required, and 2) AdhE and AcnB proteins physically interact. We propose a model where AcnB protects proteins from oxidative damage as part of a complex with DnaK.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por darme una familia que me ha amado y apoyado en todo, por darme a Israel y a Giselle y por darme la capacidad y perseverancia para poder llegar a este momento.

A Israel por ayudarme a culminar con este sueño, por su apoyo incondicional, por su paciencia y por siempre estar dispuesto a hacer algo más por nosotros. Te amo beboch.

A Giselle, por enseñarme que las cosas a veces deben suceder a un tiempo y en una forma específicas, por enseñarme a compartir mi espacio, mi tiempo y mis recursos y por tantas cosas bellas que me da todos los días con tan sólo abrir sus ojitos y sonreír. Te amo Yiya.

A mi mamá y a Vicente por el enorme apoyo y ayuda que me han brindado a mí y a mi nueva familia. Que Dios los bendiga, los llevo siempre en mi corazón.

A Fabiola, por siempre estar cuando la necesito y por ser mi tercera madre. Te quiero mucho Chabis.

A mis amigas: Shilpa y Daniela por compartir conmigo momentos cruciales de mi vida. El tiempo y la distancia no fragmentarán nuestra amistad.

A la Dra. Elizabeth Hernández Urzúa y al Técnico académico Dr. Luis Delgado Olivares, por enseñarme y ayudarme en mi trabajo experimental. Son grandes maestros y excelentes personas y amigos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Gerardo, Adriana, Nora y Tecilli por su tiempo, sus sugerencias y su amistad.

Al Sr. Miguel Páez Silva, por su invaluable ayuda técnica en este proyecto, pero sobre todo por su excelente actitud ante el trabajo arduo.

A la Dra. Carmen Gómez Eichelmann y al Dr. Sergio Encarnación Guevara por su valiosa ayuda y apoyo en cada paso de la realización de este proyecto de investigación. Gracias por todo.

A los miembros del jurado Dra. Carmen Gómez, Dra. Gloria Soberón, Dr. Alejandro de las Peñas, Dr. David Romero y Dr. Guillermo Gosset, por su invaluable tiempo, paciencia y sugerencias en la escritura de esta tesis.

Al CONACYT y a la DGEP UNAM por otorgarme una beca para realizar mis estudios de doctorado. A los proyectos 42580-Q de CONACYT y 207703 de PAPIIT-UNAM por el donativo otorgado para financiar este proyecto de investigación.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XII
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. El estrés en bacterias	1
1.2. Factores sigma	1
$\sigma^{70/D}$	2
$\sigma^{54/N}$	2
$\sigma^{32/H}$	3
$\sigma^{38/S}$	5
$\sigma^{28/F}$	6
$\sigma^{24/E}$	6
σ^{fecl}	8
1.3. Respuesta a estrés por calor y estrés oxidativo	8
1.3.1. Estrés por calor	8
1.3.2. Estrés oxidativo	10
Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)	11
Daño oxidativo a macromoléculas	13
• DNA	13
• Lípidos	13
• Proteínas (artículo de revisión)	14
Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo	15
• El sistema de dos componentes SoxRS	16
• OxyR	17
1.4. La alcohol deshidrogenasa (AdhE) de <i>Escherichia coli</i>	18
1.4.1. AdhE	18
1.4.2. AdhE como modelo para estudiar la oxidación de Proteínas	20

1.5. Objetivos	22
1.6. Planteamiento del problema y justificación	22
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Lista de cepas utilizadas	23
2.1.1. Mantenimiento de cepas	24
2.2. Lista de plásmidos utilizados	24
2.3. Lista de oligonucleótidos utilizados	25
2.4. Medios de cultivo, antibióticos y suplementos utilizados	25
2.5. Lista de bacteriófagos utilizados	26
2.6. Técnicas genéticas	26
2.6.1. Propagación del bacteriófago P1 _{vir}	26
2.6.2. Transducción mediada por el bacteriófago P1 _{vir}	27
2.6.3. Mutagénesis al azar por transposición	28
2.6.4. Transformación	28
2.7. Técnicas moleculares	29
2.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.7.2. Purificación de plásmidos	30
2.7.3. Purificación de DNA cromosomal	30
2.7.4. <i>Southern Blot</i>	31
2.7.5. Marcaje metabólico con ³⁵ S- Met	32
2.8. Técnicas bioquímicas	33
2.8.1. Actividad de β-galactosidasa	33
2.8.2. Decaimiento de la actividad de AdhE	34
2.9. Técnicas inmunológicas	35
2.9.1. <i>Western Blot</i>	35
2.9.2. Coimmunoprecipitación	36
2.10. Técnicas microbiológicas	38
2.10.1. Conteo de células viables: prueba de sensibilidad a H ₂ O ₂	38
2.11. Métodos bioinformáticos	38
2.11.1. Análisis tipo BLAST	38

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1. ARTÍCULO: Diaz-Acosta, <i>et al.</i> , 2006 Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in <i>Escherichia coli</i> K-12. Arch Microbiol (2006) 185:429–438.	39
3.2. Resultados adicionales no publicados	40
Experimentos iniciales	40
Mutaciones que afectan la funcionalidad del gen <i>adhE</i>	41
3.2.1. Análisis fisiológico: Crecimiento en medio mínimo glucosa en anaerobiosis	41
3.2.2. Análisis bioquímico: Medición de la actividad de AdhE en aerobiosis y anaerobiosis	42
3.2.3. Análisis molecular: <i>Southern Blot</i> y amplificación por PCR del gen <i>adhE</i>	43
3.2.4. Actividad de β -galactosidasa de una fusión transcripcional $\Phi(adhE'-lacZ)$	44
3.2.5. Evaluación de una posible mutación en el gen <i>dnaK</i>	46
3.2.6. Mapeo del sitio de inserción del transposón miniTn10dkan en las mutantes JMH0198 y JMH0199	46
Inserción en la mutante JHM0198	47
Inserción en la mutante JMH0199	48
Papel de las enzimas AcnB y Mdh	49
3.2.7. Complementación de las mutantes con <i>dnaK</i> , <i>acnA</i> , <i>acnB</i> y <i>apo acnB</i>	50
3.2.8. Decaimiento de la actividad enzimática de AdhE	52
3.2.9. Coimmunoprecipitación	55
3.2.10. Sensibilidad a H ₂ O ₂	56
3.2.11. Patrón de carbonización de proteínas	57
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	60
CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS	62
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A.** *Southern Blot* con DNA cromosomal de cepas MC4100 y mutantes JMH0198 y JMH0199 utilizando como sonda el producto de PCR de una parte interna del gen *adhE*. B. PCR en fragmentos del marco abierto de lectura y promotor del gen *adhE*. 43
- Figura 2.** *Southern Blot* con DNA cromosomal de la cepa silvestre MC4100 y mutantes JMH0198 y JMH0199 utilizando como sonda un producto de PCR del marco abierto de lectura y zona promotora del gen *mdh* 48
- Figura 3.** *Southern Blot* con DNA cromosomal de la cepa silvestre MC4100 y mutantes JMH0198 y JMH0199 utilizando como sonda el marco abierto de lectura del gen *acnB* 49
- Figura 4.** Crecimiento en etanol de las cepas MC4100, JE52 y mutante JMH0199 complementadas con plásmidos que contienen los genes *acnB* silvestre, *acnB* apo, *acnA* y *dnaK* 51
- Figura 5.** Cinéticas de decaimiento de la actividad de AdhE en cultivos que fueron cambiados en fase exponencial de anaerobiosis a aerobiosis 53
- Figura 6.** La inactivación de AdhE por calor aumenta en la mutante *acnB* 54
- Figura 7.** *Western Blot* con anticuerpo anti-AcnB 56
- Figura 8.** Viabilidad de las cepas MC4100, JE52, JMH0199 y *acnB* después de exposición a H₂O₂ 8 mM por 90 minutos 57
- Figura 9.** Oxidación de proteínas por carbonilación, determinada por *Western Blot* en las cepas MC4100 (w.t.), JE52 y JMH0199 58
- Figura 10.** Modelo de protección de AcnB. 59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Genes regulados por la proteína SoxS en presencia de superóxido en <i>E. coli</i>	17
Tabla 2. Genes regulados por la proteína OxyR en presencia de H ₂ O ₂ en <i>E. coli</i>	17
Tabla 3. Lista de Cepas	23
Tabla 4. Lista de Plásmidos	24
Tabla 5. Lista de Oligonucleótidos	25
Tabla 6. Antibióticos y suplementos utilizados en los medios de cultivo	26
Tabla 7. Bacteriófagos utilizados	26
Tabla 8. Actividades de etanol oxidoreductasa (Unidades de AdhE/mg proteína total)	42
Tabla 9. Actividad de β-galactosidasa de una fusión transcripcional Φ(<i>adhE-lacZ</i>) en las transductantes JMH0195 y JMH0196	45

1.1 EL ESTRÉS EN BACTERIAS

Las bacterias en su hábitat natural con frecuencia están expuestas a limitación de nutrientes y otros estreses. El estrés es cualquier condición ambiental que amenaza la integridad de la célula. Como consecuencia, las bacterias normalmente se dividen lentamente o viven indefinidamente en fase estacionaria.

Existe una respuesta general al estrés que normalmente comprende disminución en la tasa de crecimiento o bien el comienzo de fase estacionaria. Las condiciones más comunes que causan estrés son la falta de nutrientes, la hiperosmolaridad, el bajo pH, la presencia de agentes oxidantes y la temperatura alta o baja. Las consecuencias fisiológicas incluyen la resistencia múltiple a estrés, la acumulación de compuestos de almacenaje, los cambios en la composición de la envoltura celular y las modificaciones en la morfología (células más pequeñas y ovoides) (Hengge-Aronis, 1999).

1.2. Factores sigma

En la naturaleza las bacterias requieren adaptarse rápidamente a condiciones cambiantes del medio. Con la finalidad de modificar el metabolismo y responder a un cambio ambiental *Escherichia coli* posee sistemas de transducción de señales y mecanismos reguladores.

La respuesta general a estrés depende de la activación transcripcional de genes que codifican para proteínas importantes para contender con las nuevas condiciones del medio ambiente. Una forma de activación transcripcional es mediante las subunidades sigma que guían a la RNA polimerasa a genes específicos. El núcleo de la RNA polimerasa de *Escherichia coli* consiste de cuatro subunidades diferentes: $\alpha_2\beta\beta'\omega$ más el factor sigma. El núcleo de la RNA polimerasa y el factor sigma constituyen la holoenzima, que es capaz de iniciar la transcripción en secuencias de DNA específicas denominadas promotores.

Escherichia coli tiene 7 factores sigma: σ^D , σ^N , σ^H , σ^S , σ^F , σ^E y σ^{fecI} . El factor σ^D es el principal y se encarga de la transcripción de genes que codifican proteínas de mantenimiento de la célula. Los otros factores sigmas son alternativos y le permiten a la RNA polimerasa transcribir genes requeridos para la adaptación celular a cambios específicos en el ambiente. Cada factor sigma dirige a la RNA polimerasa a un conjunto determinado de genes (Zhao, *et al.*, 2005)

$\sigma^{70/D}$

El gen que codifica esta subunidad es *rpoD*. Esta subunidad sigma gobierna la transcripción en condiciones sin estrés para el mantenimiento óptimo de la célula durante crecimiento rápido. Es la subunidad mayoritaria en dichas condiciones, por lo que la mayor cantidad de la holoenzima RNA polimerasa contiene σ^D .

$\sigma^{54/N}$

El gen que codifica esta subunidad es *rpoN*. Esta subunidad sigma dirige la transcripción de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno, ciertas rutas de fermentación, síntesis de flagelo, utilización de diferentes fuentes de carbono, y virulencia bacteriana (Reitzer y Schneider, 2001).

Comparando con los otros seis factores sigma de *Escherichia coli*, σ^N posee una estructura diferente. Los factores similares a σ^D unidos a la RNA polimerasa son suficientes para la formación del complejo de promotor abierto, mientras que σ^N cataliza la separación de las cadenas con la ayuda de una clase distinta de activadores transcripcionales. En consecuencia, la transcripción de genes por σ^N puede estar completamente apagada. Los activadores de genes dependientes de σ^N se unen a sitios que son efectivos, no importando la distancia u orientación, como las proteínas de unión a los *enhancers* eucarióticos. Sin embargo, a diferencia de éstas, la función de los activadores transcripcionales de genes del

regulón σ^{54} no es aumentar la transcripción, sino activarla; es decir, sin ellos no existe transcripción. Los activadores transcripcionales interactúan con la holoenzima RNA polimerasa- σ^N desde sus sitios de unión, para lo cual requieren dos proteínas que doblan el DNA: el Factor de integración del hospedero (IHF) y ArgR, el represor de arginina (Reitzer y Schneider, 2001).

Otra característica distintiva de los activadores del regulón σ^N es su actividad de ATPasa. El control más importante sobre los promotores dependientes de σ^N es la modulación de la actividad de ATPasa de los activadores, los cuales poseen un dominio de regulación de dicha actividad. Los mecanismos que controlan la interacción del dominio con actividad ATPasa y el dominio regulador son: fosforilación, interacción con ligandos de bajo peso molecular e interacción con varias proteínas reguladoras (Reitzer y Schneider, 2001).

Dada la compleja regulación del regulón σ^N por medio de sus activadores transcripcionales, la transcripción de *rpoN* es constitutiva, lo cual mantiene constantes las cantidades de σ^N en el citoplasma (Reitzer y Schneider, 2001).

$\sigma^{32/H}$

El gen que codifica esta subunidad es *rpoH*. Fue el primer factor sigma alternativo descubierto en *Escherichia coli*. El regulón de σ^H se induce total o parcialmente en respuesta a varios estímulos; entre ellos está el calor, la hiperosmolaridad, las infecciones por fagos, la exposición a luz ultravioleta, y la presencia de concentraciones sub-letales de sustancias tóxicas como el etanol, H_2O_2 y antibióticos que inhiben la traducción o a la enzima girasa (Bukau, 1993, López-Sánchez, *et al.*, 1997, VanBogelen, y Neidhardt, 1990, Vanbogelen, *et al.*, 1987).

El regulón de este factor sigma comprende genes que codifican para chaperonas moleculares (IbpA, IbpB, HtpG, MopA, MopB, GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE y ClpB), proteasas dependientes de ATP (HslU, HslV, HflC, HflB, ClpX, Lon, FtsH), reguladores (*rpoD*, *htpY* y *htrC*), enzimas como *gap* (GADPH gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), *rfaD* (DL-glicero-D-manoheptosa epimerasa) y *topA* (topoisomerasa I) y varios genes de función desconocida (Gross, 1996, Missiakas, *et al.*, 1996, Richmond, *et al.*, 1999, Zhao, *et al.*, 2005).

La cantidad intracelular de σ^H está regulada principalmente a nivel traduccional y post-traduccional. La transcripción de σ^H aumenta a temperaturas altas, pero el aumento sólo es significativo a temperaturas letales, por lo que probablemente este nivel de regulación de σ^H no es el principal en la activación del regulón. En cambio, la traducción del mRNA de *rpoH* es el punto de regulación más importante. El mRNA de *rpoH* forma una estructura secundaria que ocluye el sitio de unión a ribosoma y el codón de inicio de la traducción. Se han descrito dos regiones importantes en el mensajero, la región A que muestra una alta similitud con un *enhancer* de traducción en el rRNA 16S y la región B que se encuentra 100 nucleótidos río arriba de la región A y puede aparearse con las bases de la región A, formando la estructura secundaria. Ante el aumento de la temperatura, así como en presencia de etanol y antibióticos, se pierde la estabilidad de esta estructura secundaria y el mensajero puede ser traducido (Morita *et al.*, 1999 y Arsène *et al.*, 2000).

A nivel post-traduccional, DnaK, una chaperona miembro del regulón de σ^{32} , se une a este factor sigma evitando su asociación con la RNA polimerasa y promoviendo su proteólisis por FtsH HslVU, ClpAP y Lon. Cuando ocurre un estrés que despliega proteínas, la cantidad de DnaK se titula hacia los sustratos desplegados y libera a σ^{32} , el cual se une a la RNA polimerasa activando la transcripción del regulón, incluyendo a DnaK. El aumento en los niveles de la chaperona DnaK provee un mecanismo de retroalimentación negativa para terminar la respuesta al estrés reestableciendo la proteólisis de σ^{32} (Tilly *et al.*,

1983, Tilly *et al.*, 1989, Straus *et al.*, 1990, Guisbert *et al.*, 2004, Arsène *et al.*, 2000).

$\sigma^{38/S}$

El gen que codifica esta subunidad es *rpoS*. Es el regulador maestro de la respuesta general a estrés. Su estructura tridimensional es muy similar a σ^D . En condiciones de estrés, la cantidad de σ^S funcional aumenta hasta aproximadamente el 30% de la cantidad de σ^D , lo que permite que las dos subunidades sigma compitan por la unión con la RNA polimerasa y así guiar la transcripción. La transcripción guiada por σ^S activa un gran número de genes de protección anti estrés, con promotores específicos para esta subunidad sigma. Por lo tanto, en condiciones de estrés existe transcripción de genes tanto de mantenimiento (guiada por σ^D) como de contención del daño por estrés (Hengge-Aronis, 1999).

La RNA polimerasa presenta menor afinidad por σ^S que por σ^D . La unión de σ^S a la RNA Polimerasa es modulada por su modificación covalente y por cambios en el ambiente intracelular, como concentraciones fluctuantes de ciertas sales, ppGpp o de polifosfato (Kusano, S. *et al.*, 1997, Ding, Q., 1995). Además de las condiciones fisicoquímicas que afectan la integración de los factores sigma a la RNA polimerasa, existen proteínas que participan de la regulación. Por ejemplo, la proteína Rsd forma un complejo con σ^D inhibiendo la transcripción dependiente de σ^D *in vitro* y posiblemente funcionando como un factor anti-sigma específico de σ^D , lo cual facilita la utilización de factores sigma alternativos. (Jishage, M. y Ishihama, A. 1998).

Los niveles de σ^S están regulados a nivel de transcripción, traducción, proteólisis. Cada condición de estrés afecta de forma diferente cada uno de estos niveles de control de σ^S . En condiciones sin estrés, la cantidad de mRNA de *rpoS*

es alta, y su transcripción es mayor aún más cuando las células entran a fase estacionaria (falta de fuente carbono, nitrógeno, fosfato o aminoácidos) o a fase estacionaria tardía, hiperosmolaridad, bajo pH y cuando existen variaciones en la temperatura. Parece ser que estos tipos de estrés influyen en la estructura secundaria del mRNA de *rpoS*, haciendo que el mensajero pueda ser traducido. La activación de la traducción del mRNA de *rpoS* requiere a la proteína Hfq y al RNA pequeño *dsrA*. Es importante remarcar que la sobrevivencia de la célula en la mayoría de los estreses que estimulan la transcripción o traducción de *rpoS* no depende de una respuesta inmediata, sino de una adaptación a largo plazo (Hengge-Aronis 2002).

Por otra parte, los estreses que ocurren súbitamente en los ambientes naturales de las bacterias entéricas reducen o previenen la proteólisis de σ^S , lo cual permite ajustes rápidos en la cantidad del mismo. Estos estreses pueden ser el cambio de fuente de carbono, la disminución del pH, la temperatura alta e hiperosmolaridad. La proteólisis de σ^S depende de la proteasa ClpXP y del regulador de respuesta RssB. σ^S contiene un elemento de regulación ubicado hacia el extremo carboxilo terminal de la proteína, después de la región que reconoce el promotor. RssB se une a este sitio, y dicha unión es un factor de reconocimiento de sustrato por ClpXP. RssB parece ser específico para la degradación de σ^S mediada por ClpXP (Hengge-Aronis 2002).

$\sigma^{28/F}$

El gen que codifica esta subunidad es *rpoF*. Este factor sigma es requerido para la expresión de genes que codifican para proteínas de flagelo y quimiotaxis.

$\sigma^{24/E}$

Escherichia coli presenta dos compartimentos: el citoplasma y el periplasma. Cada compartimento posee su sistema de respuesta al estrés. Los

factores sigma revisados anteriormente modulan la respuesta al estrés en el citoplasma, en cambio la respuesta al estrés extracitoplasmático es mediada por dos rutas, una bajo el control del factor σ^E y la otra bajo el control del sistema de dos componentes CpxAR. Dado que los factores de transcripción se encuentran en el citoplasma y las señales de estrés son extracitoplásmicas, la activación de la respuesta comprende rutas de transducción de señales entre compartimentos. En este caso nos centraremos en la respuesta mediada por σ^E .

σ^E está codificado por el gen *rpoE* y su función es mantener la integridad de la membrana externa. Es inducido en estreses que afectan el plegamiento de proteínas de la membrana externa como temperaturas altas y bajas, presencia de etanol, sobreproducción de porinas de membrana externa o mutaciones que inactivan las chaperonas periplasmáticas (Mecsas, *et al.*, 1993, Raina, *et al.*, 1995, Missiakas *et al.*, 1996, De las Peñas *et al.*, 1997). Los genes del regulón σ^E codifican para chaperonas, proteasas, proteínas de biosíntesis de lípido A, oligosacáridos derivados de membrana y lipoproteínas y otras proteínas relacionadas con funciones periplásmicas (Alba, B.M., Gross C.A., 2004).

σ^E tiene dos reguladores negativos, RseA y RseB que están codificados en el operón de σ^E (Missiakas *et al.*, 1997, De las Peñas *et al.*, 1997). RseA es una proteína integral de membrana con un dominio N-terminal citoplasmático que funciona como un factor antisigma de σ^E , bloqueando las zonas de unión de este factor con la RNA polimerasa (Campbell *et al.*, 2003). RseB es un regulador negativo *menor* de σ^E y es una proteína que se une al dominio periplásmico de RseA. RseB aumenta la estabilidad o la actividad de RseA (Ades *et al.*, 1999, Collinet *et al.*, 2000).

Existe un regulador positivo menor de σ^E , RseC, el cual tiene un papel no específico en la biosíntesis de tiamina y también participa en la reducción-inactivación de SoxR oxidado cuando el estrés oxidativo ha cesado (Missiakas *et al.*, 1997, De las Peñas *et al.*, 1997, Beck *et al.*, 1997, Koo *et al.*, 2003).



Este factor sigma fue originalmente descrito como una proteína reguladora del sistema de transporte de citrato férrico. Posteriormente se descubrió, basándose en su secuencia de aminoácidos, que es un miembro de la subfamilia de factores sigma que regulan genes de función extracitoplásmica (Lonetto *et al*, 1998).

1.3. Respuesta a estrés por calor y estrés oxidativo

1.3.1. Estrés por calor

La respuesta celular a estrés por calor (*Heat shock*/ EPC) es una respuesta evolutivamente conservada en bacterias, arqueas y eucariontes.

El estrés por calor induce un incremento rápido y transitorio en la síntesis de un grupo de proteínas altamente conservado y específico conocidas como *heat shock proteins* (proteínas de estrés por calor, Hsps). Las principales Hsps son chaperonas que catalizan el plegamiento correcto de las proteínas y proteasas que degradan proteínas desplegadas. Las Hsps son importantes para la célula, tanto en condiciones normales de crecimiento, como en situaciones de estrés.

La respuesta al *Heat shock* puede dividirse en dos fases: inducción y adaptación. En la inducción se presenta un aumento en la síntesis de las Hsps el cual, dependiendo de la proteína y de la intensidad del estrés, puede ser de 25 a más de 100 veces. La inducción es rápida y se completa en menos de un ciclo celular. En la fase de adaptación la tasa de síntesis de las Hsps disminuye y alcanza un nuevo nivel, superior al presente antes del estrés. El nuevo nivel de síntesis de las Hsps depende de la diferencia entre la temperatura inicial y la del *Heat shock*; mientras mayor es la diferencia, mayor es el nuevo nivel. En el caso

de cambios a temperaturas sub-letales o letales, además del incremento en la síntesis de las Hsps, se presenta una disminución en la síntesis del resto de las proteínas.

En células de *E. coli* creciendo en medio rico, el cambio rápido de una temperatura de 30°C a 42-43°C produce un aumento en la síntesis de las Hsps y un aumento menor en la síntesis del resto de las proteínas. El cambio a temperaturas más elevadas, 45 -47°C, causa una disminución en la síntesis de las proteínas generales y un aumento importante en las Hsps. Finalmente, el cambio a 50°C (una temperatura letal), induce la represión casi total de la síntesis de las proteínas generales y un gran incremento en la síntesis de las Hsps (Bukau, 1993, Neidhardt, y VanBogelen, 1987).

El aumento de algunas de las Hsps protege transitoriamente a las células de la exposición a temperaturas letales. Por ejemplo, si *E. coli* se expone por un tiempo corto a 42° C y luego a 50°C, el porcentaje de células que sobreviven es mayor al de las células que se pasan directamente de 30° C a 50°C. Este fenómeno -llamado termotolerancia- está presente en las células de todos los organismos (Parsell y Lindquist, 1993).

Las principales Hsps son chaperonas, proteasas y proteínas reguladoras. Las chaperonas moleculares interaccionan de manera transitoria y no covalente con otras proteínas. La función de estas proteínas es favorecer el plegamiento correcto, el transporte de proteínas, mediar el ensamble y desensamble de complejos multiproteicos, presentar proteínas a las proteasas para su degradación, prevenir la agregación y desagregar a las proteínas bajo condiciones de estrés. Las proteasas son enzimas ATP-dependientes que en condiciones normales de crecimiento regulan la degradación de proteínas en general y de algunos reguladores mantener su concentración adecuada.

El estrés por calor, además de inducir un incremento en la síntesis de las Hsps, modifica de manera general la estructura y la fisiología celular. Por ejemplo,

el estrés por calor modifica la fluidez membranal, la topología e integridad del DNA, la estructura de las proteínas, la organización del citoesqueleto y de los ribosomas (Bukau, 1993, Camacho-Carranza, *et al.*, 1995, Mejía, *et al.*, 1995, Neuman y Nover, 1991).

Además del calor, hay otros estímulos capaces de inducir la síntesis de las Hsps. Estos estímulos incluyen infecciones por virus, radiaciones ultravioleta, cambios en osmolaridad, oxigenación, pH y nutrientes, presencia de sustancias tóxicas como etanol, metales pesados y algunos antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas. Cada estímulo determina una respuesta particular en cuanto a nivel de inducción, cinética y Hsp que induce. El inductor más potente es el calor mismo, el cual induce la expresión de todo el repertorio de Hsps, mientras que la mayoría de los otros estímulos inducen la expresión de sólo algunas de estas proteínas. (Krueger y Walker, 1984, Nover, 1991).

Los mecanismos de inducción de una respuesta celular similar al estrés por calor por otros estímulos aún no son claros. Los datos experimentales apoyan la propuesta de que todos estos estímulos generan cambios en la conformación de las proteínas y por tanto una señal común. Sin embargo, no se excluye que las modificaciones que se presentan en otras moléculas y estructuras celulares (DNA, membrana, ribosomas) actúen también como señales para responder al estímulo (Bukau, 1993, VanBogelen y Neidhardt, 1990).

1.3.2. El estrés oxidativo

El estrés oxidativo es la pérdida en el balance entre agentes prooxidantes y antioxidantes, a favor de los prooxidantes (Storz y Zheng, 2000).

Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Todos los organismos aeróbicos al utilizar el oxígeno molecular (O_2) como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria, tienen que contener con la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que son agentes oxidantes. A nivel fisiológico, las EROs se generan por la inespecificidad de las enzimas redox de la cadena respiratoria, que pueden reducir parcialmente O_2 . Algunas EROs son producidas por excitación del O_2 o ruptura de éste por radiación de alta energía. Las EROs se clasifican en dos tipos de acuerdo a su origen: 1) las que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , como el oxígeno atómico (O), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (1O_2) y 2) las que están parcialmente reducidas, como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Hansberg-Torres, 2002).

Algunas de las EROs que se generan son radicales libres. Un radical libre es cualquier especie capaz de existir independientemente con uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1999). El O_2 es un diradical, ya que tiene dos electrones desapareados con giros paralelos. Los electrones con giros paralelos sólo pueden reaccionar con electrones que giren en sentido opuesto a éstos. Por esta razón el O_2 no es tan reactivo como las EROs (Halliwell, 2006, Hansberg-Torres, 2002).

El oxígeno atómico, O, se produce a través de la ruptura de los dos enlaces covalentes del O_2 por la luz ultravioleta. El oxígeno atómico puede combinarse con el O_2 para generar el ozono, que es más oxidante que el O_2 . El O_3 reacciona con las proteínas, los lípidos, el NAD(P)H, el ascorbato, el ácido úrico y además puede generar otras especies reactivas (Hansberg-Torres, 2002).

El 1O_2 se forma cuando uno de los dos electrones libres del O_2 capta energía y cambia de giro. Esta especie es muy reactiva y es capaz de reaccionar

con la mayoría de las moléculas de la célula, principalmente DNA, proteínas y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg-Torres, 2002).

Las EROs que se forman por reducción parcial del O_2 son: ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que puede reaccionar con quinonas, fenoles y con el hierro libre o unido a proteínas (con los grupos [Fe-S]), además puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico. El $O_2^{\cdot-}$ reduce al Fe(III) en Fe^{2+} , además reacciona con el ascorbato pero no con el NAD(P)H o con el DNA, lípidos o los aminoácidos (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg-Torres, 2002).

Al captar un segundo electrón $O_2^{\cdot-}$ se forma el ión peróxido (O_2^{2-}) el cual no tiene electrones desapareados y no es un radical. A pH fisiológico el O_2^{2-} es protonado para formar H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1984). Esta reacción es llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa; aunque también algunas otras oxidasas pueden formar H_2O_2 , como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las de fenoles. El H_2O_2 es una especie poco reactiva y se difunde a través de la célula. Reacciona con el ascorbato pero no con el NAD(P)H, el DNA, lípidos y la mayoría de las proteínas (Hansberg, 2002).

El $\cdot OH$ y el ión hidroxilo ($\cdot HO$) se forman cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ . Esta reacción es conocida con el nombre de reacción de Fenton. El $\cdot HO$ es inocuo ya que se protona y forma agua, sin embargo el $\cdot OH$ es una de las moléculas más reactivas, dado que es oxidante y se difunde rápidamente, además puede reaccionar con cualquier compuesto celular (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg, 2002).

Daño oxidativo a macromoléculas

Las reacciones entre EROs y macromoléculas son complejas *in vivo* debido a las propiedades de superficie de las membranas, cargas eléctricas y propiedades de unión de macromoléculas. Debido a esto, los diferentes sitios dentro de una célula difieren en la naturaleza y extensión de las reacciones que se dan con EROs.

- **DNA**

El daño que se provoca en el DNA depende de la presencia de hierro. Las EROs, principalmente el $\cdot\text{HO}$, atacan las bases y la desoxirribosa de las cadenas de DNA, produciendo 8-hidroxiguanina, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina, además puede provocar el rompimiento de una o las dos cadenas del DNA. Estas lesiones evitan que las proteínas que interaccionan con el DNA se unan, dañando la replicación y la transcripción (Fang, 2004; Cabisco *et al.*, 2000)

- **Lípidos**

Los lípidos son el principal blanco de oxidación en la célula. Los radicales libres pueden atacar directamente a los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas, iniciando la peroxidación de lípidos. El efecto primario de la peroxidación es la disminución de la fluidez de la membrana, además puede dañar a las proteínas que se encuentran ancladas en ella. Esto puede provocar la formación de más radicales. Los ácidos grasos poliinsaturados son degradados a una gran variedad de productos, como aldehídos que son muy reactivos y pueden dañar proteínas (Cabisco *et al.*, 2000).

- **Proteínas**
(ARTICULO DE REVISIÓN)

CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS POR CARBONILACIÓN EN DIVERSOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Alondra E. Díaz-Acosta* y Jorge Membrillo-Hernández**

Lab. de Microbiología y Genética Molecular, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. C.P. 04510, México, D.F.
E-mail: *alondradiaz@biomedicas.unam.mx; **jmh@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

El metabolismo celular aeróbico, al utilizar dióxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria causa inevitablemente la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) que oxidan cualquier macromolécula a su alcance (DNA, lípidos y proteínas). La investigación de los mecanismos de oxidación de proteínas se ha intensificado en los últimos 20 años debido a la creciente evidencia que ha correlacionado procesos como el envejecimiento y diversas patologías humanas con el aumento de la oxidación proteica. Las proteínas sufren varios tipos de oxidación; una de ellas, la formación de grupos carbonilo, ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos. A pesar de que se desconocen los mecanismos que vinculan oxidación proteica y procesos como proteólisis, apoptosis y reproducción nos encontramos cerca de descubrir el papel de la oxidación proteica en la fisiología celular.

Palabras Clave: *Envejecimiento, Especies Reactivas de Oxígeno, estrés oxidativo, oxidación, proteólisis.*

ABSTRACT

Production of Reactive Oxygen Species (ROS) is an unavoidable consequence of the aerobic metabolism. Due to the accumulating experimental data relating protein oxidation to cell processes such as ageing and diverse human diseases, research in this area has been greatly increased. Proteins undergo different types of oxidative modifications, in particular, the formation of carbonyl groups, has been extensively used in the studies focused on the determination of the extent of protein damage. Despite the fact that the mechanisms linking protein oxidation and cellular processes such as proteolysis, apoptosis or reproduction have yet to be elucidated, we are close to understand the role of protein oxidation in cell physiology.

Key Words: *Ageing, Reactive Oxygen Species, oxidative stress, oxidation, proteolysis.*

INTRODUCCIÓN

DE LA APARICIÓN DEL DIOXÍGENO EN LA TIERRA AL ESTRÉS OXIDATIVO

En la atmósfera de la Tierra primitiva prevalecía un ambiente reductor en el que surgieron las primeras manifestaciones de vida hace 3.5 millones de años. La vida entonces era por consecuencia anaeróbica, tal vez similar a los microorganismos anaerobios de nuestros días. Probablemente la vida hubiera estado confinada a organismos microscópicos marinos si las condiciones atmosféricas no hubieran sufrido un cambio radical: la aparición de dióxígeno (O₂) hace

aproximadamente 2.5 millones de años. Existe evidencia geológica que sustenta la hipótesis de que la evolución de la fotosíntesis en las algas verde-azules o cianobacterias tuvo como consecuencia la acumulación progresiva de O₂. Las grandes cantidades formadas de este gas permitieron la formación de ozono (O₃) en la estratósfera, el cual creó un filtro de radiación ultravioleta (UV) solar. Este hecho podría haber beneficiado el desarrollo de vida en la Tierra, no sólo en las masas de agua terrestres. Sin embargo, para la vida anaeróbica existente, el dióxígeno pudo haber representado un agente tóxico, dado que muy probablemente los organismos presentes no contaban con mecanismos antioxidantes que los protegieran. Muchos organismos anaerobios debieron haber muerto en el camino de

Nota: Artículo recibido el 16 de mayo de 2006 y aceptado el 20 de junio de 2006.

la evolución hacia la aerobiosis; otros, se confinaron a nichos anóxicos y son tal vez los antecesores de la vida anaeróbica que hoy conocemos; aún otros, llegaron a desarrollar sistemas, no sólo de protección contra el dióxígeno, sino también mecanismos que aprovecharan su diferencia de potencial redox para obtención de energía¹.

La ventaja que presenta el dióxígeno para la obtención de energía por medio de cadenas de transporte de electrones lleva a olvidar su toxicidad. El dióxígeno es un diradical pues tiene dos electrones no apareados pero de *spin* o giro paralelo por lo cual no es *per se* altamente reactivo. No obstante, existen otras formas más reactivas de oxígeno conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs): el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido (O_2^-), el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) como se muestra en la Figura 1.

La naturaleza inespecífica de algunas de las proteínas con actividad redox en la cadena respiratoria provoca la transferencia de electrones a cualquier aceptor con mayor potencial como el dióxígeno, cuya molécula es lo suficientemente pequeña y se introduce en el sitio activo de estas proteínas generando el anión radical superóxido y peróxido de hidrógeno por medio de reducciones secuenciales univalentes². Estas especies en realidad son poco reactivas y su toxicidad radica en que a partir de ellas se generan especies mucho más reactivas como el radical hidroxilo (HO^\cdot) y oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$). Cuando el H_2O_2 se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre aceptando un electrón no apareado se produce el HO^\cdot por medio de la reacción de Fenton. Por otra parte, el $^1\text{O}_2$ se genera por la excitación del dióxígeno, la dismutación espontánea de O_2^- y la descomposición de H_2O_2 (ver Figura 1). El $^1\text{O}_2$ y el HO^\cdot reaccionan

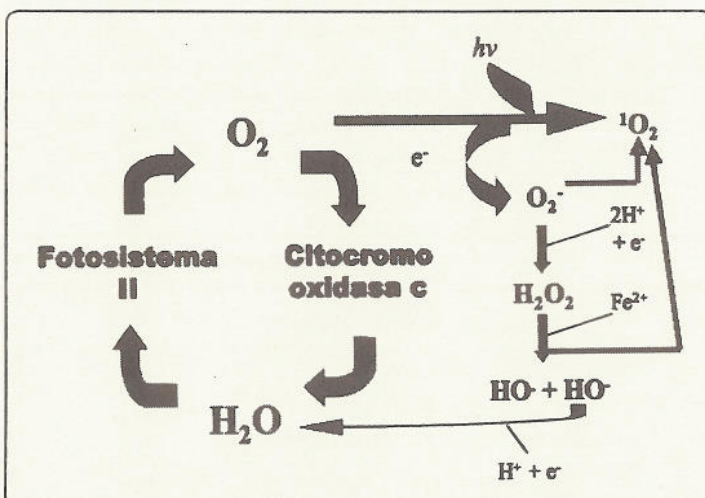


Figura 1. La fotosíntesis y la respiración aeróbica forman un ciclo continuo de oxidación del agua y reducción del dióxígeno que provoca que éste último se acumule en la atmósfera. Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) producidas en el metabolismo aeróbico son el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot)³.

rápido con DNA, proteínas y lípidos produciendo daños y cambios estructurales en las células que muchas veces son irreversibles. El desbalance entre la producción y la eliminación de EROs intracelularmente, a favor de su producción, se denomina estrés oxidativo^{3,4}.

Aunque la investigación sobre la oxidación de biomoléculas se ha centrado en DNA y lípidos, a lo largo de los últimos 20 años, diversos estudios han demostrado la importancia de la oxidación de proteínas en procesos celulares como el envejecimiento y ciertas patologías, lo cual ha fomentado los estudios en el área. Posiblemente la complejidad del estudio de proteínas como blancos de oxidación haya representado un gran reto experimental. Esta revisión se enfoca en desglosar algunos de los aspectos más relevantes y de los cuales tenemos mayor información con respecto a la oxidación proteica.

CAUSAS DE LA OXIDACIÓN PROTEICA

En general, cualquier factor que ocasione estrés oxidativo puede causar oxidación proteica, por ejemplo, la disminución en la eficiencia de los sistemas antioxidantes de defensa, el aumento en la producción de EROs, una disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas⁵⁻⁹.

La concentración intracelular de hierro también determina la producción de EROs y la carbonilación de proteínas^{10,11}. En levaduras, se ha demostrado que una mutante afectada en la síntesis de la proteína que almacena hierro, YFH1p, aumenta la carbonilación, probablemente porque aumentan también los niveles de hierro libre y la producción consecuente de EROs¹².

Los aumentos en la producción de EROs son característicos de células fisiológicamente viejas. Por ejemplo, se ha demostrado que la efectividad de la cadena respiratoria en mitocondrias de levadura depende de la edad de la célula, pues al envejecer disminuye la actividad de la ATP sintasa y aumenta la producción de superóxido¹³. Este aumento en la producción de EROs se lleva a cabo por un estancamiento en el flujo de electrones, lo que aumenta la probabilidad de reducir parcialmente la molécula de dióxígeno.

La actividad del proteosoma también disminuye en células viejas, en diversos tejidos humanos, en cultivos primarios y en bacterias, lo cual produce la acumulación de proteínas dañadas por diversos estreses que tienden a desnaturalizarse y agregarse en complejos hidrofóbicos cuya proteólisis es más difícil y con frecuencia requiere de proteínas accesorias que desagreguen dichos complejos¹⁴⁻¹⁶.

Adicionalmente, la oxidación de proteínas ocurre cuando aumenta la producción de sustratos más susceptibles. La

susceptibilidad en este caso se debe al mal plegamiento de las proteínas o a la producción de péptidos incompletos por errores en la traducción, ya sea por el uso de antibióticos que interfieren con la traducción o bien por mutaciones que afectan la capacidad de los ribosomas de corregir errores. Esta oxidación es poco específica, comparada con la encontrada en células viejas pues cualquier sustrato no plegado o cuya síntesis fue abortada es un posible blanco de oxidación^{5,17}.

QUÍMICA DE LA OXIDACIÓN PROTEICA

La oxidación es la cesión o pérdida de electrones de los átomos de un elemento. A nivel molecular, la pérdida de electrones conlleva el cambio en el grado de oxidación de un grupo químico ya sea por reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidativo.

Varias especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar potencialmente con cualquier molécula dentro de la célula, ya sea ácido nucleico, lípido o proteína, y oxidarla. Cada ERO presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo a su reactividad. El daño oxidativo a DNA y lípidos ha sido extensamente descrito con anterioridad¹⁸⁻²¹, por lo que en esta revisión nos enfocaremos al daño oxidativo en proteínas.

El estudio de la oxidación de proteínas mediada por radicales libres comenzó a principios del siglo XX, en 1906²², con los reportes de Dakin sobre la oxidación de aminoácidos en sistemas de Fenton y con Hopkins, quien describió el papel del glutatión como un anti y prooxidante, dependiendo de la ausencia o presencia de metales de transición²³. A pesar de la creciente evidencia sobre el papel de la oxidación de proteínas en varios sistemas biológicos, el estudio de este tópico fue desplazado durante muchos años por el de oxidación en lípidos y DNA. Posiblemente, las diferencias en las consecuencias fisiológicas que a nivel celular representa la oxidación de una única molécula de DNA *versus* la que representa la oxidación de proteínas, de las que normalmente existe más de una copia y además, son resintetizables, así como la complejidad de las proteínas como blancos, de los productos y de los mecanismos de oxidación

podieron ser algunas de las causas de la poca atención que la oxidación proteica tuvo durante años.

Las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Dependiendo de la ERO a la que se expongan las proteínas la oxidación puede ser específica (como en el caso de oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o con hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (como ocurre en la oxidación por radiación en la que se produce oxígeno en singulete).

La oxidación de proteínas también puede ser clasificada en reversible o irreversible como se resume en la Tabla I. La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox, como en el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación.

La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con EROs, algunos de los cuales son radicales libres generados por radiación ionizante y por oxidación catalizada por un metal (OCM).

La radiación ionizante produce la radiólisis del agua lo cual forma radicales hidroxilo que al reaccionar con los hidrógenos de los carbonos α de la estructura central de las proteínas, generan radicales en carbonos relativamente estables (por deslocalización con los electrones en las funciones amida adyacentes). En presencia de oxígeno se genera el radical peroxilo el cual probablemente reaccione por medio de una eliminación que produce HO_2 y una imina que subsecuentemente se hidroliza y produce la ruptura del enlace peptídico. Alternativamente, el radical en carbono podría obtener un átomo de hidrógeno de

Modificación por oxidación	Tipo	Consecuencia y/o función
Carbonilación	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Nitración	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Formación de enlaces proteína-proteína	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Ruptura de enlaces peptídicos	Irreversible	Degradación o agregación de proteínas
Glutathionilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica
S-nitrosilación	Reversible	Protección de cisteínas o regulación de función proteica

Tabla I. Posibles consecuencias del estrés oxidativo en la función proteica. La producción de EROs puede causar modificaciones químicas en proteínas. Dichas modificaciones, si son irreversibles, están normalmente asociadas con la pérdida permanente de la función y puede producir eliminación o acumulación de las proteínas dañadas. Las modificaciones reversibles normalmente se dan en cisteínas y pueden activar una función proteica o proteger al residuo de la oxidación.

algún grupo cercano, para generar un hidroperóxido que se descompondría en un radical alcoxilo y finalmente produciría también la ruptura del enlace peptídico²⁴⁻²⁶. En ausencia de oxígeno, un radical en carbono puede reaccionar con otro igual para formar derivados proteína-proteína.

La oxidación catalizada por un metal (OCM) se produce por reacción del H_2O_2 con un metal de transición (Fe^{2+}/Fe^{3+}) produciendo el radical hidroxilo ($HO\cdot$) (Reacción de Fenton) el cual, a su vez, reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión a metal de la proteína. La localización de la reacción de oxidación proteica se debe a la alta reactividad del radical hidroxilo, el cual no se difunde fuera del sitio donde se genera, sino que reacciona inmediatamente con los residuos cercanos²⁷.

Existen modificaciones extensas en cadenas laterales de las proteínas, producto de la oxidación, entre ellas se encuentra la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), oxidación de residuos de histidina a oxo-histidina y otros productos de degradación²⁸, de fenilalanina a orto y meta-tirosina²⁹, la conversión de metionina a metioninsulfóxido³⁰ o la degradación oxidativa de triptofano a quinureninas³¹.

BLANCOS DE OXIDACIÓN

En general, el grado de daño oxidativo de un blanco específico depende de varios factores: la concentración del blanco, la constante de reacción del oxidante con el blanco, la localización del blanco con respecto al lugar de generación del oxidante, eventos oxidantes secundarios (reacciones en cadena), reacciones antioxidantes y reacciones de reparación. Con base en estas consideraciones de naturaleza meramente cinética, se han diseñado sistemas computacionales que predicen el grado de daño de diferentes macromoléculas³². Sin embargo, dentro de una célula, parecen ser muchas más las consideraciones a tomar en cuenta para predecir el grado de daño de una macromolécula dada, pues, a la fecha, los datos de modelaje computacional no son consistentes con la evidencia experimental.

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis³³. Aunque se ha demostrado que individualmente algunos aminoácidos son más susceptibles a oxidarse que otros, una proteína, dependiendo de su conformación tridimensional, puede exponer o no esos aminoácidos a la oxidación.

La carbonilación ocurre principalmente en los residuos prolina, arginina y lisina, pues son los residuos más susceptibles a OCM³⁴. Los productos de la carbonilación de estos residuos son el

semialdehído glutámico (producto de la oxidación de arginina y prolina) y semialdehído aminoalifático (producto de la oxidación de lisina, ver primera parte de la figura dos para la formación de ambos semialdehídos).

La oxidación por generación de grupos carbonilo se lleva a cabo químicamente por cuatro rutas principales. La primera es la oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con EROs; los productos de la oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α -aminoalifático a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. Recientemente se demostró que los productos carbonilados, que cuantitativamente representan la mayor parte de una medición de carbonilación, son el semialdehído glutámico y en menor grado, el semialdehído aminoalifático³¹.

La segunda ruta de formación de grupos carbonilo involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado α -cetoacilo.

Las dos rutas de oxidación restantes implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilo reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con EROs; por ejemplo, por reacción de Michael del grupo amino de lisina, la entidad imidazol de histidina o el grupo sulfidril de cisteína con malondialdehído 4-hidroxi-2-nonenal y 2-propenal (ambos productos de la peroxidación lipídica) y por reacción de cetoaminas, cetoaldehídos y deoxiosonas, que son productos de la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación, con el grupo amino de residuos de lisina (glicación y glicoxidación, respectivamente)³⁵.

Aunque en principio, cualquier proteína puede ser oxidada por carbonilación, los análisis de diversos organismos han demostrado que existe un patrón específico hacia la oxidación por carbonilación en organismos filogenéticamente no relacionados. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, se identificó que el proteoma no se carbonila por igual, y que los blancos específicos no dependen de la cantidad de cierta proteína en un momento dado en el citoplasma. Las proteínas DnaK y GroEL (chaperonas de la familia de las Hsp70 y Hsp60, respectivamente), la proteína tipo histona H-NS, los factores de elongación EF-Tu y EF-G, glutamino sintetasa, glutamato sintasa, aconitasa, malato deshidrogenasa y piruvato cinasa son los blancos de oxidación preferenciales en *E. coli*^{6,36} y homólogos de estas proteínas también han sido identificadas como blancos específicos en plantas³⁷ y en cerebros de pacientes con Alzheimer³⁸.

A la fecha no existe un patrón claro que indique las características estructurales que debe tener una proteína para carbonilarse

preferencialmente. Anteriormente se creía que las proteínas que unen metales de transición, al ser más sensibles a OCM, deberían ser las más susceptibles a carbonilación. Sin embargo, pocas proteínas identificadas como las más carboniladas unen metales de transición, probablemente porque la coordinación a metales es diferente en cada proteína, lo cual cambia el potencial redox del metal de transición.

SISTEMAS DE REPARACIÓN CELULAR DE PROTEÍNAS OXIDADAS

La oxidación es, en la mayoría de los casos, una modificación no reversible a nivel celular por lo que una proteína oxidada puede perder su función, en especial si las oxidaciones tomaron lugar en aminoácidos directamente involucrados con el correcto plegamiento tridimensional del péptido, o bien, si tienen papeles en las interacciones proteína-sustrato-producto, en el caso de enzimas. La pérdida de la función ya sea estructural o enzimática tiene como consecuencia un desequilibrio en el metabolismo celular. Con frecuencia, la única manera de reparar la oxidación de proteínas es la proteólisis de los sustratos oxidados y la síntesis *de novo* de dichas proteínas. Sin embargo, no han sido descritos los procesos fisiológicos que involucran la degradación de aminoácidos provenientes de proteínas oxidadas; tal vez sean degradados como aminoácidos no oxidados, o bien dichos sistemas podrían no existir, por lo que la generación *de novo* implica el uso de aminoácidos recién adquiridos del medio o sintetizados.

De las diversas formas de oxidación proteica posibles, sólo existen mecanismos de reparación para cisteínas oxidadas que han formado puentes disulfuro y para metioninas oxidadas que han formado sulfóxidos.

Aunque la formación de puentes disulfuro implica un proceso oxidativo, a nivel celular existen diversos ejemplos de cambio de conformación y función de proteínas de acuerdo al estado redox de sus cisteínas, por ejemplo, la proteína OxyR, que sensa los niveles intracelulares de H_2O_2 y actúa como un factor transcripcional en presencia de esta ERO. En este caso, la oxidación de un par de aminoácidos implica una activación de la función y no una pérdida total de la misma. La formación de puentes disulfuro parece ser la única oxidación proteica con finalidad funcional.

El ambiente redox citoplasmático es fuertemente reductor, por lo cual bajo condiciones sin estrés, no se encuentran proteínas con rastros de oxidación, como los puentes disulfuro. El aumento de los niveles de puentes disulfuro en las proteínas, ocasionado por estrés oxidativo se ha referido como estrés disulfuro, el cual es reversible por la acción de dos sistemas de reducción dependientes de NADPH: el sistema tioredoxina (tioredoxina reductasa y tioredoxina) y el sistema glutaredoxina (glutatión reductasa, glutatión y tres glutaredoxinas). Estos sistemas están conservados tanto en procariotes como en eucariotes^{39,40}.

La segunda oxidación reversible es la oxidación de metioninas que es reparada por la enzima metionin sulfóxido reductasa. La producción de sulfóxidos genera dos estereoisómeros. La estereoespecificidad de la metionin sulfóxido reductasa, hace que no todos los metioninsulfóxidos generados sean reparables por la misma enzima. Existen dos isoformas de la enzima: MsrA y MsrB, la primera reduce el isómero R-(L-) y la segunda el S-(D-). Ambas isoformas se encuentran altamente conservadas en todos los organismos⁴¹⁻⁴³.

El porcentaje de producción de los dos estereoisómeros es variable y depende del oxidante y del sitio que ocupe la metionina dentro de la estructura proteica^{44,45}. Existen reportes que sugieren que dentro de una estructura proteica, las metioninas alrededor del sitio catalítico podrían ser preferencialmente oxidadas para evitar el paso de EROs al centro catalítico y así, la pérdida de la actividad⁴⁶.

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MEDIR LA CARBONILACIÓN

La oxidación de proteínas provocada por daño directo en lisinas, argininas, prolinas o treoninas, puede generar derivados carbonilos como aldehídos y cetonas²⁴. La carbonilación de proteínas es una oxidación más severa que la generación de metionin sulfóxidos y derivados de cisteína por lo que indican un estrés oxidativo más severo y representan un marcador de oxidación proteica estable.

Aunque la carbonilación es un indicador de oxidación no específico, analíticamente ha resultado más factible y reproducible la medición del grado de carbonilación que el de otros tipos de oxidación proteica como la conversión de tirosina a 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina o ditirosina. En general, otros marcadores de oxidación proteica ocurren con una frecuencia menor en varios órdenes de magnitud, comparados a la carbonilación; por lo que se requiere de métodos mucho más sensibles y con frecuencia más costosos^{47,48}.

Los grupos carbonilo han sido detectados y cuantificados por conjugación con 2,4-dinitrofenilhidrazina, fluoresceín hidrazida o tiosemicarbazida, fluoresceinamina o bien, midiendo la incorporación de tritio después de la reducción con borohidruro tritiado. La medición por conjugación de las entidades carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina se realiza tanto espectrofotométricamente como por ensayos inmunoquímicos (ver Figura 2).

La inmunodetección hace uso de anticuerpos contra el grupo dinitrofenilo y puede llevarse a cabo tanto por la técnica de *Western Blot*, separando las proteínas en una o dos dimensiones, como por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

CONSECUENCIAS METABÓLICAS DE LA OXIDACIÓN

A) LA OXIDACIÓN PROTEICA Y LAS CHAPERONAS MOLECULARES
La oxidación proteica es una condición de estrés celular que

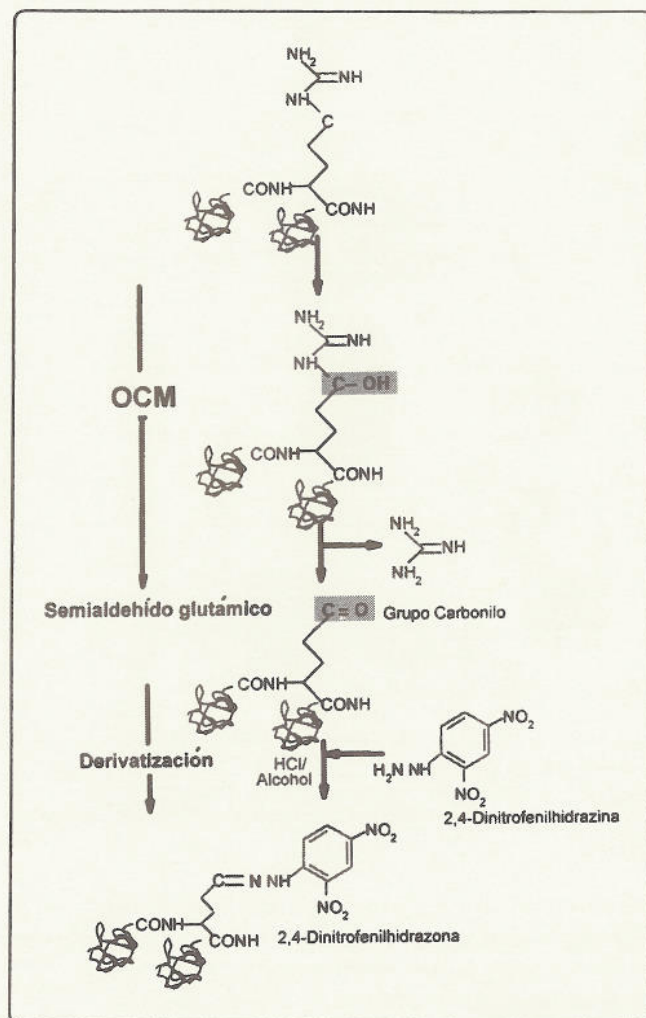


Figura 2. Carbonilación y derivatización. Formación de un semialdehído glutámico a partir de un residuo de arginina como consecuencia de OCM. Para detectar el grupo carbonilo formado se derivatiza con 2,4-dinitrofenilhidrazina. El grupo resultante, 2,4-dinitrofenilhidrazona puede ser detectado con anticuerpos monoclonales o policlonales (Modificado de Nyström³⁴).

ocasiona la inducción de las proteínas de un regulón específico de choque calórico o *Heat Shock Proteins* (Hsp). Aunque originalmente estas proteínas fueron descritas como de respuesta a choque calórico y muchos estudios describiendo su regulación genética han sido publicados, existe evidencia creciente de que éste no es el único estrés al que están vinculadas, pues se ha demostrado que también protegen durante estrés oxidativo, como se observa en la Figura 3⁴⁹⁻⁵¹. El mecanismo molecular de inducción de la síntesis de Hsp por estrés oxidativo es aún desconocido.

Nyström y colaboradores han reportado que la carbonilación de los blancos específicos del proteoma aumenta en cultivos en fase estacionaria tardía de *Escherichia coli* debido a la disminución en la eficiencia y fidelidad de la traducción, lo cual

produce una acumulación de sustratos que no se pliegan correctamente o que son abortados en el proceso^{5,6,17}. Recientemente se demostró que el mal plegamiento de las proteínas no es suficiente para inducir la síntesis de las Hsp, sino que requiere de la carbonilación de dichos sustratos, lo que sugiere que la oxidación proteica podría ser una marca o etiqueta de reconocimiento para las Hsp, no sólo los parches de aminoácidos hidrofóbicos que se exponen al desnaturalizarse las proteínas. La carbonilación preferencial de las chaperonas DnaK y GroEL a lo largo del crecimiento exponencial podría sugerir que participan en la protección de proteínas parcialmente oxidadas o con aminoácidos carbonilados como es el caso de la enzima etanol oxidoreductasa (AdhE) en *Escherichia coli*. DnaK parece sufrir una oxidación acumulativa que la desactiva y parece potenciar la inducción del regulón de Heat Shock en fase estacionaria⁵². Recientemente, nuestro grupo de investigación aportó evidencia que apoya esta hipótesis⁵¹.

El hecho de que las Hsp70 de organismos no relacionados hayan conservado la sensibilidad ante el estrés oxidativo, podría ser un indicador del papel de estas proteínas como sensores de oxidación.

B) OXIDACIÓN Y PROTEÓLISIS

Se ha demostrado que las proteínas oxidadas son mejores sustratos para los sistemas proteolíticos celulares tanto en procariontes como en eucariotes. Por ejemplo, la glutamino sintetasa carbonilada es degradada más rápido que la misma enzima no oxidadada, tanto por extractos crudos de *E. coli* como por purificaciones de proteinasas alcalinas tanto de *E. coli* como de hígado de rata^{53,54}. *E. coli* posee proteinasas específicas, dependientes de ATP, que degradan sustratos oxidados^{55,56}.

En general, se ha encontrado que las proteínas de diversos organismos (*E. coli*, eritrocitos y mitocondrias de hígado y corazón de rata) son más susceptibles a la degradación por proteasas si son expuestas previamente a sistemas de generación de EROs⁵⁷⁻⁵⁹.

En eucariotes, muchas proteínas intracelulares son degradadas por el complejo proteinasa multicatalítico o proteosoma. Se ha encontrado evidencia de que la oxidación proteica aumenta la ubiquitinación (el proceso de "etiquetado" para procesos proteolíticos en eucariotes) y esto a su vez, la proteólisis. Sin embargo, este mecanismo parece estar limitado a ciertos niveles de oxidación, pues el daño oxidativo severo causa una disminución en la capacidad proteolítica de la célula^{60,61}.

Lo anterior sugiere que la oxidación de proteínas podría ser un tipo de marcaje de proteínas que deben ser recicladas por los sistemas de proteólisis de la célula, es decir, un antecedente en procariontes a lo que es la ubiquitinación en eucariotes. Sin embargo, en eucariotes no es claro el papel de la oxidación en el reciclaje de proteínas; no se sabe si estos dos sistemas de

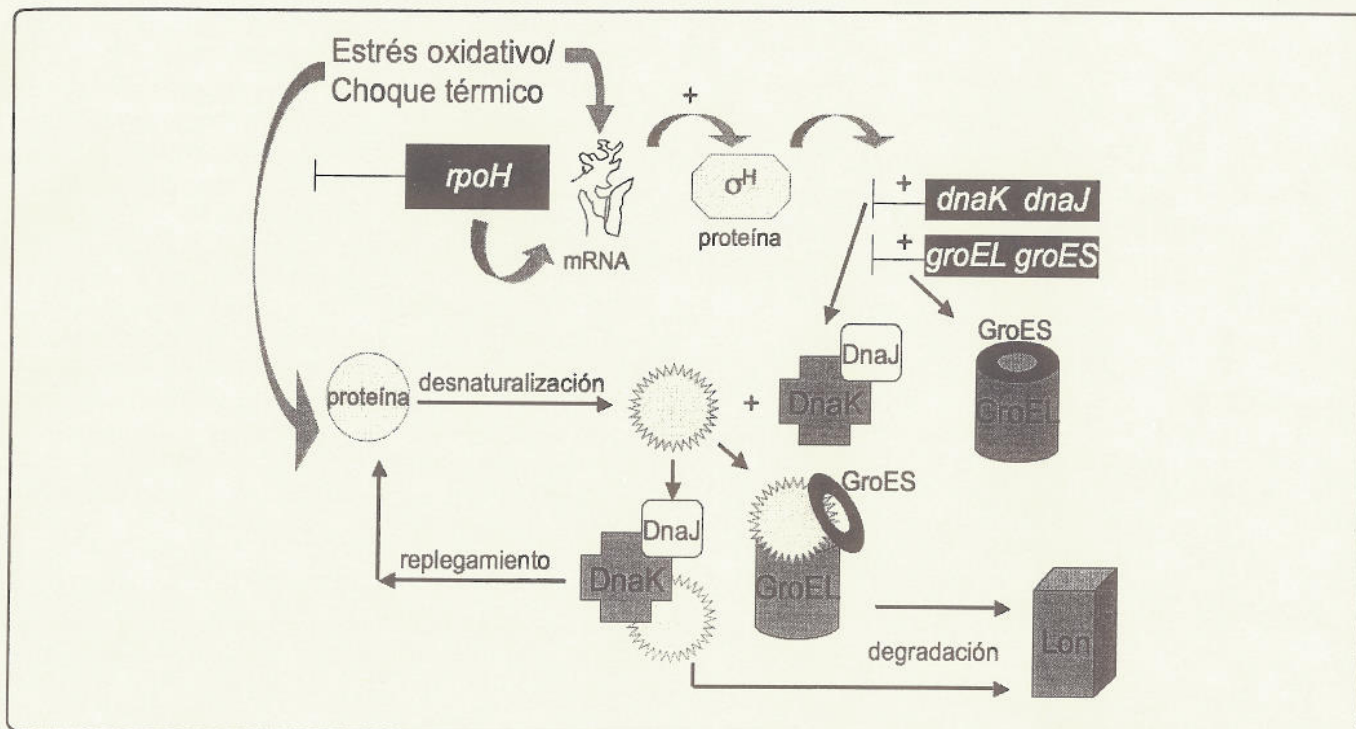


Figura 3. En *E. coli*, tanto el estrés oxidativo como el choque calórico aumentan la traducción del mRNA del gen *rpoH* que codifica para el factor sigma H. Al aumentar la síntesis de sigma H se transcriben genes del regulón de choque térmico como las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES, las cuales identifican proteínas desnaturalizadas y oxidadas tratando de repararlas, si esto no es posible las canaliza a los sistemas proteolíticos de la célula como la proteína Lon.

marcaje de proteínas que deben ser degradadas actúan en conjunto o independientemente, aunque existe evidencia de que una proteína carbonilada de *E. coli* es reconocida y degradada *in vitro* por el proteosoma de células de mamífero sin necesidad de ser ubiquitinada, por lo que la oxidación *per se* parece ser suficiente para que una proteína sea degradada^{62,63}.

La carbonilación, no obstante, pareciera ser una señal de degradación de proteínas sólo hasta cierto grado de oxidación. Se ha demostrado en la mitocondria eucariote que la proteína aconitasa es degradada sólo si está poco carbonilada, pues la carbonilación exhaustiva provoca que se formen agregados de alto peso molecular que son resistentes a la degradación por la proteasa mitocondrial Lon (homólogo de la proteasa Lon de *E. coli*)⁶⁴. Incluso, los agregados de alto peso molecular bloquean la actividad del proteosoma^{65,66}.

C) ENVEJECIMIENTO Y CARBONILACIÓN

Aunque no está claro si el aumento de la carbonilación es causa o consecuencia del envejecimiento celular, se ha identificado que la oxidación de proteínas (medida por carbonilación) correlaciona con la edad fisiológica de las células en diversos sistemas biológicos.

Los primeros estudios que relacionaron este fenómeno utilizaron eritrocitos y fibroblastos humanos y ratas de diferentes edades.

En fibroblastos, se demostró que el grado de carbonilación de muestras provenientes de pacientes pediátricos con progeria o Síndrome de Werner (envejecimiento temprano) era equiparable al de pacientes sanos de la tercera edad⁶⁷.

Recientemente, en cultivos senescentes (fase estacionaria tardía) de *E. coli*, Nyström y colaboradores, demostraron que las células podían ser clasificadas en dos tipos: no viables o no cultivables y viables o cultivables. Las células no viables mostraron una mayor carbonilación que las viables, lo cual pareciera describir un mecanismo de protección de la posible descendencia si las células tuvieran la oportunidad de dividirse nuevamente, donde se evita que las células que poseen muchas proteínas carboniladas y probablemente no funcionales o aberrantes sean incapaces de dividirse, evitando que pasen a las nuevas células proteínas carboniladas⁶⁸. Por otro lado, en cultivos en citocinesis de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el mismo grupo de investigación, describió que sí existe en células en división un mecanismo preferencial en donde, durante la gemación, la división es asimétrica pues las células nuevas no reciben proteínas carboniladas, detectables por los métodos utilizados, permaneciendo éstas en la célula más vieja⁶⁹. Este mecanismo parece estar vinculado a una selección por el citoesqueleto, específicamente por medio de la proteína Sir2p, que podría tener un papel en la organización de los filamentos de actina durante la citoquinesis. Todavía no se conoce el mecanismo a detalle

pero mutantes en *sir2* no dividen asimétricamente las proteínas oxidadas en la gemación. Además, se ha descrito que los homólogos de Sir2p son determinantes del envejecimiento en gusanos y moscas⁶⁹⁻⁷³.

Un argumento que apoya la correlación entre envejecimiento y carbonilación es el hecho de que sólo en células que senescen se observa esta acumulación de oxidación en proteínas. En plantas, por ejemplo, donde no existe el concepto de envejecimiento no hay acumulación progresiva e irreversible de proteínas oxidadas. Se ha observado que en *Arabidopsis thaliana*, la carbonilación aumenta paulatinamente, pero baja drásticamente justo antes de la transición de la planta del estado vegetativo al reproductivo³⁷. Lo anterior parece describir un mecanismo adicional de protección de las nuevas células en contra de la oxidación.

Las diferencias observadas entre plantas y animales parecen indicar que la capacidad de dividirse está intrínsecamente relacionada con el nivel de oxidación proteico. Parecen existir mecanismos que bloquean la división en células viejas que han acumulado demasiadas proteínas dañadas y otros mecanismos que aseguran que las proteínas oxidadas permanezcan en las células madre, siendo el objetivo final de cada mecanismo "heredar" proteínas no carboniladas a las células nuevas.

D) ENFERMEDADES EN HUMANOS Y CARBONILACIÓN

Durante las últimas décadas, se ha correlacionado positivamente el aumento de proteínas carboniladas con ciertas patologías.

i. Enfermedades inflamatorias. La respuesta inmunológica innata incluye la activación de neutrófilos y macrófagos que generan EROs. La intención primaria de la producción localizada de estrés oxidativo puede ser el daño exhaustivo hacia las proteínas de agentes infecciosos invasores como bacterias y parásitos. Sin embargo, la inflamación crónica aumenta la difusión de las EROs producidas y el daño al tejido circundante, produciendo estrés oxidativo en el propio hospedero y una respuesta autoinmune⁷⁴.

ii. Diabetes. La diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre y en etapas tardías excreción de glucosa en orina, debida a daño renal. Se han detectado altos niveles de proteínas carboniladas localizados con productos de glicoxidación y lipoxidación. El alto nivel de carbonilación de proteínas de plasma es característico de todos los pacientes diabéticos, independientemente de su edad y el avance y complicaciones de la enfermedad^{75,76}.

iii. Daño renal crónico. En pacientes con daño renal la generación de EROs aumenta en cada sesión de diálisis debido a una deficiencia crónica de los principales sistemas antioxidantes. En estos pacientes se encuentra un aumento en la oxidación de proteínas en plasma, principalmente albúmina (carbonilación y

formación de puentes disulfuro). Como consecuencia, los pacientes están expuestos a otras complicaciones como daño tisular y enfermedades cardíacas^{77,78}.

iv. Enfermedad de Alzheimer. Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo que afecta principalmente las regiones cerebrales involucradas con el aprendizaje y la memoria. Estas regiones se reducen significativamente debido a la degeneración de sinápsis y a la muerte neuronal. El estrés oxidativo juega un papel importante, pues el nivel de proteínas y lípidos oxidados, así como la producción de EROs aumentan en las zonas afectadas. En la corteza cerebral y el hipocampo de pacientes con Alzheimer, las principales características son la presencia de nudos o agregados intracelulares neurofibrilares de la proteína asociada a microtúbulos, Tau, la cual está hiperfosforilada y carbonilada; también se encuentran placas o depósitos extracelulares de péptidos precursores de β -amiloide debido a que el procesamiento proteolítico disminuye, probablemente porque el sustrato esté carbonilado⁷⁹.

Por otro lado, se han detectado blancos de carbonilación que pueden ser importantes en determinar el mecanismo y la relación entre el daño oxidativo y la muerte neuronal. Los blancos identificados son glutamino sintasa, hidrolasa L-1 ubiquitina C-terminal, proteína 2 relacionada a dihidropirimidinas y α -enolasa. Con base en estos blancos, los mecanismos de muerte neuronal pueden ser la disminución de energía, inhibición de la degradación por el proteosoma y acortamiento de la longitud dendrítica con la consecuente disminución de la comunicación interneuronal^{80,81}.

v. Cataractogénesis. Existe un aumento dependiente de la edad del paciente en la carbonilación de las proteínas de la retina humana, lo cual predetermina la aparición de cataratas. Esta evidencia ha sido apoyada por los cambios físicos observados en el cristalino de vacas expuestas *in vitro* a sistemas de OCM, que asemejan a los ocurridos en muestras de ojos con cataratas^{34,82}.

CONCLUSIONES

A pesar del avance que en poco tiempo se ha tenido en el entendimiento de la oxidación proteica, todavía quedan muchas preguntas abiertas. Químicamente la causa de la oxidación de proteínas es todavía ambigua, pues aunque los mecanismos de oxidación de ciertos grupos pueden ser predecidos, existen limitantes experimentales para determinarlos. Incluso el probar un mecanismo preferencial de oxidación para una proteína no proporcionaría reglas generales, pues el ambiente químico de cada sustrato es diferente dependiendo de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de cada proteína, y aún más si existen cofactores metálicos coordinados. Todos estos factores que hacen a una proteína única para su función tienen como consecuencia que un mismo grupo químico presente un potencial redox diferente y, por lo tanto pueda o no participar de la oxidación por EROs.

La posibilidad de predecir blancos proteicos de oxidación en ciertas circunstancias, tal vez sería de más relevancia a nivel fisiológico. Sin embargo, con parámetros de la cinética clásica esto ha resultado poco representativo de lo que sucede *in vivo*. Todas estas variables ofrecen sin duda un campo interesante para la investigación de la química de la oxidación proteica.

El haber determinado que las chaperonas moleculares, ciertos factores de elongación y algunas enzimas del Ciclo de Krebs son invariablemente blancos de oxidación en diversos sistemas biológicos sugiere que la oxidación no es al azar ni obedece reglas cinéticas; en cambio podría actuar específicamente y limitar celularmente ciertos procesos como la síntesis de nuevas proteínas, y el metabolismo energético para evitar que se sigan acumulando electrones en enzimas con fugas que potencialmente pueden producir una mayor producción de EROs y por lo tanto más estrés oxidativo.

Las consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas es aún un tema de gran debate pues en la mayoría de los casos no puede definirse con precisión si la oxidación es causa o consecuencia. Lo que es claro es la correlación encontrada entre envejecimiento, la disminución en la capacidad de división celular o reproducción y ciertas patologías con el aumento de proteínas oxidadas.

Molecularmente, la posibilidad de que la oxidación sea un antecedente de la ubiquitinación para la degradación de proteínas representaría un mecanismo de marcaje no explorado y aún utilizado no sólo en bacterias sino posiblemente en eucariontes. No obstante, el reconocimiento de oxidación *per se* debe ser demostrado antes de proponer dicho mecanismo.

Otro aspecto importante que podría conllevar un mecanismo de preservación es el bloqueo de la viabilidad o capacidad reproductiva cuando el proteoma en general se encuentra oxidado. Posiblemente sea una forma de prevenir el "heredar" proteínas dañadas o una simple consecuencia del deterioro de la actividad metabólica general.

A nivel de diagnóstico clínico es de poca relevancia pues muchas enfermedades ocasionan la oxidación inespecífica de proteínas de plasma. A menos que se encontraran blancos específicos e invariables en fases tempranas de alguna enfermedad esta herramienta molecular podría ser utilizada en diagnosis.

Sin duda, la oxidación de proteínas representa un campo amplio de investigación dirigida a responder problemas concretos que tienen relevancia directa en la fisiología de todo ser vivo. La utilización de disparos de estrés oxidativo como señal de diferenciación celular pudiera ser sólo uno de los procesos programados en los que la célula utiliza la oxidación como marcaje. Finalmente, aunque las tendencias actuales indican que la oxidación de proteínas será estudiada con más énfasis desde

el punto de vista fisiológico, existen todavía varias incógnitas, como lo es si la oxidación es suficiente para provocar agregación proteica, que deben ser exploradas.

REFERENCIAS

- Halliwell, B. & Gutteridge, J. Free Radicals in Biology and Medicine (Oxford University Press, Nueva York, 1999).
- Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage. *Annu.Rev.Microbiol.* 57:395-418 (2003).
- Hansberg, W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* XXVI:19-54 (2002).
- Hansberg, W. La biología del dióxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2(2):47-55 (1999).
- Dukan, S., *et al.* Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:5746-5749 (2000).
- Dukan, S. & Nyström, T. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.* 12:3431-3441 (1998).
- Dukan, S. & Nyström, T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J.Biol.Chem.* 274:26027-26032 (1999).
- Ji, L.L., Dillon, D. & Wu, E.. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am.J.Physiol* 258:918-923 (1990).
- Nyström, T. Translational fidelity, protein oxidation and senescence: lessons from bacteria. *Aging Res. Rev.* 1:693-703 (2002).
- Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224 (1992).
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 899:191-208 (2000).
- Desmyter, L., *et al.* Expression of the human ferritin light chain in a budding yeast fraxatin mutant affects aging and cell death. *Exp.Gerontol.* 39:707-715 (2004).
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. & Nyström, T. Protein oxidation in G₀ cells of *Saccharomyces cerevisiae* depends on the state rather than the rate of respiration and is enhanced in *pos9* but not *yap1* mutants. *J.Biol.Chem.* 276:35396-35404 (2001).
- Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M. & Petropoulos, I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 908:143-154 (2000).
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T. & Davies, K.J.A. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 14:2495-2502 (2000).
- Shringarpure, R. & Davies, K.J. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Rad.Biol.Med.* 32:1084-1089 (2002).
- Ballesteros, M., Fredriksson, A. Henriksson, J. & Nyström, T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J.* 20:5280-5289 (2001).
- Sies, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat. Res.* 299:183-191 (1993).
- Sies, H. & Menck, C.F. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. Res.* 275:367-375 (1992).
- Humphries, K.M. & Sweda, L.I. Selective inactivation of a-

- ketoglutarate deshydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**:15835-15841 (1998).
21. Esterbauer, H., Schaur, R.J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11**:81-128 (1991).
 22. Dakin, H.D. The oxidation of aminoacids with the production of substances of biological importance. *J. Biol. Chem.* **1**:171-176 (1906).
 23. Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* **324**:1-18 (1997).
 24. Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**:20313-20316 (1997).
 25. Garrison, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem. Rev.* **87**:381-398 (1987).
 26. Davies, M.J. Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage. *Arch. Biochem. Biophys.* **336**:163-172 (1996).
 27. Stadtman, E.R. & Oliver, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**:2005-2008 (1991).
 28. Heinecke, J.W. Biochemical evidence for a link between elevated levels of homocysteine and lipid peroxidation *in vivo*. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2**:87-89 (1999).
 29. Lewisch, S.A. & Levine, R.L. Determination of 2-oxohistidine by aminoacid analysis. *Annal. Biochem.* **231**:440-446 (1995).
 30. Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L. & Stadtman, E.R. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* **107**:323-332 (1999).
 31. Requena, J.R., Levine, R.L. & Stadtman, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids* **25**:221-226 (2003).
 32. Davies, M.J.A. The oxidative environment and protein damage. *Biochem. Biophys. Acta* **1703**:93-109 (2005).
 33. Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.* **3**:3-8 (2000).
 34. Nyström, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**:1311-1317 (2005).
 35. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. Protein carbonylation in human diseases. *TRENDS in Molecular Medicine.* **9**:169-176 (2003).
 36. Tamarit, J., Cabiscol, E. & Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**:3027-3032 (1998).
 37. Johansson, E., Olsson, O. & Nyström, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**:22204-22208 (2004).
 38. Castegna, A., *et al.* Protein identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad. Biol. Med.* **33**:562-571 (2002).
 39. Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**:15661-15667 (1997).
 40. Aslund, F. & Beckwith, J. Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell.* **96**:751-753 (1999).
 41. Etienne, F., Spector, D., Brot, N. & Weissbach, H. A methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli* that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**:378-382 (2003).
 42. Spector, D., Etienne, F., Brot, N. & Weissbach, H. New membrane-associated and soluble peptide methionine sulfoxide reductases in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**:284-289 (2003).
 43. Picot, C.R., Perichon, M., Cintrat, J.C., Friguet, B. & Petropoulos, I. The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Lett.* **558**:74-78 (2004).
 44. Sharov, V.S. & Schoneich, C. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Rad. Biol. Med.* **29**:986-994 (1999).
 45. Sharov, V.S., Ferrington, T.C., Squier, C. & Schoneich, C. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* **455**:247-250 (1999).
 46. Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. & Stadtman, E. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:15036-15040 (1996).
 47. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* **32**:307-326 (2000).
 48. Beal, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. Biol. Med.* **32**:797-803 (2002).
 49. Echave, P. *et al.* DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:4626-4631 (2002).
 50. Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. & Jacob, U. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hps33. *Mol. Cell* **17**:381-392 (2005).
 51. Díaz-Acosta, A., Sandoval, M.L., Delgado-Olivares, L. & Membrillo-Hernández, J. Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **185**:429-438 (2006).
 52. Fredriksson, A., Ballesteros, M., Dukan, S. & Nyström, T. Induction of the heat shock regulon in response to increased mistranslation requires oxidative modification of the malformed proteins. *Mol. Micro.* **59**:350-359 (2005).
 53. Rivett, A.J. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J. Biol. Chem.* **260**:12600-12606 (1985).
 54. Rivett, A.J. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* **260**:300-305 (1985).
 55. Davies, K.J.A. & Lin, S.W. Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *Free Rad. Biol. Med.* **5**:215-223 (1988).
 56. Davies, K.J.A. & Lin, S.W. Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*. *Free Rad. Biol. Med.* **5**:225-236 (1988).
 57. Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* **262**:9895-9901 (1987).
 58. Pacifici, R.E., Salo, D.C. & Davies, K.J.A. Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radical Biol. & Med.* **7**:521-536 (1989).
 59. Marciat, O., Zhang, Y., Lin, S.W. & Davies, K.J.A. Mitochondria

- contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins *Biochem.J.* **254**:677-683 (1988).
60. Iwai, K., *et al.* Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **93**:15036-15040 (1988).
 61. Grune, T., Reinheckel, T. & Davies, K.J.A. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* **11**:526-534 (1997).
 62. Roseman, J.E. & Levine, R.L. Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase. *J.Biol.Chem.* **262**:2101-2110 (1987).
 63. Rivett, A.J. & Levine, R.L. Metal catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Arch.Biochem.Biophys.* **278**:26-34 (1990).
 64. Bota, D.A., Van Remmen, H. & Davies, K.J.A. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett.* **532**:103-106 (2002).
 65. Grune, T., Jung, T., Merker, K. & Davies, K.J.A. Decreased proteolysis caused by protein aggregates inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid and aggresomes during oxidative stress. Aging and disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36**:2519-2530 (2004).
 66. Grune, T., Merker, K., Sandig, G. & Davies, K.J.A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **305**:709-718 (2003).
 67. Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. & Stadtman, E.R. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *J.Biol.Chem.* **262**:5488-5491 (1987).
 68. Desnues, B., Gregori, G., Dunkan, S., Aguilaniu, H. & Nyström, T. Differential oxidative damage and expression of stress regulons in culturable and nonculturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep.* **4**:400-405 (2003).
 69. Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. & Nyström, T. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a Sir2p dependent mechanism. *Science* **299**:1751-1753 (2003).
 70. Guarente, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* **14**:1021-1026 (2000).
 71. Tissenbaum, H.A. & Guarente, L. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**:227-230 (2001).
 72. Sinclair, D.A. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech. Ageing Dev.* **123**:857-867 (2002).
 73. Rogina, B. & Helfand, S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **101**:15998-16003 (2004).
 74. Oliver, C.N. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch.Biochem.Biophys.* **253**:62-72 (1987).
 75. Cakatay, U., *et al.* Oxidative protein damage in type 1 diabetic patients with and without complications. *Endocr.Res.* **26**:365-379 (2000).
 76. Telci, A., *et al.* Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm.Metabol.Res.* **32**:40-43 (2000).
 77. Himmelfarb, J., *et al.* Plasma protein oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* **58**:2571-2578 (2000).
 78. Himmelfarb, J. & McMonagle, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* **60**:358-363 (2001).
 79. Mattson, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* **430**:631-639 (2004).
 80. Castegna, A., *et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad.Biol.Med.* **33**:562-571 (2002).
 81. Castegna, A., *et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J.Neurochem.* **82**:1524-1532 (2002).
 82. Bosnia, F., *et al.* Protein oxidation and lens opacity in humans. *Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.* **41**:2461-2465 (2000).

Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo

El daño provocado por las EROs es reparado a través de varios sistemas de defensa de la célula. Estos sistemas se dividen en mecanismos de destoxificación enzimática, moléculas antioxidantes encargadas de atrapar EROs, la regulación de la obtención del hierro y los procesos de reparación del daño producido. Además hay otros mecanismos que ayudan a mantener el estado redox intracelular (Fang, 2004).

Mediante la destoxificación enzimática, las EROs son convertidas a especies menos tóxicas. Algunas de las principales enzimas que intervienen en estos procesos son las catalasas, la superóxido dismutasa y las peroxidasas (Fang, 2004).

Algunas moléculas no enzimáticas ayudan a mantener un ambiente intracelular reducido al atrapar o consumir el O_2 . Estos antioxidantes son el NADPH y el NADH, el β -caroteno, el ácido ascórbico, el α -tocoferol y el glutatión (Halliwell, 2006; Fang, 2004).

El hierro al reaccionar con el H_2O_2 produce el $\cdot HO$, el cual es muy tóxico. En los microorganismos existen sistemas que regulan la obtención de hierro para almacenarlo. La regulación se lleva a cabo a dos niveles: 1) la obtención a través de receptores específicos en membrana. 2) Dentro de la célula dos proteínas, la bacterioferritina y la ferritina, muy similar a la ferritina de los eucariotes, funcionan como ferroxidasa. En bacterias y hongos el hierro se incorpora directamente como Fe^{2+} o como $Fe(III)$ unido a sideróforos y se almacena en la ferritina. En *E. coli* y otras bacterias la proteína Fur une hierro y reprime la síntesis de proteínas relacionadas con el metabolismo de hierro (Cabiscol *et al.*, 2000; Fang, 2004; Hansberg, 2002).

Además de los compuestos antioxidantes, en *E. coli* y otros microorganismos existe una respuesta genética por la presencia de EROs. El sistema de dos componentes SoxRS está involucrado en la respuesta contra el estrés oxidativo provocado por el $O_2^{\cdot-}$ y por el monóxido de nitrógeno (NO^{\cdot}), y la proteína OxyR responde a la presencia de H_2O_2 (González-Flecha y Demple, 2005).

- **El sistema de dos componentes SoxRS**

El sistema SoxRS se activa por la presencia del $O_2^{\cdot-}$. La activación de este sistema lleva a cabo la expresión de un conjunto de genes que codifican para proteínas, cuya función esta involucrada en la protección y/o destoxificación del $O_2^{\cdot-}$ (Walkup y Kogoma, 1989).

La proteína SoxR (17 kDa) es el sensor del sistema de dos componentes y posee un centro activo redox de $[2Fe-2S]^{1+}$ que se oxida a $[2Fe-2S]^{2+}$ en presencia de $O_2^{\cdot-}$. SoxR en su forma oxidada es el factor transcripcional de un único gen: *soxS*. El aumento de la proteína SoxS activa la transcripción del regulón en respuesta a estrés por $O_2^{\cdot-}$ el cual incluye genes como *sodA*, *nfo*, *zwf*, *fpr*, *ribA* y *nfsA* y genes del metabolismo central como *fumC* y *acnA* (Tabla 1) (Wu y Weiss, 1991; Storz y Zheng, 2000).

Tabla 1. Genes regulados por SoxS en presencia de superóxido en *E. coli* (Modificado de Demple, 1996)

Gene	Producto
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>zwf</i>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>acnA</i>	Aconitasa A
<i>tolU</i>	Proteína de membrana externa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>micF</i>	RNA antisentido del mRNA de <i>ompF</i>
<i>agn43</i>	Proteína de membrana externa
<i>acrAB</i>	Bomba de salida de diversas drogas
<i>nfsA</i>	Nitroreductasa A
<i>fpr</i>	Ferredoxin/flavodoxin reductasa
<i>fldbA</i>	Flavodoxina
<i>fldB</i>	Flavodoxina
<i>ribA</i>	GTP ciclohidrolasa

- **OxyR**

En estrés oxidativo causado por H₂O₂ se activa la proteína OxyR por medio de la oxidación de sus cisteínas (posiciones 199 y 208) que forman un puente disulfuro. OxyR activado transcribe genes involucrados en la defensa contra H₂O₂. El regulón de OxyR se enlista en a tabla 2 (Storz y Zheng, 2000).

Tabla 2. Genes regulados por la proteína OxyR en presencia de H₂O₂ en *E. coli*.

Gene	Producto
<i>katG</i>	Hidroperoxidasa I
<i>ahpCF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa
<i>fur</i>	Represor global de genes para la adquisición de Fe
<i>dps</i>	Proteína de unión no específica a ADN
<i>gorA</i>	Reductasa de glutatión
<i>grxA</i>	Glutaredoxina I
<i>fhuF</i>	Reductasa férrica
<i>oxyS</i>	RNA regulador pequeño

1.4. LA ALCOHOL DESHIDROGENASA (AdhE) DE *Escherichia coli*

1.4.1. AdhE

AdhE es una enzima fermentativa que cataliza la reducción de acetyl-CoA hasta etanol por medio de dos reacciones de reducción consecutivas y reversibles. La primera reacción la lleva a cabo el dominio acetaldehído deshidrogenasa y la segunda el de alcohol deshidrogenasa (Clark y Cronan, 1980). Ambos dominios están fusionados en AdhE, tal vez para evitar la liberación y difusión en el citosol del intermediario de la reacción, el acetaldehído.

AdhE pertenece al grupo III de deshidrogenasas con Fe^{2+} y presenta homología estructural con otras alcohol deshidrogenasas de microorganismos (Reid y Fewson, 1994).

AdhE posee una tercera actividad catalítica, pues desactiva a la piruvato formato liasa, la enzima que produce el sustrato para la función fermentativa de AdhE al convertir piruvato en acetyl-CoA (Kessler *et al.*, 1991 y Kessler *et al.*, 1992).

La transcripción del gen *adhE* se induce anaeróticamente aproximadamente 10 veces y se reprime tanto por oxígeno como por nitrato (Clark y Cronan, 1980). La cantidad de transcrito de *adhE* depende de la cantidad de NADH generado por el catabolismo de diferentes fuentes de carbono, por lo que la proporción de etanol producido en la mezcla de fermentación disminuye a medida que el estado de oxidación del sustrato, fuente de carbono y energía, aumenta (Leonardo *et al.*, 1993 y Leonardo *et al.*, 1996).

La activación transcripcional de *adhE* es independiente de ArcA y de Fnr. Se han identificado tres proteínas con actividad transcripcional involucradas en el

control de la expresión de *adhE*, pero ninguna es responsable de la activación por aumento de NADH. La primera proteína es NarL, que reprime la expresión de *adhE*, pero sólo en presencia de nitrato (Chen y Lin, 1991, Darwin y Stewart, 1996, Leonardo *et al.*, 1993). La segunda proteína es Cra (*catabolite represor activator*) que también reprime a *adhE*, pero este regulador es activo sólo cuando se une a los efectores fructosa-1-fosfato o fructosa-1,6-bifosfato (Mikulskis *et al.*, 1997 y Saier *et al.*, 1996). La tercera proteína es Fis (*factor for inversion stimulation*) la cual es requerida para la transcripción de *adhE*, pero no requiere ningún efector para su función, e incluso la expresión del gen *fis* es independiente del tipo de respiración (Finkel y Johnson, 1992, Membrillo-Hernández *et al.* 1999, Xu y Johnson, 1995). Datos recientes indican que el producto del gen *adhR*, en el minuto 73.4 del cromosoma de *Escherichia coli*, es el activador transcripcional de *adhE* dependiente de NADH (Clark, datos no publicados).

El mRNA de *adhE* también está sujeto a control traduccional, el cual depende de la RNasa III. Se ha observado que el mensajero de *adhE* forma una estructura secundaria que ocluye el sitio de unión a ribosoma. La RNasa III reconoce y rompe esta estructura, permitiendo la traducción del transcrito. Por otro lado, se conoce otro nivel de regulación postranscripcional mediado por la RNasa G (codificada por el gen *rng*), que degrada el mRNA de *adhE* (Wachi *et al.*, 2001, Kaga *et al.*, 2002).

Aún cuando AdhE aumenta especialmente en anaerobiosis (aproximadamente 10 veces más que en aerobiosis), la cantidad de la enzima en aerobiosis es alta también (30,000 copias/célula). AdhE forma estructuras en forma de hélice llamadas espirosomas (de aproximadamente 0.22 μm de largo) y contienen entre 40 y 60 moléculas (Kessler *et al.*, 1992). Estas estructuras también han sido detectadas en *Entamoeba histolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus reuteri* (Espinosa *et al.*, 2001, Matayoshi *et al.*, 1989, Yamato *et al.*, 1998, Nomura *et al.*, 1989).

Durante un cambio de anaerobiosis a aerobiosis, la transcripción del gen *adhE* disminuye aproximadamente 90%. No se le ha asignado una función clara a AdhE en aerobiosis, a pesar de constituir el 1% de la proteína total de la célula. Se sabe que en aerobiosis sus funciones catalíticas se desactivan por oxidación, catalizada por el Fe^{2+} , en su sitio activo. Recientemente se sugirió que el posible papel de AdhE en aerobiosis es la protección contra el estrés oxidativo. Esta hipótesis se basó en la caracterización de una mutante *adhE*, la cual resultó ser muy sensible a H_2O_2 , presentando defectos en la división celular, genera altos niveles de peróxido y su proteoma está oxidado por carbonilación (Echave, *et al.*, 2003).

1.4.2. AdhE como modelo para estudiar la oxidación de proteínas

Como se mencionó, AdhE es una enzima fermentativa que cataliza la reducción de acetil-CoA hasta etanol por medio de dos reacciones de reducción consecutivas y reversibles (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999). Partiendo de esta reversibilidad, se podría esperar que *Escherichia coli* pudiera crecer en etanol como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, en aerobiosis esto no es posible por dos motivos: 1) la transcripción del gen *adhE* es insuficiente en condiciones aeróbicas y 2) AdhE se inactiva por oxidación catalizada por un metal (reacción de Fenton), lo cual ocurre entre el Fe^{2+} que se une en el sitio catalítico del dominio alcohol oxidorreductasa, y H_2O_2 formando $\text{HO}\cdot$ que oxida localizadamente los aminoácidos del sitio activo (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

Sin embargo, recientemente se aisló una mutante de *Escherichia coli* con la capacidad de crecer en etanol en condiciones aeróbicas. La caracterización de esta mutante mostró que este cambio de función fisiológica se debe únicamente a dos mutaciones en el gene *adhE*: A267T y Q568K. La mutante no tiene aumentada la actividad catalítica ni tampoco es menos sensible a oxidación catalizada por un metal (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000). De hecho, en

ensayos *in vitro* con la enzima mutante purificada, se observó que es incluso más sensible a oxidación comparada con la enzima silvestre. Este dato sugirió que esta enzima para ser activa en aerobiosis se debe de proteger por otro componente presente *in vivo* (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

Basándose en la hipótesis anterior, se realizó un estudio que buscaba ese otro componente de protección de AdhE. A raíz de esa investigación se reportó que la chaperona DnaK es ese componente que participa en la protección de la enzima mutante AdhE^{A267T Q568K} contra la oxidación, permitiéndole ser catalíticamente activa en aerobiosis. Se comprobó genéticamente que la ausencia de DnaK hace que AdhE se vuelva sensible a la oxidación y se pierde la capacidad de crecer en etanol. Estudios de complementación con un plásmido que sobreexpresa DnaK confirmaron este dato, al recuperar el fenotipo en una mutante *dnaK* (Echave, *et al.*, 2002). De esta forma se abrió la pauta a la investigación del papel de las chaperonas moleculares como escudos moleculares, ya no sólo como plegadoras, que protegen contra daño por oxidación.

Debido a la creciente bibliografía que describe la participación de chaperonas moleculares en el plegamiento de diferentes sustratos proteicos, en donde se observa que cada combinación de chaperonas provee un mecanismo de acción particular, nos preguntamos qué otras chaperonas moleculares o proteínas de función múltiple participaban en la protección de proteínas contra la oxidación.

1.3. OBJETIVOS

- a) Profundizar en el conocimiento de la respuesta molecular ante dos tipos de estrés: oxidativo y por calor en condiciones de anaerobiosis y fase estacionaria.
- b) Describir el mecanismo de protección contra la oxidación de la enzima AdhE en aerobiosis.

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La respuesta a estrés por calor es prácticamente igual en todos los organismos y consta de la síntesis masiva de Hsps y supresión de la mayoría de las proteínas basales. A pesar del hecho de que la respuesta a cada estrés está caracterizada por un regulón bajo el control transcripcional de un factor sigma diferente, todas las respuestas convergen en la sobreexpresión de Hsps. Dicha sobreexpresión en estrés está regulada por el factor sigma 32 (*rpoH*) en fase exponencial aeróbica, pero poco se sabe de su expresión en condiciones anaeróbicas en fase estacionaria, que recrea el hábitat natural de *Escherichia coli*. Por este motivo, esta tesis busca profundizar el entendimiento de la respuesta general a estrés en estas condiciones fisiológicas.

Dentro de la respuesta de protección ante estrés oxidativo, se han descrito sistemas de reparación de daño para proteínas sólo para la oxidación de metionina y cisteína. Sin embargo, la oxidación de proteínas es extensa y hasta el momento no existen reportes que describan cómo se protegen y/o reparan los diferentes tipos de daño, en específico el daño por carbonilación. Para tener un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que los microorganismos presentan para proteger a sus proteínas utilizamos la enzima AdhE como modelo para describir un mecanismo de protección contra el daño oxidativo.

2.1. LISTA DE CEPAS UTILIZADAS

La tabla siguiente enlista las cepas bacterianas utilizadas en esta investigación:

Tabla 3. Lista de Cepas

Cepa	Genotipo	Referencia
MC4100	F ⁻ <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 flb-5301 deoC1 pts F25</i>	Silhaby et al, 1983
XLI Blue-MRF	<i>endA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻m_k⁺), lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F'[proAB, lacI^qZΔM15, Tn10]</i>	Bullock et al. 1987.
JMH1025	MC4100, <i>ΔrpoH::kan</i>	Mogk et al. 2001
JMH0039	MC4100, <i>ΔrpoS::tet</i>	Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002
JMH1872	MC4100, pAJW5	Lab. Peter Lund
JE52	MC4100 <i>AdhE^{A267T/E568K}</i> , capaz de crecer en medio mínimo etanol	Membrillo-Hernandez et al, 2000
JMH0195	Mutante derivada de JE52 con el transposón <i>miniTn10dkan</i> , incapaz de crecer en etanol	Este trabajo
JMH0196	Mutante derivada de JE52 con el transposón <i>miniTn10dkan</i> , incapaz de crecer en etanol	Este trabajo
JMH0198	JE52 <i>mdh::miniTn10dkan</i> (P1 JMH195 X JE52)	Este trabajo
JMH0199	JE52 <i>acnB::miniTn10dkan</i> (P1 JMH196 X JE52)	Este trabajo
ECL4000	MC4100 F(<i>adhE-lacZ</i>)	Membrillo-Hernandez y Lin, 1999
JMH0207	ECL400 <i>mdh::miniTn10dkan</i> (P1 JMH198 X ECL4000)	Este trabajo
JMH0208	ECL400 <i>acnB::miniTn10dkan</i> (P1 JMH199 X ECL4000)	Este trabajo
JRG3509	MC4100 <i>acnA::kan</i>	Tang et al, 2002
JRG3258	MC4100 <i>acnB::tet</i>	Tang et al, 2002
JMH0049	MC4100 <i>adhE::tet</i>	Membrillo-Hernandez y Lin, 1999
JMH0288	JE52 <i>Δdnak::cat</i>	Echave et al, 2002
JRG2499	DH5α pGEX-KG	Tang et al, 2002
JRG	DH5α pGEX-KG <i>acnB</i>	Tang et al, 2002
JRG4171	DH5α pGEX-KG <i>acnB^{cys769Ser}</i> (apo AcnB)	
JMH1446	MC4100 pGEX-KG	Este trabajo
JMH1462	JRG3258 pGEX-KG	Este trabajo
JMH1450	JE52 pGEX-KG	Este trabajo
JMH1454	JMH0198 pGEX-KG	Este trabajo
JMH1458	JMH0199 pGEX-KG	Este trabajo
JMH1448	MC4100 pGS1305	Este trabajo
JMH1464	JRG3258 pGS1305	Este trabajo
JMH1452	JE52 pGS1305	Este trabajo
JMH1456	JMH0198 pGS1305	Este trabajo
JMH1460	JMH0199 pGS1305	Este trabajo
JMH1449	MC4100 pGS1307	Este trabajo

CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

JMH1465	JRG3258 pGS1307	Este trabajo
JMH1453	JE52 pGS1307	Este trabajo
JMH1457	JMH0198 pGS1307	Este trabajo
JMH1461	JMH0199 pGS1307	Este trabajo
JMH1466	MC4100 pGS447	Este trabajo
JMH1467	JRG3258 pGS447	Este trabajo
JMH1468	JE52 pGS447	Este trabajo
JMH1469	JMH0198 pGS447	Este trabajo
JMH1470	JMH0199 pGS447	Este trabajo
JMH1471	MC4100 pBN15	Este trabajo
JMH1472	JRG3258 pBN15	Este trabajo
JMH1473	JE52 pBN15	Este trabajo
JMH1474	JMH0198 pBN15	Este trabajo
JMH1475	JMH0199 pBN15	Este trabajo
JMH1480	pJMH988	Este trabajo
JMH1481	pJMH989	Este trabajo

2.1.1. Mantenimiento de cepas

La colección de cepas bacterianas se mantienen almacenadas en medio LB más glicerol 10% y se conservan a -80°C .

2.2. LISTA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS

A continuación se enlistan los plásmidos utilizados en este trabajo:

Tabla 4. Lista de Plásmidos

Vector	Genotipo	Referencia
pUC18	Vector general de clonación	Stratagene
pUC4K	Kan ^R	Vieira y Messing 1982.
pSK+	Vector general de clonación	Stratagene
pGEX-KG	GST fusion expression vector; Amp ^R	Guan and Dixon, 1991
pGS1305	Derivado de pGEX-KG con GST fusionada a AcnB; Amp ^R	Tang et al, 2004
pGS1307	Derivado de pGEX-KG con GST fusionada a la forma catalíticamente inactiva de AcnB ^{Cys768Ser} ; Amp ^R	Tang et al, 2004
pGS447	pUC119, acnA ⁺ , Amp ^R	Prodromou et al, 1991
pBN15	P _{tac} ΔdnaKJ ⁺ lacI ⁺ bla ⁺	Rockabrand et al, 1995
pJMH988	pUC18 con inserto de 9-10 kb que contiene la zona de inserción del transposón de JMH0198	Este trabajo
pJMH989	pUC18 con inserto de 4.7 kb que contiene la zona de inserción del transposón de JMH0199	Este trabajo

2.3. LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en Invitrogen y se enlistan a continuación:

Tabla 5. Lista de Oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR del gen *adhE*

Oligo	Gen	Secuencia
ADHE A5'	<i>adhE</i>	5' ATCACAGTGAGTGTGAGCGCGAGTAAGC 3'
ADHE A3'	<i>adhE</i>	5'GGCGTAATCTGTGCTTCT 3'
ADHE B5'	<i>adhE</i>	5' TAAAGCCGCATACAGCTCC 3'
ADHE B3'	<i>adhE</i>	5' GGATGAAGTGATTACTGATGGC 3'
ADHE C5'	<i>adhE</i>	5' TTCAAACCTCGCACCTTCCC 3'
ADHE C3'	<i>adhE</i>	5' CTGTGTGCTTTCGGTGGTCT 3'
ADHE D5'	<i>adhE</i>	5' TGGTTATGGACATGCCGAAG 3'
ADHE D3'	<i>adhE</i>	5' GAAGGGGCCGTTTATGTTG 3'

2.4. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y SUPLEMENTOS UTILIZADOS

Para los experimentos de marcaje con metionina- ³⁵S se utilizó medio mínimo (glucosa 0.2%, tiamina 2 µg/mL y todos los aminoácidos a 20 µg/ml, excepto metionina).

Se utilizó medio mínimo con glucosa 0.2% o etanol 2% como única fuente de carbono y energía, tiamina (2 µg/mL) y todos los aminoácidos (20 µg/mL) para los experimentos de selección de mutantes, complementación y coinmunoprecipitación.

En los experimentos de decaimiento de la actividad de AdhE se utilizó LB (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%) más glucosa 0.2%. Para preparar los medios de cultivo sólidos se le agregó al medio mínimo o LB 1.5% de agar (w/v). Los antibióticos y otros suplementos utilizados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Antibióticos y suplementos utilizados en los medios de cultivo

Antibiótico o Suplemento	Concentración
Ampicilina	200 µg/ml
Estreptomicina	200 µg/ml
Kanamicina	25 µg/ml ó 100 µg/ml
Tetraciclina	25 µg/ml
Cloramfenicol	25 µg/ml
H ₂ O ₂	4, 8 y 12 mM

2.5. LISTA DE BACTERIÓFAGOS UTILIZADOS

En este trabajo se realizaron mutaciones al azar con el transposón miniTn10d_{kan} y las mutantes se transfirieron mediante transducción con los siguientes bacteriofagos:

Tabla 7. Bacteriófagos utilizados

Bacteriófago	Genotipo relevante	Referencia
P1 _{vir}	Fago general de transducción	Ubelaker, 1978
λNK316	miniTn10d _{kan}	Reddy, 1997

2.6. TÉCNICAS GENÉTICAS

2.6.1. Propagación del bacteriófago P1_{vir}

1. Cultivo de la cepa MC4100 en LB + CaCl₂ 5 mM a 37°C a 200 rpm toda la noche (toda la noche)
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender las células en 750 µl de LB + CaCl₂ 5 mM.
4. Mezclar en tubos de ensayo:
 - 100 µl células
 - 100 µl células + 100 µl Fagos P1_{vir}
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 3 ml de LB + CaCl₂ 5 mM.
7. Incubar a 37°C por 4 horas hasta que se observe lisis.
8. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
9. Recuperar el sobrenadante.

10. Agregar 2 gotas de cloroformo con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex.
11. Almacenar a 4°C.

2.6.2. Transducción mediada por el bacteriófago P1_{vir}

Propagación y lisado de la cepa donadora con el bacteriófago P1_{vir}

1. Cultivo de la cepa a transducir en LB + CaCl₂ 5 mM a 37°C a 200rpm toda la noche.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender las células en 750 µl de LB + CaCl₂ 5 mM.
4. Mezclar en tubos de ensaye:
 - 100 µl de células (Control Negativo)
 - 100 µl de células + 10 µl de fago P1_{vir}
 - 100 µl de células + 100 µl de fago P1_{vir}
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 3 ml de LB + CaCl₂ 5 mM.
7. Incubar a 37°C hasta observar lisis.
8. Recuperar el lisado en un tubo eppendor.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
10. Recuperar el lisado en un tubo eppendor y agregar 2 gotas de cloroformo con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex.
11. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
12. Almacenar a 4°C.

Transducción a la cepa receptora.

13. Cultivo de la cepa receptora en LB + MgSO₄ 10 mM a 37°C a 200rpm toda la noche.
14. Centrifugar el cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos
15. Resuspender las células en 750 µl de LB + MgSO₄ 10 mM.
16. Mezclar en tubos eppendorf:
 - 100 µl de células (Control Negativo)
 - 100 µl de células + 0.5, 2, 5, 10 ó 100 µl del lisado
17. Incubar 10 minutos a 37°C, es muy importante que solo sean 20 minutos no más ya que se pueden lisar las células.
18. Agregar 1 ml de LB + 20 mM citrato de sodio y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
19. Repetir el paso 18 tres veces más.
20. Resuspender las células en 2 ml de LB + 20mM citrato de sodio + antibiótico de selección.
21. Incubar a 37°C a 200 rpm toda la noche.
22. Centrifugar los cultivos en donde se observa crecimiento y resuspender las células en 1000 µl LB + 20 mM citrato de sodio + antibiótico de selección.
23. Platear con el antibiótico de selección e incubar a 37°C toda la noche.

2.6.3. Mutagénesis al azar por transposición

En este trabajo se utilizó la mutagénesis al azar por transposición para buscar genes que codificaran para proteínas importantes en la protección de enzimas contra daño oxidativo. Se utilizó el bacteriófago λ NK1098 en la cepa JE52 (crece en medio mínimo etanol) y se buscaron mutantes que hubieran perdido la capacidad de crecer en etanol.

Procedimiento:

1. Cultivo de la cepa JE52 en LB + CaCl_2 5 mM, a 37°C toda la noche.
2. Centrifugar 1.5 ml del cultivo a 14,000 rpm por 5 minutos.
3. Resuspender las células en 750 μl de MgSO_4 10 mM + CaCl_2 5 mM.
4. Mezclar en tubos de eppendorf:
 - 100 μl de células (Control Negativo)
 - 100 μl de células + 100 μl de λ NK1098
5. Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Agregar 1 ml de LB + MgSO_4 10mM.
7. Incubar a 37°C por 2-3 horas sin agitación.
8. Hacer diluciones 10^{-2} y 10^{-4} con MgSO_4 10mM.
9. Platear en cajas de LB con kanamicina
10. Incubar toda la noche a 37°C
11. Seleccionar mutantes con el fenotipo de interés

2.6.4. Transformación

Método de electroporación.

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C a 200 rpm toda la noche.

Células electrocompetentes

2. Inocular 250 μl del cultivo en 50 ml de LB.
3. Incubar a 37°C hasta una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0.7-0.9.
4. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos en tubos Falcon a 4°C.
5. Resuspender las células en 25 ml de glicerol 10% frío, agitando suavemente por 1 hora.
6. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos.
7. Resuspender las células en 10 ml de glicerol 10% frío agitando suavemente por media hora.
8. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos.
9. Resuspender las células en 0.5 ml de glicerol 10% frío y guardar a -80°C.

Transformación

10. Mezclar en tubos eppendorf:
 - 50 μl de células (control negativo)

- 50 μl de células + 2 μl plásmido conocido (control positivo)
- 50 μl de células + 1, 2 ó 5 μl plásmido
- 11. Usar las celdas de electroporación de 0.1 cm de Biorad y el programa Ec1 del electroporador de Biorad Gene Pulser®.
- 12. Después de dar el pulso agregar 1 ml de LB y pasar a tubos eppendorf.
- 13. Incubar a 37°C en agitación por 2 a 3 horas.
- 14. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
- 15. Resuspender las células en 100 μl de MgSO_4 10 mM.
- 16. Platear con el antibiótico de selección e incubar a 37°C toda la noche.

Método de CaCl_2 .

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C en agitación a 200 rpm toda la noche.
- Células competentes
2. Inocular 150 μl del cultivo en 15 ml de LB.
 3. Incubar a 37°C hasta $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0.4-0.6.
 4. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C en tubos Falcon.
 5. Resuspender las células en 5 ml de CaCl_2 100 mM frío.
 6. Incubar en hielo 40 minutos.
 7. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
 8. Resuspender las células el 500 μl de CaCl_2 100 mM frío.

Transformación

9. Mezcal en tubos eppendorf:
 - 50 μl de células (control negativo)
 - 50 μl de células + 2 μl plásmido conocido (control positivo)
 - 50 μl de células + 1, 2 ó 5 μl plásmido problema
10. Incubar en hielo 30 minutos.
11. Incubar a 43°C por 90 segundos.
12. Agregar 1 ml de LB.
13. Incubar a 37°C por 2 a 3 horas en agitación.
14. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos.
15. Resuspender las células en 100 μl de MgSO_4 10 mM.
16. Platear con el antibiótico de selección e incubar a 37°C toda la noche.

2.7. TÉCNICAS MOLECULARES

2.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación el gen *adhE* se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó el Mix de Amplificación de Roche (15 μL de agua grado PCR, 25 μL de Master Mix, 1 μL de cada oligonucleótido, 1 μL de DNA purificado).

Las condiciones utilizadas fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C, y finalmente 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

2.7.2. Purificación de plásmidos

Se utilizó el Kit QIprep Spin Miniprep de QIAGEN.

2.7.3. Purificación de DNA cromosomal

Técnica de Fenol-Cloroformo

1. Cultivo de la cepa en 50 ml de LB a 37°C a 200 rpm de agitación hasta una OD_{600nm} de 0.8-1.0.
2. Centrifugar el cultivo en tubos Falcon a 3,000 rpm por 10 minutos.
3. Resuspender las células 10 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5) y agregar 10 mg de lisozima
4. Incubar a 30°C por 15 minutos en agitación.
5. Agregar 1 ml de SDS 20% y agitar con una micropipeta por 15 segundos.
6. Agregar 10 ml de fenol (saturado con buffer TE) y 1.5 ml de NaCl 5 M.
7. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
9. Agregar un volumen de fenol y un volumen de cloroformo.
10. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
12. Agregar un volumen de cloroformo.
13. Agitar invirtiendo el tubo por 20 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos recuperar la fase superior.
15. Agregar un volumen de isopropanol suavemente por las paredes del tubo.
16. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio en la zona de interfase para recuperar el DNA que esta en forma de fibras.
17. Lavar el DNA con etanol al 70% frío y secar a temperatura ambiente.
18. Resuspender en 1 ml de buffer TE.
19. Agregar 20 µg/ml de RNAsa e incubar 1 hora a 50°C.
20. Agregar 100 µg/ml de proteinasa K e incubar 1 hora a 37°C.
21. Ajustar el volumen a 5 ml con buffer TE.
22. Agregar un volumen de fenol y un volumen de cloroformo.
23. Agitar invirtiendo el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
24. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.
25. Agregar un volumen de cloroformo.
26. Agitar invirtiendo el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
27. Centrifugar a 3,000 rpm por 15 minutos y recuperar la fase superior.

28. Agregar un volumen de isopropanol suavemente por las paredes del tubo.
29. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio en la zona de interfase para recuperar el DNA que esta en forma de fibras.
30. Lavar el DNA con etanol al 70% frío y secar a temperatura ambiente
31. Resuspender en 1 ml de buffer TE

2.7.4. Southern blot

Digestión.

1. Digestión del DNA cromosomal con la(s) enzima(s) de restricción necesarias.

Electroforesis.

2. Separación del DNA digerido, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1.5 µg/ml). Tomar una fotografía al gel.

Transferencia a la membrana de nitrocelulosa Hybond™ N⁺.

4. Incubar el gel en solución depurinizadora (HCl 0.25M) e incubar en agitación lenta por 12 minutos, hasta observar que el azul de bromofenol cambie a amarillo debido a la acidez del medio que tiene HCl. Lavar el gel con H₂O destilada.
5. Incubar el gel con solución desnaturalizadora (NaOH 0.5M, NaCl 1.5M) con agitación lenta por 25 minutos, observar que el azul de bromofenol regrese a su color azul. Lavar el gel con H₂O destilada.
6. Incubar el gel con solución neutralizadora en agitación lenta por 30 minutos. Lavar el gel con H₂O destilada.
7. Transferir el DNA a la membrana:
Poner en una base una tira de papel Whatman^{3MM} 3 veces el tamaño de gel a lo largo para hacer un puente. Colocarlo sobre el soporte de la cámara y mojar este papel con buffer SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.15 M pH 7.0).
Poner el gel sobre el papel Whatman y después la membrana de nylon, procurar que no se formen burbujas.
Colocar sobre la membrana tres rectángulos del tamaño del gel de papel Wattman^{3MM} y sanitas, aproximadamente 5cm de altura de sanitas.
Presionar todo con un peso de aproximadamente 1 k.
Dejar transfiriendo por 4 horas o toda la noche.

Marcaje de la sonda (Kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System de Amersham)

8. Exponer la membrana a luz UV por 30 segundos antes de hibridar con la sonda.
9. Para el buffer de hibridación (Gold Hybridization Buffer ECL Amersham®) se requieren 0.25 ml por cada cm² del recipiente usado. Para un gel de 8 x 11 cm se preparan 30 ml de buffer.
10. Agregar al Buffer de hibridación 0.5 M de NaCl (0.850 g), agitar y esperar a que se disuelva.

CAPITULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

11. Agregar en agitación 5% peso/volumen del agente bloqueador del kit ECL Amersham® (1.5 g) y mantener en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
12. Prehibridizar la membrana a 42°C por 20 minutos en el buffer de hibridación.
13. Marcar la sonda: poner 10 µl de sonda en un tubo eppendorf.
14. Desnaturalizar calentando a 100°C por 5 minutos.
15. Incubar en hielo por 5 minutos y centrifugar 10 segundos.
16. Agregar un volumen de agente de marcaje del Kit ECL Amersham®, mezclar con la micropipeta.
17. Agregar un volumen de la solución de glutaraldehído del kit ECL Amersham®.
18. Incubar a 37°C por 10 minutos.
19. Agregar al buffer de hibridación sin tocar la membrana e incubar a 42°C toda la noche.

Detección de la señal

20. Lavar la membrana con 100 ml de buffer primario (Urea 2M, SDS 0.1%, Na₂PO₄ pH7 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1mM y reactivo de bloqueo del kit ECL 0.2%) caliente a 55°C agitando suavemente por 10 minutos a 55°C.
21. Repetir el lavado.
22. Lavar la membrana con 100 ml de buffer secundario (solución 20X: Tris base 1M, NaCl 2M ajustada a pH 10, al momento de usar agregar 2ml/L de MgCl₂ 1M), agitando suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente.
23. Repetir el lavado.
24. Pasar la membrana a un recipiente limpio eliminando el exceso de buffer secundario.
25. Agregar sobre la membrana del lado del DNA una mezcla de volúmenes iguales del reactivo de detección 1 con el reactivo de detección 2 del kit ECL Amersham®.
26. Colocar una película autoradiográfica sobre la membrana.
27. Dejar exponiendo por 5 minutos y revelar.

2.7.5. Marcaje metabólico con ³⁵S-Met

1. Se inoculan 5 mL de M9 completo menos metionina con la cepa de interés.
2. Se incuban a 37 °C agitando a 200 rpms toda la noche.
3. Con el pre-incubado se inoculan 20 mL del mismo cultivo hasta una OD600 inicial de 0.05.
4. Se incuba a 37 °C y 200 rpms hasta una OD600 de 0.2
5. Se toma 1 mL (en un Eppendorff de 2 mL) por triplicado de cada cultivo a cada tiempo y condición requerida y se dejan atemperar en el termomixer a 37°C y 750 rpms.
6. Se agrega rifampicina 300 µg/mL (de un stock de 40 mg/mL) y se incuban por 2 minutos.
7. Se agrega S³⁵-Met y se incuba por 10 minutos

8. Se agrega metionina fría 40 μ L de stock de 20 mg/mL y cloramfenicol 40 μ L de stock 1 mg/mL
9. Se incuban en hielo las muestras
10. Se centrifuga a 14,000 rpms por 5 minutos
11. Se lavan las células en 1 mL de $MgSO_4$ 10 mM
12. Se resuspenden las células en Buffer Laemmli (solución 2X: Tris-HCl 125 mM, glicerol 10%, SDS 10%, DTT 130 mM) y se hierven por 5 minutos
13. Se corre entre 10 y 12 μ L de cada muestra en un gel separador de PAGE al 9%.
14. Se tiñe/destiñe el gel, se seca y se expone a una película Kodak por 4-6 hrs o toda la noche a -80 C.
15. Se revela la película.

2.8. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

2.8.1. Actividad de β -galactosidasa

1. Cultivo de la cepa en LB a 37°C en agitación a 200 rpm toda la noche.
2. Inocular 100 μ l del cultivo en 5 ml de LB.
3. Incubar a 37°C a 200 rpm de agitación hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4.
4. Agregar 40 μ g / ml de Cloramfenicol, para inhibir la síntesis de proteínas.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Tomar 1 ml de cada cultivo y centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
7. Resuspender las células de células en 1 ml de NaCl al 0.8% frío.
8. Centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm.
9. Resuspender las células de células en 1 ml de Buffer Z (para 100 mL: 1.6 g $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 0.55 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.075 g KCl, 0.012 g $MgSO_4$, pH 7.0) con β -mercaptoetanol.
10. Medir D.O. a 600nm usando como blanco 1 ml de Buffer Z con β -mercaptoetanol.
11. Hacer triplicado de cada cultivo con lo siguiente:
 - 30 μ l de células + 970 microlitros de Buffer Z con β -Mercaptoetanol
 - 50 μ l de células + 950 microlitros de Buffer Z con β -Mercaptoetanol
 - 100 μ l de células + 900 microlitros de Buffer Z con β -MercaptoetanolUsar 1 ml de Buffer Z con β -mercaptoetanol como control.
12. Agregar 2 gotas de cloroformo ($CHCl_3$) y 2 gotas de SDS al 0.1% con una pipeta Pasteur.
13. Mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El tubo control se trata de la misma forma.
14. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
15. Agregar 200 μ l de ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido: 100 mL de Buffer Z y 0.55 g de ONPG) a 0.4 % en intervalos de 15 segundos entre

tubo y tubo (para controlar el tiempo en cada tubo) y mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El ONPG es el sustrato de la β -galactosidasa que al hidrolizarse por esta enzima, presenta un máximo de absorbancia a 420nm.

16. Incubar a temperatura ambiente de 15 a 20 minutos o hasta observar el color amarillo.
17. Agregar 500 μ l de Na_2CO_3 1M (también a intervalos de 15 segundos entre cada tubo) para detener la reacción del ONPG.
18. Medir la absorbancia a 420 nm y 550 nm (a 550nm se mide la densidad celular) de los tubos y usar el control como blanco. Se uso un espectrofotómetro de UV/Visible Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech).
19. Calcular las Unidades Miller (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por función de densidad óptica).

2.8.2. Decaimiento de la actividad de AdhE

Preparación de los cultivos anaeróbicos

1. Inocular toda la noche 50 mL de M9 completo con Glucosa 0.2% con las cepas a analizar
2. Incubar 24 horas a 37°C
3. Calcular la OD₆₀₀ de cada toda la noche y realizar cálculos para inocular botellas de con 500 mL de medio con una OD₆₀₀ final de 0.1. Las botellas deberán estar llenas hasta la rosca para minimizar el aire en ellas.
4. Incubar a 37°C 24 horas

Cambio a aerobiosis

5. Medir la OD₆₀₀ de cada cultivo
6. Tomar una alícuota de 50 mL de cada cultivo (t=0)
7. Transferir los cultivos (previa agitación para evitar dejar las células precipitadas) a matraces estériles de 2L.
8. Incubar por 6 horas a 37°C agitando a 200 rpms. Tomar alícuotas de 50 mL (o menos, según lo concentrado del cultivo) a los 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas.
9. Centrifugar las alícuotas 10 minutos a 3000 rpms
10. Resuspender las células en 1 mL de buffer A (300 mM K_2CO_3 (pH 10), 0.25 mM NAD^+ , 170 mM etanol) con inhibidor de proteasas

Obtención de extractos celulares:

11. Sonicar a 15 micrones por 10 segundos, 2 veces cada muestra.
12. Centrifugar las muestras 30 minutos a 4°C
13. Pasar los sobrenadantes a tubos nuevos

Actividad catalítica de AdhE

14. Realizar ensayo de actividad catalítica de AdhE:
Medir a espectrofotométricamente a 340nm la aparición de NADH en una celda de cuarzo de 1 mL:
500 μ L K_2CO_3

150 uL EtOH
45 uL NAD⁺
20 uL Extracto sin células

16. Medir proteínas totales
17. Realizar cálculos para determinar Unidades de AdhE/mg proteína total

2.9. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

2.9.1. Western Blot

Electroforesis

1. Se corren las muestras en un gel de SDS-PAGE 5% para el gel concentrador y 7% para el gel separador 1 hora y media a 100 V.

Transferencia

2. La membrana PVDF se sumerge durante 1 minuto en metanol a temperatura ambiente. Se lava con agua destilada.
3. Se sumergen 2 papeles filtro de BioRad, la membrana lavada y el gel en un buffer de Tris Glicina (10%) metanol (20%) por 15 minutos a -20 °C.
4. Se coloca en la cámara semiseca, un filtro, la membrana, el gel y otro filtro, eliminando las burbujas de aire en cada paso.
5. Se corre a 25 V, 400 mA, 45 minutos.
6. Al terminar la transferencia lavar brevemente la membrana con agua. La membrana puede secarse al aire y guardarse en una bolsa de plástico o dejarse humedecida con PBS hasta su uso.

Western blot

7. Lavar las membranas con solución de bloqueo (PBS, Tween 20 0.3%, leche Svelty 2%) a temperatura ambiente 30 minutos o toda la noche a 4°C.
8. Incubar la membrana 30 minutos a 25 °C con el anticuerpo primario en 10 mL de PBS-Tween 20 0.3% Svelty 2%.
9. Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 0.3%. Cada lavado de 10 minutos y con abundante solución.
10. Incubar la membrana 30 minutos con el anticuerpo secundario (Anti IgG-peroxidasa, Invitrogen disuelto 1/3,000 en 10 mL PBS-Tween20 0.3% Svelty 2%).
11. Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 0.3% cada lavado de 10 minutos y con abundante solución.

Revelado

12. Se coloca la membrana lavada sobre un recipiente limpio y seco y se agrega sobre ella la solución reveladora de la actividad de peroxidasa, la proporción de cada solución debe ser 1:50 (Amersham). Se mezclan los reactivos antes de verter sobre la membrana. Se vierten los reactivos mezclados sobre la membrana y se deja proceder la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos.
13. Decantar el exceso de reactivo y cubrir la membrana con un acetato y exponer 5-10 minutos a una película autoradiográfica.
14. Revelar la película.

2.9.2. Coinmunoprecipitación

Obtención de cultivos

1. Se inoculan 50 mL de M9 + Glucosa con las cepas MC4100, JE52, *adhE*, *dnaK*, *acnB* hasta alcanzar una OD600 de 0.1 y 50 mL de M9 + etanol con JE52.
2. Se incuban a 30°C hasta que se alcance una OD600 de 0.3 – 0.4
3. Se centrifugan los cultivos y se recuperan las células.

Complejos anticuerpo-proteína A/G-SEFAROSA

1. En un tubo eppendorf mezclar 30 μ L de proteína A-sefarosa al 50% con 0.5 mL de PBS y 1- 5 μ L de antisuero policlonal.
2. Mezclar las suspensiones bien por lo menos 1 hora y hasta 24 horas a 4°C en un rotador de tubos. Se puede agregar Tritón X-100 0.01% (w/v) para facilitar el mezclado.
3. Centrifugar 2 segundos a 14,000 rpms a 4 °C.
4. Aspirar el sobrenadante con la punta de una pipeta Pasteur conectada a un aspirador de vacío.
5. Lavar x 2 veces agregando 1 mL de buffer TE resuspender por inversion de 3 a 4 veces.
6. Los complejos están listos para ser usados y pueden ser guardados hasta 6 horas a 4 °C hasta su uso.

Lisis

a)ESFEROPLASTOS:

1. Lavar las células $10^6 - 10^7$ (5 a 20 millones = 1 mL lisado) 3 veces con el mismo volumen de PBS que en el cultivo inicial.
2. Se resuspende las células en 50 μ L de buffer de incubación (10 mM fosfato de sodio, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.8 M sacarosa aprox 30%) con agitación suave por 3 segundos en vortex a velocidad media.
3. Se agrega lisozima a una concentración de 0.4 mg/mL
4. Se incuba a 20 °C por 30 minutos
5. Se da un choque osmótico diluyendo 100 veces en 10 mM NaCl más inhibidor de proteasas.

b)LISIS SUAVE CON DETERGENTES NO IONICOS:

1. Resuspender las células en 1 mL (x cada $10^6 - 10^7$ células)de Buffer de lisis NP-40 frío (4 °C) (150 mM NaCl, 1% NP-40 y 50 mM Tris pH 8.0, inhibidor de proteasas) con agitación suave por 3 segundos en vortex a velocidad media.
2. Incubar las células en hielo por 30 minutos
3. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpms 4 °C. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo sin resuspender las células. Mantener en hielo.

c) LISIS POR SONICACIÓN

1. Resuspender las células en PBS (para 1L: 8 g NaCl, 0.2vg KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 pH 7.4) y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpms a 4 °C.
2. Resuspender las células en buffer de lisis (10 volúmenes de Buffer RIPA: 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0)
3. Sonicar en hielo con ciclos cortos de máxima intensidad, de 10 a 30 segundos cada una con 4 repeticiones.
4. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpms a 4 °C.
5. Recuperar el sobrenadante y mantener en hielo

- Los extractos celulares se pueden congelar a -70 °C hasta la coimmunoprecipitación. Es preferible lisar las células inmediatamente antes de la inmunoprecipitación para evitar degradación de proteínas o disociación de complejos proteicos.

Pre-limpieza del lisado

1. Si los lisados fueron congelados se deben centrifugar 15 minutos a 14,000 rpms a 4 °C antes de este paso.
2. En un tubo eppendorf agregar 1 mL de lisado celular y 30 μL de mezcla proteína A-sefarosa al 50%.
3. Mezclar 30 minutos a 4 °C en un rotador de tubos.
4. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpms a 4 °C.
5. Recuperar el sobrenadante con cuidado de no llevarnos sefarosa.

Coinmunoprecipitación

- a. Agregar 10 μL de BSA (Bovine Serum Albumine) al 10% a la mezcla anticuerpo-proteína A-sefarosa y transferir a esta mezcla todo el volumen de lisado pre-limpio.
- b. Incubar de 1 a 2 horas a 4 °C mezclando en un rotador de tubos. Se pueden incubar toda la noche pero esto aumenta la degradación de proteínas y la disociación de complejos.
- c. Centrifugar 5 segundos a 14,000 rpms a 4 °C.
- d. Aspirar el sobrenadante.
- e. Agregar 1 mL de buffer TE, tapar los tubos y resuspender por inversión de 3 a 4 veces.
- f. Centrifugar por 2 segundos a 14,000 rpms a 4 °C
- g. Aspirar el sobrenadante dejando aproximadamente 20 μL sobre la sefarosa.
- h. Lavar la sefarosa 3 veces más. El tiempo total de lavado debe ser de aproximadamente 30 minutos guardando las muestras en hielo por 3-5 minutos entre lavados si es necesario.
- i. Lavar la sefarosa una vez más con 1 mL de PBS frío y aspirar el sobrenadante completamente. El producto final debe ser aproximadamente

15 μ L de sefarosa con antígeno pegado. Los inmunoprecipitados pueden ser procesados inmediatamente o congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análisis.

- j. Se disocian los complejos agregando 50 μ L de buffer de elución (1% v/v SDS, 100 mM Tris-HCl pH 7.4, esto se puede guardar hasta 1 semana a temperatura ambiente, se agrega 10 mM DTT antes de usar – de polvo-) y se mezcla en vortex.
- k. Incubar 5 minutos a temp amb y 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se enfrían los tubos a temperatura ambiente
- l. Analizar los coinmunoprecipitados por electroforesis de 1 o dos dimensiones o por Western Blot.

2.10. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

2.10.1 Conteo de células viables: prueba de sensibilidad a H_2O_2

1. Inocular 3 mL de LB con las cepas de interés
2. Incubar toda la noche a 37°C .
3. Inocular en matraces de 125 mL, 30 mL de LB a una OD600 de 0.1, con cada toda la noche. Se hace por triplicado para cada cepa.
4. Incubar a 37°C hasta que los cultivos alcancen OD600 de 0.5.
5. Tomar 100 μ L del cultivo y hacer diluciones $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ y 10^{-6} (este es el tiempo 0).
6. Agregar 5 mM de H_2O_2 .
7. Incubar por 90 minutos a 37°C y tomar alícuotas de 100 μ L a los tiempos 5', 15', 30', 60' y 90'.
8. Cada alícuota se agrega a un tubo Eppendorf con 900 μ L de 10 mM de MgSO_4 y a partir de esta dilución se hacen las consecutivas.
9. Con todas las diluciones hechas se toman 4 μ L de cada una y se colocan con en una caja cuadrículada, por triplicado para cada cepa.
10. Se incuban las cajas toda la noche a 37°C .

2.11. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

2.11.1. Análisis tipo BLAST

Para poder realizar comparaciones de secuencias se hicieron análisis tipo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.1 ARTÍCULO: Diaz-Acosta, *et al.*, 2006 Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* (2006) 185:429–438.

El hecho de que factores, además del calor, como el etanol, el CdCl₂, ciertos antibióticos y H₂O₂, induzcan la síntesis del regulón de estrés por calor o *heat shock*, abre la posibilidad de que este regulón constituya una respuesta generalizada ante diversos tipos de estrés. Sin embargo, se han estudiado poco los efectos de otros estreses en la inducción del regulón de estrés por calor. A pesar de que el grupo de Fridovich (Benov y Fridovich, 1995) demostró que el choque térmico aeróbico produce estrés oxidativo y viceversa, sólo algunos estudios han relacionado el estrés oxidativo con la respuesta a choque calórico (Mizushima *et al.*, 1994, Rockabrand *et al.*, 1995).

La mayoría de la información que tenemos de la respuesta a choque térmico proviene de cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento y en condiciones aeróbicas (Neidhardt *et al.*, 1984 y Morimoto, *et al.*, 1997). Puesto que el nicho ecológico de *Escherichia coli* es el tracto gastrointestinal de mamíferos, donde las condiciones son anaeróbicas y las células se encuentran en fase estacionaria, nos interesó explorar la respuesta a choque térmico cuando existe ya sea un estrés nutricional o fase estacionaria.

Dado que la inducción del regulón de estrés por calor depende del factor σ^{32} y en fase estacionaria el factor sigma más abundante es el σ^S , quisimos realizar un análisis comparativo entre la cepa silvestre y mutantes en *rpoH* y *rpoS*, en estrés por calor y estrés oxidativo, tanto en fase exponencial como estacionaria, en aerobiosis y anaerobiosis. En estas condiciones buscamos diferencias en sensibilidad, inducción de la síntesis de proteínas de estrés por calor y oxidación de proteínas. Estos resultados fueron aceptados el 3 de abril del 2006 para publicación en la revista *Archives of Microbiology*, en un artículo bajo el título *Effect of anaerobic and stationary phase of growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in Escherichia coli K-12*; artículo que a continuación se presenta.

Effect of anaerobic and stationary phase growth conditions on the heat shock and oxidative stress responses in *Escherichia coli* K-12

Alondra Díaz-Acosta · María L. Sandoval ·
Luis Delgado-Olivares · Jorge Membrillo-Hernández

Received: 26 October 2005 / Revised: 28 February 2006 / Accepted: 3 April 2006 / Published online: 6 May 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The natural living style of *Escherichia coli* occurs in the gastrointestinal tract, where most of its existence is spent under anaerobic conditions and in stationary phase of growth. Here we report on the heat shock response of *E. coli* K-12 cells growing in the presence or absence of oxygen. An *rpoH* mutant (impaired in the synthesis of the σ^{32} transcriptional factor) exhibited an increased sensitivity to heat shock but only in the exponential phase of aerobic growth, suggesting that in anaerobic growth conditions, and in aerobic stationary phase, σ^{32} -independent mechanisms are playing a prime role in protecting cells from heat stress. Our results demonstrated that σ^S is not involved in this protection system. Studies on the kinetics of synthesis of Heat shock proteins (Hsp) after an abrupt rise in temperature demonstrated that in the absence of oxygen, the synthesis of Hsp is triggered faster and is sustained for a longer period of time compared to aerobic growth conditions. Finally, the heated cells in the exponential phase of aerobic growth displayed a high concentration of oxidatively damaged proteins in the presence of 4 mM H₂O₂, in sharp contrast to cultures of stationary phase or anaerobic growth.

Keywords *E. coli* · *rpoS* · *rpoH* · Heat shock · Bacteria · Oxygen · Oxidative stress

Introduction

Heat-shock response is conserved practically amongst all organisms. A temperature up shift elicits the massive synthesis of the highly conserved Heat-shock-proteins (Hsp) and the suppression of synthesis of most of the other proteins (Neidhardt et al. 1984; Morimoto et al. 1997). Hsp comprises chaperones, proteases and other stress-related proteins that are not only important during stress conditions (Nollen and Morimoto 2002). Agents other than heat, such as ethanol, CdCl₂, antibiotics (such as novobiocin) and hydrogen peroxide induce the synthesis of heat shock proteins (Delaney 1990; López-Sánchez et al. 1997; VanBogelen et al. 1989). In *Escherichia coli*, a complex control system regulates the expression of heat shock genes (for a review, see Arsene et al. 2000), where *rpoH*, which encodes the σ^{32} transcriptional factor, plays a major role (Connolly et al. 1999). σ factors are transcriptional initiation factors that recruit RNA polymerase to a particular class of promoters (Gruber and Gross 2003). An abrupt up shift in temperature directly increases the translation of the *rpoH* mRNA by destabilizing an RNA secondary structure that occludes its RBS (Morita et al. 1999a, b). Moreover, σ^{32} is transiently stabilized under high temperatures (Straus et al. 1987). Recently, a chaperone network consisting of DnaK (Hsp70) and GroEL (Hsp60) has been described as an additional feedback post-translational control of σ^{32} where both Hsp bind to the sigma factor, preventing the transcription of heat shock genes (Guisbert et al. 2004). Most of the information gathered so far on the heat shock response in *E. coli* has come from studies on bacterial cultures growing aerobically under exponential phase of growth (Neidhardt et al. 1984; Morimoto

A. Díaz-Acosta · M. L. Sandoval · L. Delgado-Olivares ·
J. Membrillo-Hernández (✉)
Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular,
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad
Nacional Autónoma de México,
P.O. Box 70-228, Ciudad Universitaria,
Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico
e-mail: jmh@biomedicas.unam.mx

et al. 1997). Despite the fact that Benov and Fridovich (1995) showed evidence that aerobic heat shock imposes an oxidative stress and that conversely, an oxidative stress can induce a heat shock response, only few studies have related the oxygen tension with the heat shock response (Mizushima et al., 1994; Rockabrand et al. 1995; Bromberg et al. 1998; Guerra et al. 2005; Jakob et al. 1999; Winter et al. 2005). In addition, in a previous communication, our group reported that the chaperone DnaK acts as molecular shield of partially oxidatively damaged proteins (Echave et al. 2002; Membrillo-Hernández et al. 2000). Since the natural lifestyle of *E. coli* occurs in the gastrointestinal tract, most of its existence is spent under anaerobic conditions and in stationary phase of growth. Despite this, studies on the heat shock response under anaerobic or stationary phase growth conditions of the facultative bacterium *E. coli* are yet to be reported.

Cells in stationary phase of aerobic growth exhibit a distinctive rounded cell shape of reduced volume (Lange and Hengge-Aronis 1991; Loewen and Hengge-Aronis 1994) and a generalized resistance to the extremes of temperature, sodium chloride and oxidizing agents such as hydrogen peroxide (Kolter et al. 1993). This stationary phase intrinsic resistance is dependent upon protein synthesis (Jenkins et al. 1988). Accordingly, Hsp are preferentially produced in nutrient starved *E. coli* during the first several hours of starvation (Groat et al. 1986) and DnaK has been reported to have an essential role in the thermotolerance and hydrogen peroxide resistance under these conditions (Rockabrand et al. 1995). Very recently, King and Ferenci (2005) reported divergent roles of σ^S in *E. coli* under aerobic and anaerobic conditions. In this communication, we report on the heat shock response of *E. coli* K-12 cells in the presence or absence of oxygen, in an exponential or stationary phase of growth and on the oxidative stress response of this bacterium in the absence of oxygen.

Materials and methods

E. coli strains, culture conditions and reagents

Strains MC4100 (*F'* $\Delta lacUI69 rpsL$) and its $\Delta rpoH::kan$ (JMH1025) *rpoS::tet* (JMH0039) derivatives (Mogk et al. 2001; Corona-Izquierdo and Membrillo-Hernández 2002) were used. Strain JMH1872 (MC4100 bearing the plasmid pAJW5) over expresses the *groELS*, *dnaKJ* and *grpE* operons from pBAD promoters (the plasmid pAJW5 was a kind gift from Peter Lund, University of Birmingham, UK). Cultures were grown

in Minimal Medium (MM) prepared as previously described (Membrillo-Hernández and Lin 1999) containing 0.2% glucose, thiamine (2 $\mu\text{g/ml}$) and all amino acids (20 $\mu\text{g/ml}$) but methionine. Culture optical density at 600 nm (OD_{600}) was determined in an Amersham Ultrospec 3100 pro (Piscataway, NJ, USA). Aerobic cultures were grown at 30°C with shaking (200 rpm) in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 10 ml of medium. Similar cultures were used for anaerobic conditions but supplemented with 40 mM sodium nitrate, and grown inside an anaerobic Plas Labs chamber using a mixture of 85% N_2 , 10% H_2 , and 5% CO_2 . Anoxic conditions were verified using a Clark electrode (Yellow springs) and BBL (Sparks, MD) anaerobic indicator strips. Antibiotics, purchased from Sigma, were added when appropriate at the following concentrations: ampicillin, 200 $\mu\text{g/ml}$; tetracycline 25 $\mu\text{g/ml}$; streptomycin 200 $\mu\text{g/ml}$; and kanamycin, 25 $\mu\text{g/ml}$.

Protein labelling, stress conditions and viable counts

Cells were grown at 30°C to exponential ($OD_{600} = 0.25$) or stationary ($OD_{600} = 1.7$) phase of growth (Fig. 1). The cultures were then exposed to 47°C heat or treated with 4 mM H_2O_2 . For heat shock labelling kinetics experiments, 1 ml aliquots were harvested at the times indicated in Figs. 4, 5 and transferred to pre-warmed 1.5 ml eppendorf tubes containing 25 μCi of L - $[^{35}\text{S}]$ methionine, incubation was continued for the specific time of labelling and then 40 μl of stop mix (cold L -methionine 800 $\mu\text{g/ml}$; chloramphenicol 40 $\mu\text{g/ml}$) were added to the cultures. Cells were centrifuged, suspended in 20 μl of sample buffer (Laemmli 1970), boiled for 2 min and subjected to SDS-PAGE (Sambrook et al. 1989). Slab gels consisted of a 5% acrylamide stacking gel and a 9% acrylamide separating gel. The gels were stained, destained, dried, and exposed to Kodak X-ray films for 2 to 3 h. In all cases equal amounts of protein were loaded into the gel.

For viable counts analyses, 100 μl aliquots were collected at the times indicated in Figs. 2, 3 and serial dilutions carried out in 10 mM $MgSO_4$, 4 μl of every dilution was dropped on to LB plates (Miller 1972). Every experiment was repeated at least three times; as the variation was less than 20%, a typical experiment is shown.

Immunodetection of oxidized proteins

As described previously (Levine et al. 1981; Echave et al. 2002), cell pellets were obtained from cultures of

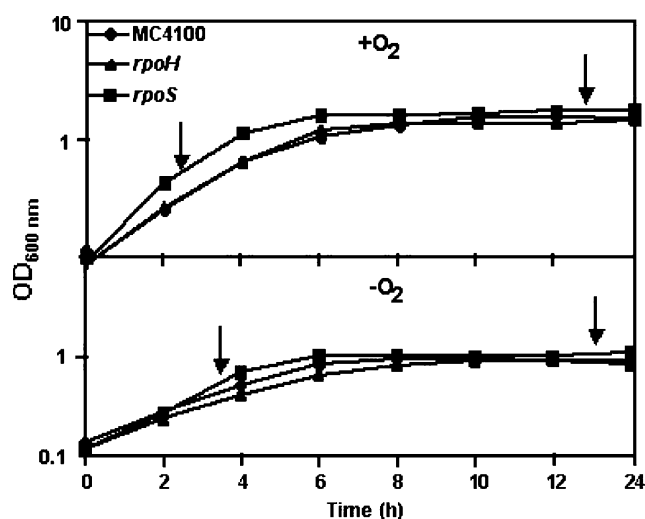


Fig. 1 Growth kinetics of different *E. coli* strains. MC4100 (circles) and its *rpoH* (triangles) and *rpoS* (squares) derivatives were grown in minimal medium under aerobic (top panel; +O₂) or anaerobic (bottom panel; -O₂) conditions. Arrows indicate the point in the growth curve where samples were harvested for further experiments

every condition tested, then, cells were disrupted using buffer SRX3 (5% SDS, 1 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 8.0) and then treated with the carbonyl

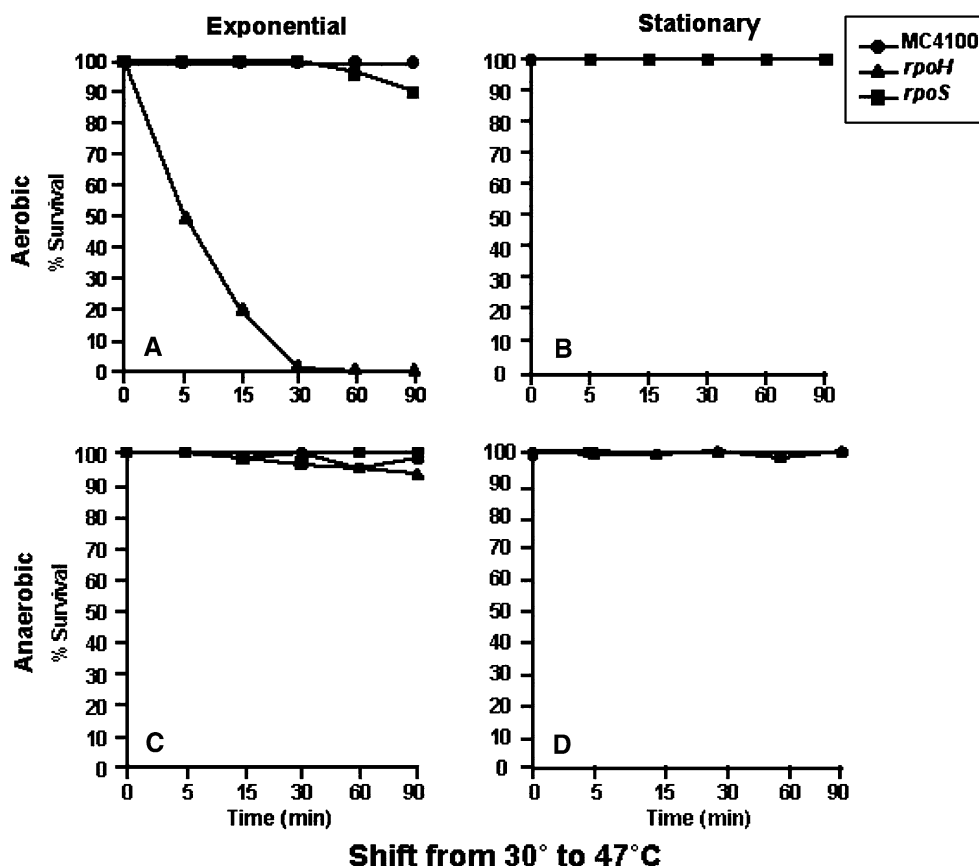
reagent 2,4-dinitrophenylhydrazine and subjected to SDS-PAGE (Sambrook et al. 1989). Oxidatively modified proteins were detected by Western blot analysis using anti-2,4-dinitrophenylhydrazine antibodies (Oxyblot kit; Intergen) and the ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Buckinghamshire, England).

Results

Growth kinetics of MC4100 and mutant derivative strains under aerobic or anaerobic conditions

The growth rates of the wild-type MC4100 and its derivative *rpoS*::tet and *rpoH*::kan mutant strains grown in MM under aerobic or anaerobic conditions at 30°C was examined. It is important to note that as is the case for other *rpoH* mutant strains, JMH1025 showed a heat-sensitive phenotype (impairment of growth at 37°C or above) and also a *groE^c* mutation was observed (Mogk et al. 2001; data not shown). Both mutations were checked by Southern blot hybridisation (Corona-Izquierdo and Membrillo-Hernández 2002 and data not shown). No significant

Fig. 2 Cell viability of different *E. coli* strains under heat stress in aerobic or anaerobic growth conditions. Cultures of MC4100 (circles) and its *rpoH* (triangles) and *rpoS* (squares) derivatives were subjected to a temperature shift from 30°C to 47°C in exponential (left) or stationary (right) phase of growth under aerobic (a and b) or anaerobic (c and d) conditions. After the indicated time intervals, samples were harvested, serially diluted and plated on solid medium to determine the percentage of survival. Each experiment was carried out in triplicate and at least three independent experiments were done. A typical experiment is shown



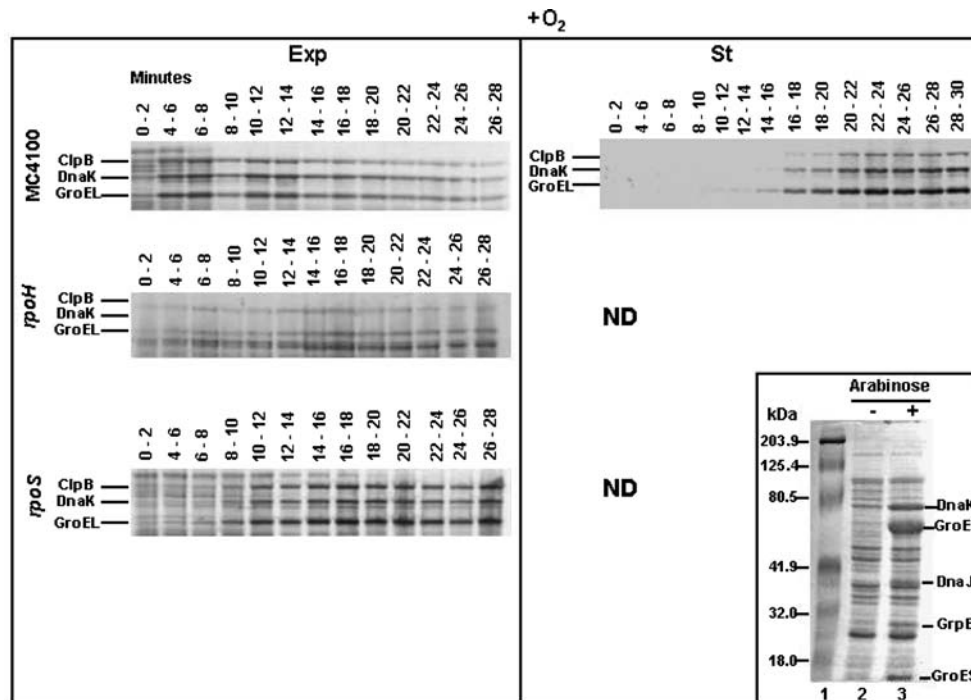


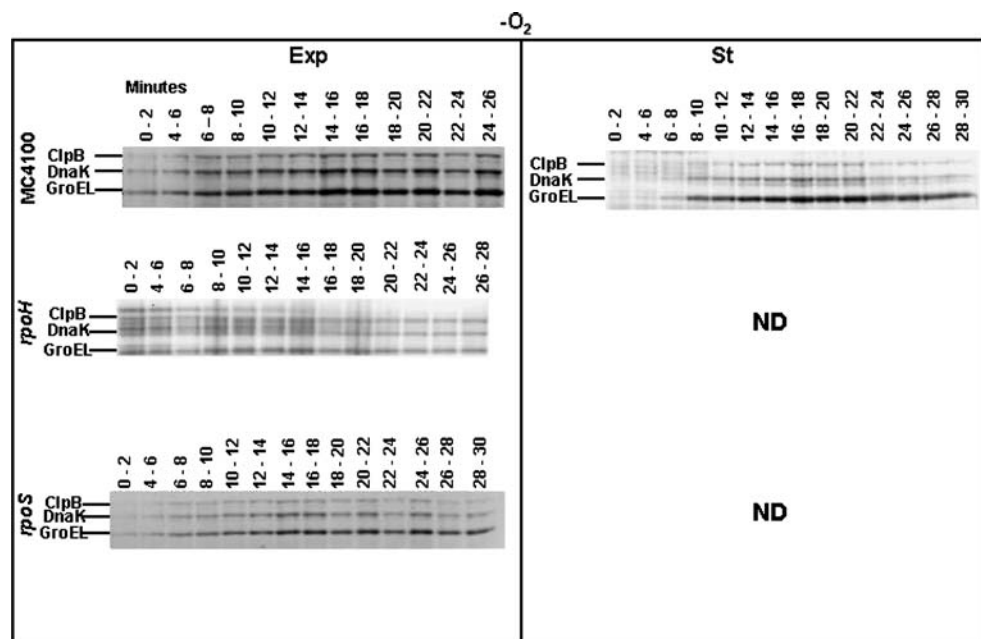
Fig. 3 Kinetics of protein synthesis after an abrupt up shift in temperature under aerobic conditions. Cells of wild-type (MC4100) and its derivative *rpoH* and *rpoS* mutant strains growing exponentially (*Exp*) or stationary (*St*) at 30°C (see Fig. 1) in MM were subjected to 47°C. A pulse of 25 μCi of L-[^{35}S] methionine was added to the culture and chased at the indicated time intervals (top of every lane) with cold methionine

and 40 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol. Here we show only the top of the autoradiograph of a 9% SDS-PAGE displaying L-[^{35}S] methionine-labelled proteins. *ND* not detectable. **Inset** 9% SDS-PAGE of a culture of strain JMH1872 in the absence (lane 2) or presence (lane 3) of 0.2 % arabinose. Proteins GroEL, GroES, DnaK, DnaJ and GrpE are indicated. Molecular weight markers are shown in lane 1

growth defects were observed at 30°C under aerobic (growth rates: MC4100 = 0.37 h^{-1} ; JMH025 = 0.43 h^{-1} ; JMH039 = 0.40 h^{-1}) or anaerobic (growth rates:

MC4100 = 0.75 h^{-1} ; JMH025 = 0.89 h^{-1} ; JMH039 = 0.82 h^{-1}) conditions (Fig. 1); Importantly, *rpoS rpoH* double mutants are severely affected in growth rate

Fig. 4 Kinetics of protein synthesis after an abrupt up shift in temperature under anaerobic conditions. Cells of wild-type (MC4100) and its derivative *rpoH* and *rpoS* mutant strains growing exponentially (*Exp*) or stationary (*St*) at 30°C (see Fig. 1) in MM were subjected to 47°C. A pulse of 25 μCi of L-[^{35}S] methionine was added to the culture and chased at the indicated time intervals (top of every lane) with cold methionine and 40 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol. Here we show only the top of the autoradiograph of a 9% SDS-PAGE displaying L-[^{35}S] methionine-labelled proteins. *ND* not detectable



(Marqués et al. 1999) therefore, as the results obtained with this strain may be misleading, we decided to concentrate on both the single mutants (Fig. 1).

Sensitivity to heat shock of different mutant strains under aerobic or anaerobic conditions in exponential or stationary phase of growth

Sigma factors interact with RNA polymerase to initiate transcription. When *E. coli* cultures growing aerobically in exponential phase are subjected to a heat shock, the housekeeping sigma factor σ^{70} is replaced by σ^{32} hence directing transcription to selected promoters (Gruber and Gross 2003). However, little information has been provided on stationary phase growing cultures where the alternative sigma factor σ^s is the main transcriptional regulator (Hengge-Aronis 2002) and a higher concentration of σ^{32} is present (Jenkins et al. 1991). We, therefore compared the effects of an *rpoH* or an *rpoS* mutation on the resistance of *E. coli* to heat stress at two points of the growth curve (indicated by the arrows in Fig. 1) by analysing the decrease in cell viability of different cultures. As shown in Fig. 2, an abrupt up shift from 30 to 47°C under aerobic conditions did not decrease the viability of a MC4100 culture regardless of the growth phase tested (Fig. 2a, b, circles). By contrast, an exponentially growing culture of the *rpoH* strain was severely affected in cell viability when shifted to 47°C in the presence of oxygen (20% of survival after 15 min of treatment; Fig. 2a, triangles); Interestingly, no detectable decline in viability was observed in cultures of the same strain challenged in stationary phase of growth (Fig. 2b, triangles). Finally, a culture of an *rpoS* strain displayed a similar pattern of cell viability under the conditions tested to that of the wild-type strain (Fig. 2a, b, squares). These results are in line with previous observations reported by Hengge-Aronis (2000), describing a higher resistance of wild-type stationary phase aerobic cultures to general stress conditions. However, our results add a new piece of information: σ^{32} is dispensable for the mechanisms of resistance (at least for heat stress).

Under anaerobic growth culture conditions, the MC4100 and the *rpoS* strains did not show any significant difference to their aerobic sensitivities to 47°C (Fig. 2c, circles and squares). Remarkably, in the absence of oxygen, an *rpoH* strain showed an increased resistance to 47°C in exponential phase of growth (Fig. 2c, triangles) compared to that displayed in aerobic conditions (compare Fig. 2a, c triangles). In stationary phase of the anaerobic growth, the three strains showed around 100% survival after the heat treatment (Fig. 2d). Taken together, these results suggest that, in

anaerobic growth conditions, as shown above for aerobic stationary phase cultures, σ^{32} -independent mechanisms may be playing a prime role in cell protection to heat stress.

Heat shock response of wild-type and *rpoS* or *rpoH* derivative strains under aerobic or anaerobic conditions

In the light of our results, we wondered if under stationary phase of growth or under anaerobic conditions, a similar heat-shock response (synthesis of Hsp) to that reported for aerobically exponentially growing cells was present. Therefore we carried out L-[³⁵S] methionine-labelling protein synthesis kinetics studies of the wild-type and its *rpoH* and *rpoS* derivative strains in different growth conditions (Fig. 3). For the identification of Hsp we used the strain JMH1872 bearing the plasmid pAJW5 that carries the *dnaKJ*, *groELS* and *grpE* operons under the regulation of pBAD promoters (Materials and methods and inset Fig. 3). ClpB was identified by immunological detection (data not shown) and previous SDS-PAGE (Lee-Rivera and Gómez-Eichelmann 1994). For clarity, only the top of the gel (above 60 kDa) is shown in the kinetics experiments.

In the presence of oxygen, exponentially growing MC4100 cells showed an abrupt increase of Hsp synthesis after 2 to 4 min after the change in temperature, having a maximum at 10 to 12 min, after which a sharp decrease in the Hsp synthesis was observed (Fig. 3; left top panel) this is consistent with previous results (Neidhardt et al. 1984). As expected, an *rpoH* strain did not present any induction of Hsp (Fig. 3; left middle panel), also in good agreement with previous reports (Neidhardt et al. 1984). By contrast, an *rpoS* strain displayed a clear delay in the initiation of Hsp synthesis, starting after 8 min of treatment with a peak of induction at 16 min of incubation (Fig. 3; left bottom panel). On the other hand, Hsp synthesis in aerobic cultures growing in stationary phase was only observed in wild type cells after a long delay (starting after 16 min of incubation at 47°C), this synthesis was sustained after 30 min of treatment (Fig. 3 right panel).

By contrast, in the absence of oxygen, exponentially growing MC4100 cells, showed an immediate increase in Hsp synthesis (0–2 min after the up shift in temperature), having a maximum of synthesis at 10 to 12 min and the intensity of synthesis was sustained for at least 30 min (Fig. 4; left top panel). An *rpoH* strain did not show any induction of synthesis of Hsp (Fig. 4; left middle panel) and finally, an *rpoS* strain, in contrast to that observed in aerobiosis, showed an

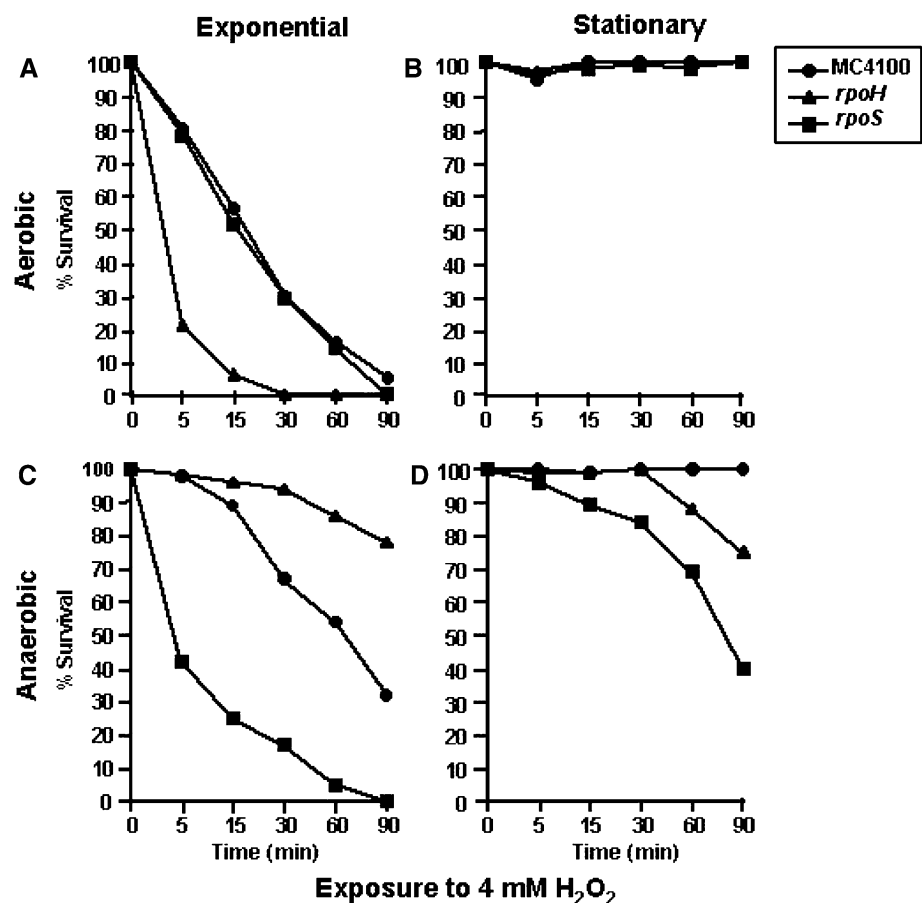
immediate synthesis of Hsp (starting after 0–2 min of incubation at 47°C); this synthesis was sustained at least for 30 min. Interestingly, the synthesis of the Hsp was not of the same extent in this case. In stationary phase cultures, only the wild-type strain showed proteins radioactively labelled after the shift in temperature, in this case the synthesis started only after 10–12 min of incubation at 47°C and it was clearly sustained even after 30 min of treatment (Fig. 4; top right panel). Taken together, these results suggest that under anaerobic conditions, the synthesis of Hsp is triggered faster and is sustained for a longer period of time.

Sensitivity of different mutant strains to oxidative stress under aerobic or anaerobic conditions in exponential or stationary phase of growth

In order to expand our knowledge of the link between oxidative and heat stresses, we checked the viability of cultures of MC4100 and its derivative *rpoH* or *rpoS* mutant strains after the addition of 4 mM H₂O₂ (Fig. 5). In the presence of oxygen, exponentially growing cultures of strain MC4100 lost 70% of cell

viability after 30 min of exposure to oxidative stress and by contrast, no detectable loss in cell viability was observed in stationary phase cultures (Fig. 5a, b; circles). On the other hand, exponentially growing cultures of an *rpoH* strain were significantly more sensitive to oxidative stress than its wild type counterpart (95% lost in cell viability after 15 min of exposure to oxidative stress; Fig. 5a; triangles). Very interestingly, this sensitivity was overcome in stationary phase cultures (Fig. 5b; triangles). Finally, the pattern of sensitivity of an *rpoS* strain was similar to that of a wild type strain (Fig. 5a, b; squares). In order to check the pattern of resistance under anaerobic conditions, we performed a similar experiment but in the absence of oxygen (Fig. 5c, d). Cultures of the wild type strain were sensitive to H₂O₂ under exponential phase of growth when compared to those growing in stationary phase (Fig. 5c, d; circles) but in both cases they were more resistant than in the presence of oxygen (compare Fig. 5c, a, circles). Notably, the *rpoH* derivative strain displayed an increase in viability after the oxidative stress under exponential phase when compared to cultures of the same growth phase in aerobic conditions (compare Fig. 5c, a, triangles).

Fig. 5 Cell viability of different *E. coli* strains under oxidative stress in aerobic or anaerobic growth conditions. Cultures of MC4100 (circles) and its *rpoH* (triangles) and *rpoS* (squares) derivatives were treated with 4 mM H₂O₂ in exponential (left) or stationary (right) phase of growth under aerobic (a and b) or anaerobic (c and d) conditions. After the indicated time intervals, samples were harvested, serially diluted and plated on solid medium to determine the percentage of survival. Each experiment was carried out in triplicate and at least three independent experiments were done. A typical experiment is shown



Finally, exponentially growing cultures of an *rpoS* mutant strain showed the highest sensitivity to hydrogen peroxide (75% of lost in cell viability after 15 min of treatment; Fig. 5c, squares). This sensitivity was only partially restored in cultures growing in stationary phase (Fig. 5d, squares).

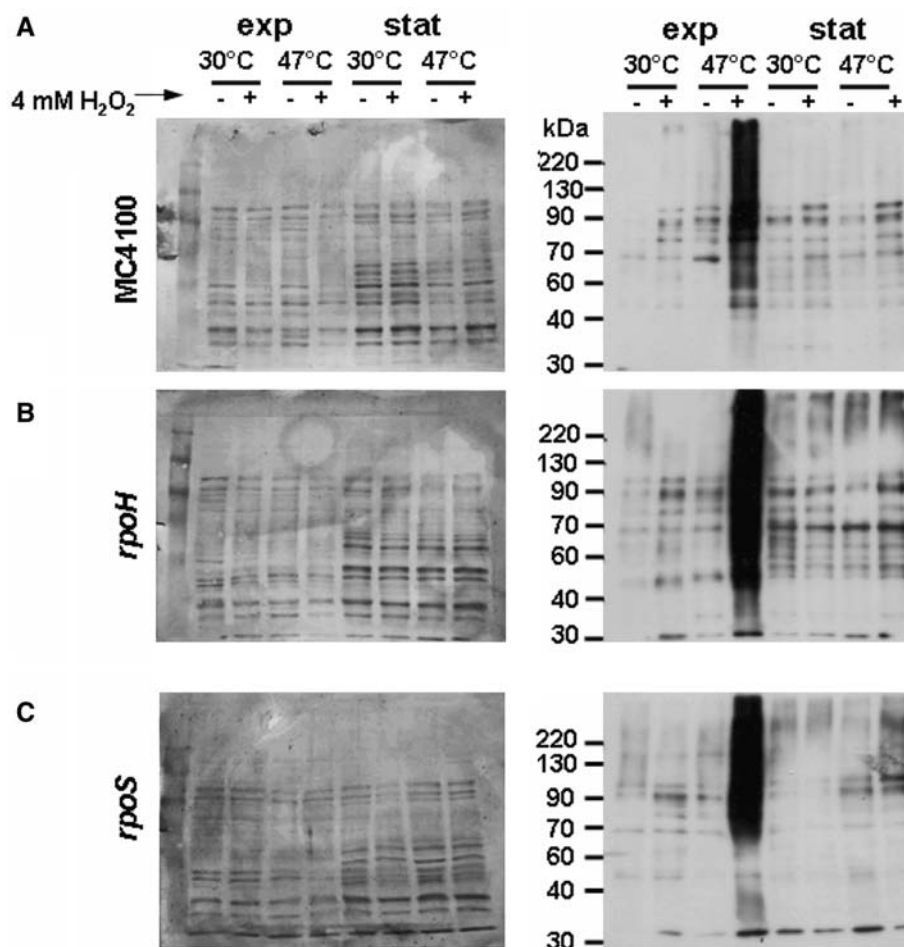
Immunodetection of oxidized proteins of wild type and mutant strains under oxidative stress conditions under different growth phases

To further expand our knowledge on the effect of a mutation in *rpoH*, encoding the master regulator of the heat shock response, or in *rpoS*, encoding the master regulator of the stationary phase, we determined the pattern of protein carbonylation in cultures of these strains treated with 4 mM H₂O₂ for 1 h. Protein carbonylation in specific amino acids is one of the irreversible modifications caused by oxidative stress (Levine et al. 1981; Tamarit et al. 1998). As shown in Fig. 6a, the presence of carbonylated proteins detected by Western blot was evident in exponentially growing

cultures treated at 30°C with H₂O₂. Importantly, the highest amounts of carbonylated proteins were observed in exponentially growing cultures subjected to heat-shock (47°C) in the presence of 4 mM H₂O₂. By contrast, stationary phase cultures did not present high amounts of carbonylated proteins neither at 30°C nor at 47°C (Fig. 6a). It is important to note that the Western blot signal of carbonylated proteins of the exponentially growing cultures subjected to heat shock in the presence of H₂O₂ was so high that we had to drastically decrease the amounts of protein per lane in order to have distinguishable bands (1 µg; see the Coomassie stained membranes in Fig. 6).

Interestingly, when we checked the protein carbonylation patterns of H₂O₂-treated cultures of an *rpoH* strain growing in exponential or stationary phase, the appearance of new targets of carbonylation and an increase in the intensity of some of the bands were clearly evident (Fig. 6b). As in Fig. 6a, the highest amounts of carbonylated proteins were observed in exponentially growing cultures subjected to heat-shock (47°C) in the presence of 4 mM H₂O₂, again indicating

Fig. 6 Protein carbonylation pattern of different cultures growing in exponential or stationary phase in the presence or absence of H₂O₂. Exponentially (*Exp*) or Stationary (*Stat*) growing cultures (see Fig. 1) of the wild type strain (**a**), and its *rpoH* (**b**) and *rpoS* (**c**) derivatives were grown at 30°C. Where indicated, cultures were shifted to 47°C. The cultures were split in two, one was left untreated (-) and the other was treated with 4 mM H₂O₂ for 1 h. Cells were lysed and derivatization of cell extracts was performed with 2,4-DNP (see [Materials and methods](#)) and subjected to a 9% SDS-PAGE. Panels on the left show the Coomassie stained membranes as a loading control. Panels on the right are autoradiographs of Western blot analyses using an anti-DNP antibody. Molecular weight markers (in kDa) are shown



that this process is independent of σ^{32} . By contrast, despite the fact that untreated stationary phase cultures of the *rpoH* strain showed higher amounts of carbonylated proteins than their exponential phase counterparts, there was no increase in carbonylation when these cultures were exposed to 4 mM H_2O_2 neither at 30°C nor at 47°C (Fig. 6b).

On the other hand, untreated cultures of an *rpoS* mutant strain did not show higher amounts of carbonylated proteins, and the pattern of protein carbonylation in the presence of hydrogen peroxide was similar to that of the wild type strain in either phase of growth, again showing highest oxidative damage in heated cells. Taken together, these results indicate that cells in heat shock are more prone to protein oxidation and that *rpoH* is necessary to keep a low level of basal protein carbonylation.

Discussion

In *E. coli*, σ^D (encoded by *rpoD*) is the sigma factor responsible for the expression of most housekeeping genes required for normal cellular metabolism during exponential growth. In response to environmental stresses, *E. coli* can utilize alternative sigma factors to redirect RNA polymerase and selectively express discrete subsets of genes. When cells are exposed to high temperatures, heat shock proteins are induced (Neidhardt et al. 1984; Straus et al. 1987). This induction is regulated at the level of transcription depending on the alternative sigma factor σ^{32} (also known as σ^H) encoded by the *rpoH* gene. On the other hand, when cells are deprived of nutrients in stationary phase of growth or subjected to osmotic shock, a specific subset of genes is induced, and this regulation is under the control of σ^{38} (also known as σ^S), encoded by the *rpoS* gene (Hengge-Aronis 2002). Then, a mechanism based on the competition for the RNA polymerase was proposed to explain its preference for a specific subset of genes in *E. coli* (Jishage and Ishihama 1995). Interestingly, the heat shock response had been only studied under exponential phase of growth where the RNA polymerase can preferentially find σ^D or σ^H . To our knowledge, this is the first report studying a condition where σ^S and σ^H are the principal sigma factors. It is important to note that under the conditions here tested (stationary phase), a significant amount of σ^D is still present in the cell (Jishage and Ishihama 1995). Additionally, a recent report suggesting that σ^S has divergent roles under aerobic and anaerobic conditions (King and Ferenci 2005) led us to expand our studies on heat-shock response performing experiments in the absence of oxygen.

In stationary phase of growth, the delay in the synthesis of Hsp may be due to the slow metabolism or the low ATP pools present under these conditions; interestingly enough, under anaerobic conditions, this delay is shorter but apparently, the *groE* operon is preferentially transcribed compared to that of other proteins such as DnaK or ClpB (Figs. 3, 5). We have no explanation for this observation but the differential synthesis of Hsp has been observed earlier in cultures treated with H_2O_2 or CdCl_2 (VanBogelen et al. 1989), nevertheless we cannot rule out a differential kinetics of proteolysis. It is interesting to note that neither cultures of *rpoH* nor *rpoS* mutants exhibited a protein labelling after heat shock in stationary phase of growth, we speculate that a critical mechanism for protein synthesis may be affected in these mutants, such is the case of the RelA/SpoT system as previously reported (Williams et al. 1994). Two observations from our kinetics experiments are highly relevant: (1) In the absence of oxygen, the synthesis of Hsp apparently is sustained for a long period of time in contrast to aerobic growth conditions (Fig. 4). (2) In the absence of oxygen, *E. coli* triggers the synthesis of Hsp faster than in aerobic conditions. These results become relevant if we assume that the natural habitat of *E. coli* is the human gut where anoxic conditions are present. Interestingly, Mizushima et al. (1994), reported that DnaK and GroEL are synthesized continuously in anaerobically growing cells and proposed that the mechanism of induction of Hsp was through the relaxation of chromosomal DNA, this probable explanation is significant as it has been suggested that a change in the topological properties of DNA is caused by an abrupt up shift in temperature (Camacho-Carranza et al. 1995) but also by stationary phase of growth (Reyes-Domínguez et al. 2003). More experiments are necessary to determine the role of DNA supercoiling in the heat shock response but it is noteworthy that one of the *rpoH* promoters is indeed affected by novobiocin, a potent inhibitor of DNA gyrase (López-Sánchez et al. 1997).

Our results confirmed that *rpoH* mutant strains were highly sensitive to an abrupt up shift in temperature, however, this sensitivity was completely cancelled in stationary phase of growth or by the absence of oxygen (Fig. 2a, b). This may be explained by the fact that it has been widely known that stationary phase cultures are more resistant to environmental stresses (Kolter et al. 1993), but we still cannot explain why, under anaerobic conditions, an *rpoH* mutant is heat resistant, clearly, σ^{32} -independent mechanisms are playing a critical role in this growth condition. The elucidation of these mechanisms will open a new field of research in the

microbial stress responses. Lack of σ^S did not change the cell viability to heat shock at 47°C neither in exponential nor in stationary phase suggesting that this sigma factor is not involved in the mechanisms of resistance to this kind of stress (Fig. 2). Probably protective molecules, such as trehalose are playing a role in this process (Kolter et al. 1993). Our studies on oxidative stress showed that σ^S as well as σ^H are involved in maintaining cell viability (Fig. 5). Consistent with previous reports (Kolter et al. 1993), aerobically growing cultures of the wild type strain in stationary phase were more resistant to oxidative stress, but to our surprise, an *rpoS* or an *rpoH* mutant was not more sensitive to H₂O₂ suggesting that additional mechanisms of protection are involved in the preservation of cell viability under this culture condition. Noteworthy Bang et al. (2005), have recently proposed that σ^H may promote antioxidant defences, which may well explain why an *rpoH* mutant is extremely sensitive in exponential phase of growth (Fig. 5). In the absence of oxygen, the viability of an *rpoS* strain was dramatically affected by the treatment with hydrogen peroxide, this was true for both exponentially or stationary phases of growth, suggesting that σ^S is part of the oxidative stress response under anaerobic growth conditions. Finally, the high levels of protein carbonylation observed in heated cells growing exponentially may explain previous observations on the oxygen sensitivity of heated cells of *E. coli* O157:H7 (Bromberg et al. 1998). It is notable that stationary phase cultures treated with hydrogen peroxide do not present a strong pattern of carbonylation, either at 30°C or at 47°C (Fig. 6), again implying the action of additional mechanisms involved in the protection from oxidative damage in stationary phase of growth. Interestingly, an untreated culture of the *rpoH* mutant strain displayed higher levels of protein carbonylation, this is consistent with recent reports from our lab and others, suggesting that chaperones may function as molecular shields protecting proteins from oxidative damage (Echave et al. 2002; Nyström 2005; Fredriksson et al. 2006). In this line, new carbonylation targets are evident in the *rpoH* strain even in the absence of H₂O₂ (Fig. 6b), specifically a group of bands of low molecular weight, the identification of these proteins will help to elucidate the oxidative stress protection mechanisms and the role of σ^{32} in this process.

Acknowledgments This work was supported by grants 42580-Q from CONACYT (Mexico), and 207703 from PAPIIT-UNAM (Mexico). Technical assistance from Miguel Páez is greatly appreciated. We thank members of the Membrillo-Hernández lab for helpful advises and Peter Lund for plasmid pAJW5. This paper is the manuscript #1 of the multi-group project on oxidative stress of the Biomedical Research Institute (UNAM).

References

- Arsene F, Tomoyasu T, Bukau B (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. Intl J Food Microbiol 55:3–9
- Bang IS, Frye JG, McClelland M, Velayudhan J, Fang FC (2005) Alternative sigma factor interactions in *Salmonella*: σ^E and σ^H promote antioxidant defences by enhancing σ^S levels. Mol Microbiol 56:811–823
- Benov L, Fridovich I (1995) Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. J Bacteriol 177:3344–3346
- Bromberg R, George SM, Peck MW (1998) Oxygen sensitivity of heated cells of *Escherichia coli* O157:H7. J Appl Microbiol 85:231–237
- Camacho-Carranza R, Membrillo-Hernández J, Ramírez-Santos J, Castro-Dorantes J, Chagoya de Sánchez V, Gómez-Eichelmann MC (1995) Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 177:3619–3622
- Connolly L, Yura T, Gross CA (1999) Autoregulation of the heat shock response in prokaryotes. In: Bukau B (ed) Molecular Chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanism. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 13–33
- Corona-Izquierdo FP, Membrillo-Hernández J (2002) A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. FEMS Microbiol Lett 211:105–110
- Delaney JM (1990) Requirement of the *Escherichia coli* *dnaK* gene for thermotolerance and protection against H₂O₂. Microbiology 136:2113–2118
- Echave P, Esparza-Cerón MA, Cabisco E, Tamarit J, Ros J, Membrillo-Hernández J, Lin ECC (2002) DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 99:4626–4631
- Fredriksson A, Ballesteros M, Dukan S, Nyström T (2006) Induction of the heat shock regulon in response to increased mistranslation requires oxidative modification of the malformed proteins. Mol Microbiol 59:350–359
- Groat RG, Schultz JE, Zychlinsky E, Bockman A, Matin A (1986) Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. J Bacteriol 168:486–493
- Gruber TM, Gross CA (2003) Multiple σ subunits and the partitioning of bacterial transcription space. Annu Rev Microbiol 57:441–466
- Guerra E, Chye PP, Berardi E, Piper PW (2005) Hypoxia abolishes transience of the heat-shock response in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Microbiology 151:805–811
- Guisbert E, Herman C, Lu CZ, Gross CA (2004) A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. Genes Dev 18:2812–2821
- Hengge-Aronis R (2000) The general stress response in *Escherichia coli*. In: Storz G, Hengge-Aronis (eds) Bacterial stress responses. ASM Press, Washington
- Hengge-Aronis R (2002) Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? Curr Opin Microbiol 5:591–595
- Jakob U, Muse W, Eser M, Bardwell JC (1999) Chaperone activity with a redox switch. Cell 96:341–352
- Jenkins DE, Schultz JE, Matin A (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. J Bacteriol 170:3910–3914

- Jenkins DE, Auger EA, Matin A (1991) Role of RpoH, a heat shock regulator protein in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J Bacteriol* 173:1992–1996
- Jishage M, Ishihama A (1995) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of σ^{70} and σ^{38} . *J Bacteriol* 177:6832–6835
- King T, Ferenci T (2005) Divergent roles of RpoS in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol Lett* 244:323–327
- Kolter R, Siegele DA, Tormo A (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47:855–874
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lange R, Hengge-Aronis R (1991) Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* 173:4474–4481
- Lee-Rivera I, Gómez-Eichelmann MC (1994) *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol Lett* 121:35–38
- Levine RL, Oliver CN, Fulks RM, Stadtman ER (1981) Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2120–2124
- Loewen PC, Hengge-Aronis R (1994) The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* 48:53–80
- López-Sánchez F, Ramírez-Santos J, Gómez-Eichelmann MC (1997) In vivo effect of DNA relaxation on the transcription of gene *rpoH* in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1353:79–83
- Marqués S, Manzanera M, González-Pérez MM, Gallegos MT, Ramos JL (1999) The XylS-dependent Pm promoter is transcribed In vivo by RNA polymerase with σ^{32} or σ^{38} depending on the growth phase. *Mol Microbiol* 31:1105–1113
- Membrillo-Hernández J, Echave P, Cabisco E, Tamarit J, Ros J, Lin ECC (2000) Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem* 275:33869–33875
- Membrillo-Hernández J, Lin ECC (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
- Miller JH (1972) In: Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY, USA
- Mizushima T, Ohtsuka Y, Miki T, 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
- Mogk A, Bukau B, Deuerling E (2001) Cellular functions of cytosolic *Escherichia coli* chaperones. In: Lund P (ed) *Molecular Chaperones in the cell*. Oxford University Press, Oxford
- Morimoto RI, Kline MP, Blimston DN, Cotto JJ (1997) The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 32:17–29
- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (1999a) Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol* 181:401–410
- Morita M, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999b) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13:655–665
- Neidhardt FC, VanBogelen RA, Vaughn V (1984) The genetics and regulation of the heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 18:295–329
- Nollen EA, Morimoto RI (2002) Chaperoning signalling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci* 115:2809–2816
- Nyström T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24:1311–1317
- Reyes-Domínguez Y, Contreras-Ferrat G, Ramírez-Santos J, Membrillo-Hernández J, Gómez-Eichelmann MC (2003) Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J Bacteriol* 185:1097–1100
- Rockabrand D, Arthur T, Korinek G, Livers K, 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
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Straus DB, Walter WA, Gross CA (1987) The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329:348–351
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J (1998) Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem* 273:3027–3032
- VanBogelen RA, Acton MA, Neidhardt FC (1989) Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1:525–531
- Williams MD, Ouyang TX, Flickinger MC (1994) Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol Microbiol* 11:1029–1043
- Winter J, Linke K, Jatzek A, Jakob U (2005) Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* 17:381–392

3.2 RESULTADOS ADICIONALES NO PUBLICADOS

Un segundo objetivo en nuestro estudio del estrés en *Escherichia coli* fue la identificación de proteínas que participaran en la protección contra el daño proteico por oxidación. El antecedente directo de esta parte del proyecto de investigación es la protección que ejerce DnaK hacia la actividad aeróbica de la enzima fermentativa AdhE en *Escherichia coli* como se explicó anteriormente en la introducción (Echave, *et al.*, 2002).

Analizando el mecanismo molecular de acción de DnaK encontramos que regularmente actúa en conjunto con otras chaperonas y proteínas, por lo que proponemos que la protección de AdhE pudiera ser resultado de un mecanismo de acción entre DnaK y otra u otras proteínas. Con la finalidad de probar esta hipótesis se realizó una mutagénesis al azar con el transposón miniTn10dKan en la cepa JE52 (AdhE^{A267T Q568K}, que crece en etanol) y se seleccionaron mutantes perdieran su capacidad de crecer en etanol y que no presentaran ninguna auxotrofia. Se analizaron 12,000 mutantes y se escogieron dos que presentaban dicho fenotipo. Las mutaciones fueron retrotransducidas utilizando el bacteriófago P1_{vir} a la cepa JE52 para corroborar que la mutación estuviera ligada al transposón. Estas transductantes (JMH0198 y JMH0199), por lo tanto, poseen una mutación, probablemente nula, en un gen cuyo producto es esencial en la actividad de AdhE en aerobiosis. El análisis del papel de las proteínas codificadas en los genes interrumpidos por el transposón podría describir un mecanismo de acción de las chaperonas moleculares en la protección de blancos específicos, como AdhE, ante estrés oxidativo.

Experimentos iniciales

Nuestro razonamiento inicial nos condujo a pensar que las mutaciones inducidas por la inserción del transposón en las mutantes JMH0198 y JMH0199 pudieran haber ocurrido en el gen *adhE* (en *cis*), o en trans en un gen que codifique para un factor transcripcional que afecta la expresión de *adhE*. Paralelamente al mapeo físico del sitio de inserción del transposón

miniTn10dKan y para descartar estas posibilidades se realizaron los siguientes experimentos:

Mutaciones que afectan la funcionalidad del gen *adhE*

Una mutante que ya no pudiera crecer en etanol como única fuente de carbono y energía podría tener interrumpido el gen *adhE*. La mutación en este caso podría estar en *cis* (es decir, en el marco abierto de lectura de *adhE* o bien en su promotor) o en *trans* (posiblemente en un factor transcripcional o postranscripcional) a *adhE*.

Para determinar si la mutación afectaba al marco abierto de lectura de *adhE* en *cis* se realizaron tres tipos de análisis:

3.2.1. Análisis fisiológico: Crecimiento en medio mínimo glucosa en anaerobiosis

Una mutante en *adhE* no crece en medio mínimo suplementado con glucosa (0.2%) en anaerobiosis debido a la acumulación de poder reductor en forma de NADH (Clark, 1989). AdhE es esencial en el consumo de NADH en la fermentación de ácidos mixtos en *Escherichia coli*; por lo tanto, si el transposón se insertó en el gen *adhE* en las cepas JMH0198 o JMH0199, éstas no podrían crecer en medio mínimo suplementado con glucosa en condiciones anaeróbicas. Se probó la funcionalidad de la enzima AdhE estriando las cepas isogénicas MC4100 (cepa silvestre, control positivo), JE52 (cepa parental de las dos mutantes), mutantes JMH0198 y JMH0199 y una mutante nula en el gen *adhE* (control negativo) en dos cajas de medio mínimo glucosa 0.2% e incubando una en aerobiosis y la otra en anaerobiosis a 37°C por una noche. Se observó crecimiento de las dos mutantes JMH0198 y JMH0199 en condiciones anaeróbicas por lo que concluimos que ambas sintetizan una enzima AdhE funcional.

3.2.2. Análisis bioquímico: Medición de la actividad de AdhE en aerobiosis y anaerobiosis

Se midió espectrofotométricamente la actividad de la enzima AdhE determinada por la aparición de NADH (340 nm) en extractos crudos libres de células provenientes de cultivos aeróbicos y anaeróbicos en medio LB más glucosa 0.2% de las cepas MC4100 (silvestre, control positivo), JE52 (cepa parental de las dos mutantes, crece en etanol), mutantes JMH0198 y JMH0199. y una mutante nula en el gen *adhE* (control negativo). Los resultados se expresaron en unidades de AdhE/mg de proteína total para comparación. Se observó que las mutantes JMH0198 y JMH0199 presentan una actividad de etanol oxidoreductasa similar a su cepa parental JE52 en condiciones anaeróbicas pero una actividad baja o nula en aerobiosis (tabla 3).

Tabla 8. Actividades de etanol oxidoreductasa (Unidades de AdhE/mg proteína total).

Cepa	Actividad específica de etanol oxidoreductasa U AdhE/mg proteína total	
	-O ₂	+O ₂
MC4100	1.32 +/- 0.2	0.63 +/- 0.12
JE52	3.8 +/- 0.28	4.13 +/- 0.31
JMH0198	3.52 +/- 0.15	0.1 +/- 0.06
JMH0199	3.20 +/- 0.23	0.24 +/- 0.19
<i>adhE</i>	No detectable	No detectable

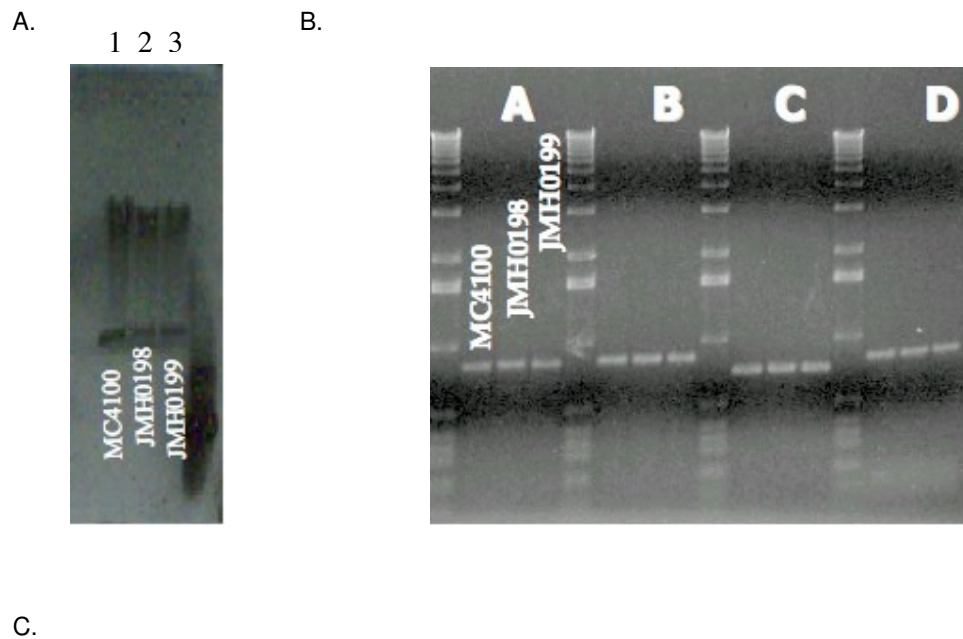
Número de experimentos independientes: 5

Al analizar la actividad de etanol oxidoreductasa propia y exclusiva en *Escherichia coli* de AdhE, encontramos resultados interesantes. La actividad registrada en la cepa silvestre en condiciones anaeróbicas, como se esperaba, resultó ser mayor que la proveniente de cultivos aeróbicos debido a la inducción transcripcional del gen *adhE*. En cambio en la cepa JE52, no hay una inducción comparable en magnitud a la observada en la cepa parental y la actividad basal en aerobiosis es aproximadamente 6 veces mayor que en la cepa parental. Se observó que las mutantes JMH0198 y JMH0199 presentan una actividad de etanol oxidoreductasa similar a su cepa parental JE52 en condiciones anaeróbicas pero una actividad baja o nula en aerobiosis. Este

dato nos indica que los genes mutados en las cepas JMH0198 y JMH0199 son esenciales para la protección de la actividad aeróbica de AdhE. El hecho que en anaerobiosis se detecte actividad similar a la de JE52, indica que probablemente el efecto de las mutantes sobre de AdhE^{A267T Q568K} es exclusivo de condiciones aeróbicas.

3.2.3. Análisis molecular: *Southern Blot* y amplificación por PCR del gen *adhE*

Por medio de análisis tipo *Southern Blot* con DNA cromosomal de las cepas JE52, mutantes JMH0198 y JMH0199 digerido con la enzima *Hind*III y utilizando como sonda un fragmento interno del gen *adhE* amplificado por PCR se encontró que en las cepas mutantes, el marco abierto de lectura del gen *adhE* no está interrumpido. Por otro lado, se corroboró la integridad de *adhE* amplificando por PCR diferentes segmentos del gen. Observamos en ambas mutantes amplificados del mismo tamaño para cada fragmento, comparados a los obtenidos a partir de DNA cromosomal de la cepa parental (MC4100, control silvestre). Estos resultados representan evidencia molecular de la integridad del gen *adhE* en las mutantes estudiadas (figura 1).



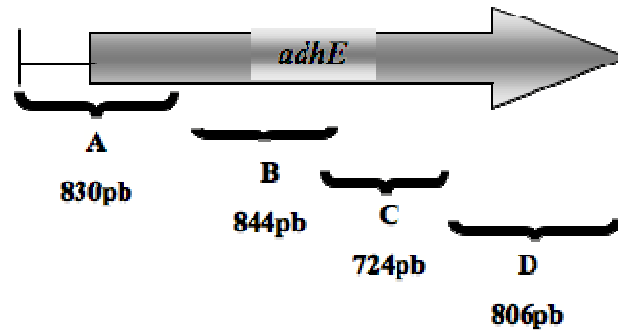


Figura 1A. Southern Blot con DNA cromosomal de cepas MC4100 (carril 1) y mutantes JMH0198 (carril 2) y JMH0199 (carril 3) utilizando como sonda el producto de PCR de una parte interna del gen *adhE*. Se observa hibridación en las 3 cepas en un fragmento del mismo tamaño, lo que indica que el gen interrumpido por el transposón en las mutantes JMH0198 y JMH0199 no es *adhE*. **B. PCR en fragmentos del marco abierto de lectura y promotor del gen *adhE*.** Se amplificó por fragmentos sobrelapados, la totalidad del gen *adhE* con DNA de la cepa silvestre MC4100 y de las mutantes JMH0198 y JMH0199. Se observan productos de PCR del mismo tamaño en cada caso, lo cual corrobora que el transposón no se insertó en el marco abierto de lectura de *adhE* (ver diagrama C).

3.2.4. Actividad de β -galactosidasa de una fusión transcripcional $\Phi(adhE'$ -*lacZ*)

Si la mutación hubiera ocurrido en un factor transcripcional positivo de *adhE*, se observaría un abatimiento en la actividad transcripcional del gen *adhE* y la consecuente disminución en la cantidad de la proteína AdhE. Por este motivo analizamos la actividad transcripcional del gen *adhE*, midiendo la actividad de β -galactosidasa de una fusión $\Phi(adhE'$ -*lacZ*). Este ensayo se llevó a cabo con la finalidad de analizar cómo afectan las mutaciones que impiden que JE52 crezca en etanol a la transcripción del gen *adhE*. En una cepa con una fusión transcripcional $\Phi(adhE'$ -*lacZ*) se transdujeron las mutaciones presentes en las mutantes JMH0198 y JMH0199, generando las cepas JMH195 y JMH196 respectivamente. Se midió la actividad β -galactosidasa de cultivos aeróbicos y anaeróbicos de las dos mutantes y un control silvestre y se encontró, que en la cepa silvestre la transcripción de *adhE* aumenta en anaerobiosis con respecto a aerobiosis aproximadamente 11 veces. La

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mutante JMH0195 presenta un aumento de la actividad transcripcional aeróbica y anaeróbica, comparada a las respectivas en la cepa MC4100. De igual manera, las actividades transcripcionales en la cepa JMH0196 aumenta, aunque en menor proporción que en la cepa JMH0195, con respecto a las registradas en la cepa silvestre.

Tabla 9. Actividad de β -galactosidasa de una fusión transcripcional $\Phi(adhE'-lacZ)$ en las transductantes JMH0195 y JMH0196.

Cepa	Unidades Miller +O ₂	Unidades Miller -O ₂
MC4100 $\Phi(adhE'-lacZ)$	1,000 +/- 74	11,000 +/- 163
JMH0195 $\Phi(adhE'-lacZ)$	5,000 +/- 125	21,000 +/- 85
JMH0196 $\Phi(adhE'-lacZ)$	2,500 +/- 93	16,000 +/- 187

Número de experimentos independientes: 3

Contrario a lo que esperábamos, encontramos que la actividad transcripcional en las mutantes era mayor que en la cepa silvestre, tanto en aerobiosis como en anerobiosis. En la transductante JMH0195 (con la mutación de JMH0198), la actividad es 5 y 2 veces (en aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente) mayor que en la cepa parental, mientras que en la transductante JHM0196 (con la mutación de JMH0199), la actividad es 2.5 y 0.5 veces mayor que en la cepa parental. En su momento no se pudo proponer una razón para este resultado, pero posteriormente, cuando supimos que las mutaciones en JMH0198 y en JMH0199 son en *mdh* y *acnB*, respectivamente, pensamos que al mutar genes que producen proteínas de Ciclo de Krebs, la velocidad de éste disminuiría, y por lo tanto el balance NADH/NAD⁺ se vería afectado. Si la cantidad de NADH aumentara, la transcripción de *adhE* también incrementaría, como se ha reportado (Leonardo, et al 1996). Este efecto asume que existe un factor transcripcional positivo de *adhE* que censa la poza de NADH/NAD⁺. Aunque interesante en el estudio de la transcripción del gen *adhE*, la cual no ha sido descrita completamente, este resultado no nos indica

la razón de la inactivación de la proteína AdhE por oxidación, un proceso post-traducciona

3.2.5. Evaluación de una posible mutación en el gen *dnaK*

En la mutante JE52, que puede crecer en etanol, la actividad aeróbica de AdhE requiere la chaperona molecular DnaK (Echave *et al.*, 2002) por lo que una mutación en este gen podría ser la causa de la pérdida del fenotipo. Se sabe que *dnaK* es un gen esencial para el crecimiento a 42°C. Las mutantes JMH0198 y JMH0199 crecen a 42°C por lo que se descartó que este fuera el gen interrumpido por el miniTn10dKan.

En los primeros experimentos para el análisis de las mutantes JMH0198 y JMH0199 se comprobó que ambas poseen un gen *adhE* completo y que produce una proteína AdhE funcional que permite el crecimiento de las cepas en medio mínimo glucosa y anaerobiosis, condiciones en las cuales AdhE es esencial para el balance de la poza de NAD⁺.

3.2.8 Mapeo del sitio de inserción del transposón miniTn10dkan en las mutantes JMH0198 y JMH0199

Se clonaron los fragmentos cromosomales con la inserción del transposón miniTn10dkan de las mutantes JMH0198 y JMH0199 en los vectores pUC18 y psK+. Primero se determinó por *Southern Blot* qué enzimas de restricción generaban fragmentos de tamaños que pudieran ser clonables en los vectores mencionados. Se probaron varias enzimas y se determinó que *EcoRI*, *PstI* y *XhoI*, generaban fragmentos de aproximadamente 10 Kb. Se clonaron estos fragmentos digiriendo DNA cromosomal de ambas mutantes con cada una de las enzimas *EcoRI*, *PstI* y *XhoI* y con los vectores digeridos con las mismas enzimas. Se transformó la cepa XL1-blue con cada una de las ligaciones y se seleccionaron transformantes resistentes a ampicilina (resistencia que confiere el vector) y kanamicina (resistencia que confiere el transposón). Seleccionamos sólo aquellas transformantes que tuvieron

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

construcciones con insertos que contuvieran el transposón y una parte del sitio interrumpido en el cromosoma de las mutantes. Para corroborar que las construcciones en estas transformantes resistentes confiere dicha resistencia, se re-transformó con ellas a la cepa XLI-blue seleccionando de nuevo colonias ampicilina-kanamicina resistentes. Analizamos las construcciones por medio de un análisis de restricción con las enzimas utilizadas en la clonación en cada caso, encontrando en todas insertos de los pesos aproximados esperados, por lo que se escogieron algunas y se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos universales -20 y reverso que alinean antes y después del sitio de muticlación del vector pUC18. Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis de alineamiento utilizando el programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se determinó el sitio de inserción para cada mutante en el cromosoma de *Escherichia coli*.

Inserción en la mutante JMH0198

El gen interrumpido por el transposón en la mutante JMH0198 es *mdh* que codifica para la enzima de Ciclo de Krebs malato deshidrogenasa. Se corroboró que la inserción del transposón fuera en *mdh* por medio de *Southern Blot* utilizando como sonda el producto de PCR del marco abierto de lectura de *mdh* y su región promotora. La autoradiografía muestra que el gen *mdh* se encuentra íntegro en la mutante JMH0199, comparando con la cepa silvestre MC4100 (figura 2). Sin embargo, en la mutante JMH0198, el peso del gen *mdh* es aproximadamente 1 Kb mayor que el del gen silvestre, esto demuestra que el gen está interrumpido.

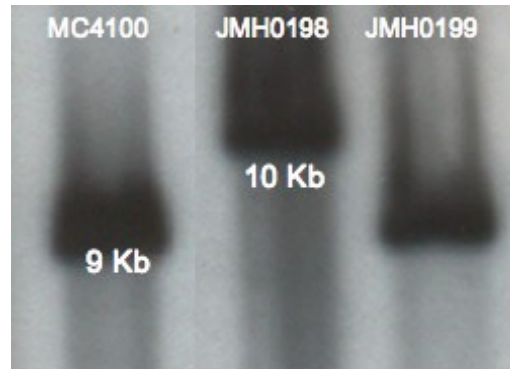


Figura 2. Southern Blot con DNA cromosomal de la cepa silvestre MC4100 y mutantes JMH0198 y JMH0199 utilizando como sonda un producto de PCR del marco abierto de lectura y zona promotora del gen *mdh*. Se observa que el gen silvestre debe dar un producto de aproximadamente 9 Kbs. En la mutante 1 el fragmento que contiene al gen *mdh* es de 10 Kbs. Esto corrobora que en la mutante 1 el gen interrumpido por el transposón en *mdh*.

Inserción en la mutante JMH0199

Se identificó que el gen interrumpido en la mutante JMH0199 es *acnB*, el cual codifica para la enzima del Ciclo de Krebs aconitasa B. Se corroboró que la inserción del transposón se localiza en *acnB* por medio de *Southern Blot* utilizando como sonda el marco abierto de lectura de *acnB*, obtenido por digestión de un plásmido que sobreexpresa *acnB*. En la figura 3 se observa la autoradiografía que muestra que el gen *acnB* se encuentra íntegro en la mutante JMH0198, comparando con la cepa silvestre MC4100. Sin embargo, en la mutante JMH0199, el peso del gen *acnB* es aproximadamente 1.7Kb mayor que el del gen silvestre, esto demuestra que el gen está interrumpido.

Adicionalmente, se demostró por Western Blot que la mutante JMH0199 es nula para AcnB (datos no mostrados).

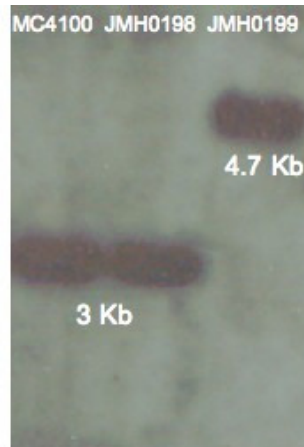


Figura 3. Southern Blot con DNA cromosomal de la cepa silvestre MC4100 y mutantes JMH0198 y JMH0199 utilizando como sonda el marco abierto de lectura del gen *acnB*. Se observa que el gen silvestre debe dar un producto de aproximadamente 3 Kbs. En la mutante JMH0199 el fragmento que contiene al gen *acnB* es aproximadamente de 4.7 Kbs. Esto corrobora que en la mutante JMH0199 el gen interrumpido por el transposón en *acnB*.

Papel de las enzimas AcnB y Mdh

En el metabolismo celular de *Escherichia coli*, AcnB cataliza las reacciones de ciclo de Krebs que convierten citrato en *cis*-aconitato y éste a isocitrato. Se ha reportado que AcnB coexiste intracelularmente en dos formas, una catalítica (holoenzima con un centro [4Fe-4S]) y otra no catalítica (apoenzima con el centro [4Fe-4S] desensamblado). La conversión entre las dos formas depende de las concentraciones de hierro y de estrés oxidativo (Tang, *et al.*, 2004).

E. coli posee dos aconitasas: AcnA, cuya transcripción es inducida por estrés oxidativo y fase estacionaria y AcnB cuya transcripción es inducida en fase exponencial. Las formas apo de ambas aconitasas son reguladores post-transcripcionales ya que se unen a varios mRNAs regulando su traducción. Interesantemente, las mutantes *acnB* muestran una disminución en la síntesis de las chaperonas GroEL, Tig y DnaK, y un aumento en proteínas que han sido relacionadas con la protección en estrés oxidativo como SodA, TrxB and YggX (Tang, *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ciclo de Krebs, Mdh es la enzima que cataliza la reacción que convierte oxaloacetato a malato. La proteína forma dímeros no cooperativos catalíticamente y cada monómero pesa 30 KDa. Se reportó que esta proteína transfiere NADH directamente al complejo I de la cadena respiratoria, por medio de una interacción proteína-proteína. En *Escherichia coli* existe una isoenzima de Mdh, Mqo o malato oxidasa. Tanto Mdh como Mqo son expresadas en fase exponencial. No se conoce mucho de la regulación de estas enzimas, e incluso existen dudas de que Mdh sea la enzima que cataliza la reacción en el sentido de oxaloacetato a malato en el Ciclo de Krebs, pues *in vitro* Mdh parece catalizar preferentemente la reacción inversa (McAlister-Henn, 1988, Park, et al 1995 y Van der Rest, *et al.*, 2000).

Dado que contábamos con más información y herramientas moleculares para seguir investigando la mutante JMH0199, *acnB*, proseguimos en el análisis de esta mutante, por lo que los experimentos posteriores reportarán los resultados sólo de ésta.

3.2.8 Complementación de las mutantes con *dnaK*, *acnA*, *acnB* y apo *acnB*

Tang y colaboradores en el 2004 reportaron que la forma apo de AcnB regula positivamente la traducción del transcrito de *dnaK*, por lo que en ausencia de AcnB las cantidades de DnaK disminuyen. Con base en esto pensamos que tal vez la cantidad de DnaK en la mutante en *acnB* no era suficiente para servir de escudo molecular de AdhE en contra de la oxidación. Por este motivo, complementamos con un vector que sobreexpresa DnaK. No recuperamos el fenotipo como habíamos pensado, por lo que concluimos que la mutante JMH0199 no pierde la capacidad de crecer en etanol por falta de DnaK. Dado este resultado comenzamos a analizar qué otra actividad de apo AcnB podría ser la necesaria para proteger a AdhE.

Dado que AcnB puede coexistir intracelularmente en su forma holo o apo (cada una con diferentes funciones), quisimos investigar si alguna de la dos, era la responsable del crecimiento de la mutante JE52 en etanol. Se transformó

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la mutante JE52 con un plásmido que contiene el gen silvestre de *acnB* bajo un promotor inducible con IPTG y con un segundo plásmido que contiene una variación del gen *acnB* en el cual se ha cambiado una cisteína en el sitio 769 por una serina. Esta cisteína es el ligando para uno de los hierros del centro [4Fe-4S]. Sin esta cisteína AcnB se encuentra permanentemente en la forma apo, al no poder ensamblar el centro [4Fe-4S]. Como controles en este experimento utilizamos la cepa silvestre MC4100 y la cepa JE52, parental de la mutante JMH0199.



Figura 4. Crecimiento en medio mínimo etanol de las cepas MC4100, JE52 y mutante JMH0199 complementadas con plásmidos que contienen los genes *acnB* silvestre, *acnB* apo, *acnA* y *dnaK*. Se observa que la mutante JMH0199 recobra el crecimiento en etanol sólo si se sobreexpresan ambas formas, holo y apo, de AcnB.

Ambas formas, la silvestre y la apo, complementaron la deficiencia y la mutante pudo crecer en etanol. Debido a que la forma apo es catalíticamente inactiva, concluimos que es la forma no catalítica de AcnB la que se requiere en la protección de la actividad aeróbica de AdhE. También complementamos con un plásmido con el gen silvestre *acnA* bajo un promotor inducible por IPTG. Dado que las formas holo tanto de AcnA como de AcnB catalizan la misma reacción, esperábamos una restauración del crecimiento en etanol con la sobreexpresión de AcnA, si era la actividad catalítica la requerida. Esta complementación no restauró la deficiencia en crecimiento en etanol, por lo que definitivamente, no es la actividad catalítica de aconitasa, sino alguna propiedad de AcnB en su forma apo, talvez su actividad de regulación traduccional sobre ciertos transcritos, o bien alguna otra desconocida.

La sobreexpresión de *AcnB* en la cepa silvestre, por otro lado, no es suficiente para que la cepa crezca en etanol, es decir, se requieren las dos mutaciones puntuales en *adhE* ($\text{AdhE}^{\text{A267T Q568K}}$) y *AcnB* para que esto suceda.

3.2.8 Decaimiento de la actividad enzimática de AdhE

Dado que la actividad de AdhE en la mutante JMH0199 en aerobiosis se pierde, nos preguntamos si la desactivación AdhE era un proceso dependiente de oxígeno. Para probar esta hipótesis, medimos el decaimiento de la actividad enzimática de AdhE durante un cambio de anaerobiosis a aerobiosis en diferentes cepas.

El decaimiento de la actividad enzimática de AdhE fue seguido por 8 horas en las cepas indicadas en la figura 5, después de cambiar los cultivos de anaerobiosis a aerobiosis. Observamos que la actividad de AdhE en la cepa *acnB* decae más rápido comparada con la cepa silvestre y que esta tasa de decaimiento se recupera a niveles silvestres en cepas complementadas con plásmidos que expresan *acnB* o *apo-acnB*. Se obtuvieron resultados similares con la mutante JMH0199 y la cepa silvestre JE52 (Fig. 5).

Los resultados de estos experimentos indican que la actividad aeróbica de AdhE es muy sensible a la ausencia de *AcnB*, ya sea en la cepa con las dos mutaciones puntuales en *adhE* o en la cepa parental con el gen *adhE* silvestre. Este dato es muy importante pues nos indica que el mecanismo de protección de *AcnB* no ocurre sólo en la mutante en *adhE* (JE52: $\text{AdhE}^{\text{A267T Q568K}}$), sino también en la cepa con AdhE silvestre. Interesantemente, en los experimentos de sobreexpresión de *AcnB* y *apo-AcnB*, recuperamos la tasa de decaimiento de la actividad de AdhE registrada en la cepa parental. Esto indica que efectivamente, *AcnB* en su forma *apo* tiene un papel en la protección de AdhE contra oxidación.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

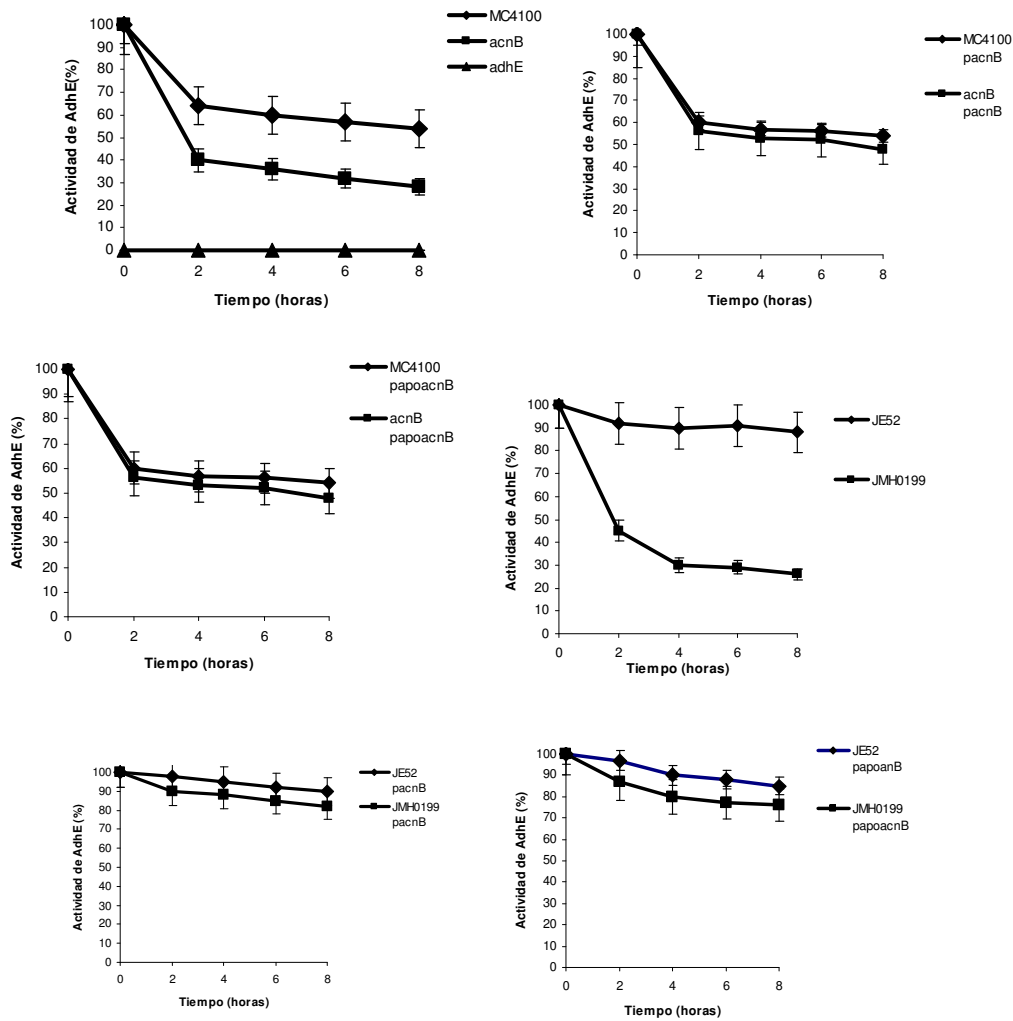


Fig. 5 Cinéticas de decaimiento de la actividad de AdhE en cultivos que fueron cambiados en fase exponencial de anaerobiosis a aerobiosis. La actividad de AdhE decrece porque la proteína se oxida en aerobiosis y ya no es funcional. En general, la actividad decae más rápido en las cepas que están mutadas en *acnB*. La actividad se recupera al complementar con ambas formas de AcnB (holo y apo). Este fenómeno ocurre tanto en fondos genéticos silvestres (tres gráficas en la primera fila), como en los fondos genéticos $AdhE^{A267T,E568K}$ (tres gráficas en la segunda fila). Número de experimentos independientes: 5. Medio LB glucosa.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguimos el decaimiento de la actividad de AdhE por choque térmico a 42°C, en las cepas MC4100 y JMH0199. Observamos un patrón de decaimiento similar al de inactivación por oxidación (en aerobiosis) en donde la actividad de AdhE en la cepa *acnB* decae más rápido que en la cepa silvestre. Debido a que esta inactivación pudiera deberse a disgregación de complejos proteicos y desnaturalización, este resultado sugiere que en la cepa *acnB* existe una proteína que interactúa físicamente con AdhE para proteger su actividad, probablemente la misma AcnB (figura 6).

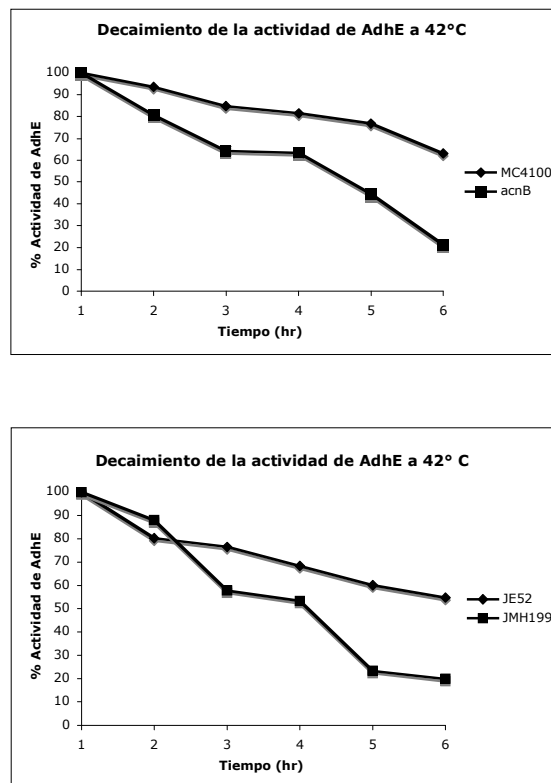


Figura 6. La inactivación de AdhE por calor aumenta en la mutante *acnB*. Al disgregar esta interacción con calor, AdhE se inactiva en la cepa silvestre, pero en ausencia de AcnB (mutante JMH0199) el decaimiento de la actividad es más rápido. Número de experimentos independientes: 3. Medio LB glucosa 0.2%, aerobiosis.

3.2.2.3.2.9. Coinmunoprecipitación

Debido a que nuestros datos apuntaban a que AdhE es catalíticamente activa en aerobiosis porque probablemente esté protegida del daño por un complejo constituido por proteínas, entre ellas DnaK, decidimos determinar si AcnB formaba parte de dicho complejo. Para probar esta hipótesis realizamos una coinmunoprecipitación utilizando como anticuerpo para la precipitación al anti-AdhE. El experimento se realizó en las cepas MC4100, JE52, JMH0199 y *adhE* (control de especificidad del anticuerpo), en crecimiento exponencial y medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Se realizó el experimento en extractos de la cepa JE52 en crecimiento exponencial en medio mínimo etanol, esto con el fin de determinar si la posible interacción proteica de AdhE con AcnB se daba sólo en las condiciones donde AdhE debía ser activa en aerobiosis.

Los coinmunoprecipitados se separaron por electroforesis de 2 dimensiones y posteriormente se cortaron las bandas que correspondían a las proteínas de mayor abundancia. Las proteínas extraídas de estos geles fueron identificadas por MALDI-TOF, secuenciándose totalmente. De esta forma, se pudo identificar en los complejos coinmunoprecipitados con AdhE, a DnaK y a AcnB.

A la par, se realizó un Western Blot con un anticuerpo anti AcnB, en donde también se logró identificar a AcnB como parte del complejo proteico que interactúa con AdhE (figura 7).

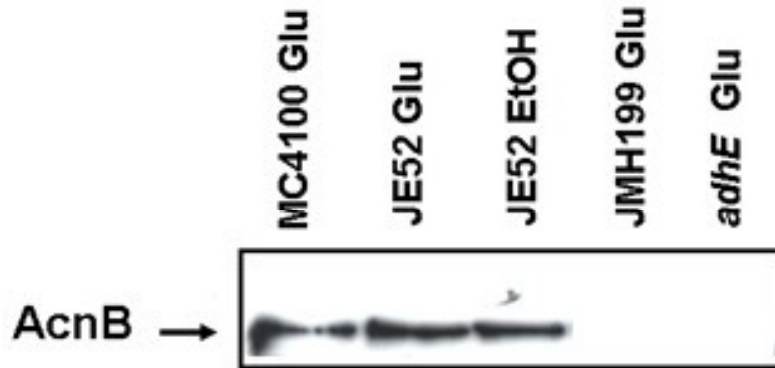


Figura 7. Western Blot con anticuerpo anti-AcnB. Se realizó SDS-PAGE de proteínas co-inmunoprecipitadas, el cual fue utilizado posteriormente en un Western Blot con anticuerpo primario anti-AcnB. Se observa que AcnB forma parte del coimmunoprecipitado de MC4100 y JE52 (en medio mínimo glucosa y etanol), pero no aparece en la mutante JMH0199, como es de esperarse al ser una mutante en el gen de *acnB*. El control negativo de la mutante *adhE* nos indica que la coimmunoprecipitación fue específica para AdhE, pues no observamos ninguna proteína en los geles (datos no mostrados) ni tampoco a AcnB.

Estos datos confirman que apo AcnB interactúa físicamente con AdhE, y posiblemente como resultado de ésta, protege la actividad aeróbica de AdhE.

3.2.3.3.2.10. Sensibilidad a H₂O₂

Dados los reportes anteriores en donde se describe a las cepas mutantes en *acnB* como altamente sensibles al estrés oxidativo, pensamos que AcnB podría ser una protección generalizada de proteínas en la célula contra oxidación. Por este motivo, se realizaron dos experimentos que determinan la sensibilidad de las cepas mutantes en *acnB*: viabilidad celular después de estrés con H₂O₂ y patrón de oxidación de proteínas por carbonilación.

Se analizó la viabilidad a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 90 minutos) de las cepas MC4100, JE52 y la mutante JMH0199 después de agregar 8 mM H₂O₂. La concentración de H₂O₂ utilizada es letal para la cepa silvestre después de 90 minutos de exposición. La cepa JE52 muestra mayor resistencia a H₂O₂, igual que la cepa silvestre, pues no se observa una disminución de la viabilidad durante los tiempos probados. Las mutantes

JMH0199 y MC4100 *acnB*, en cambio, son muy sensibles al estrés pues la viabilidad cae inmediatamente después de agregar el H₂O₂. Esto sugiere que AcnB, se requiere contra el daño oxidativo a nivel celular.

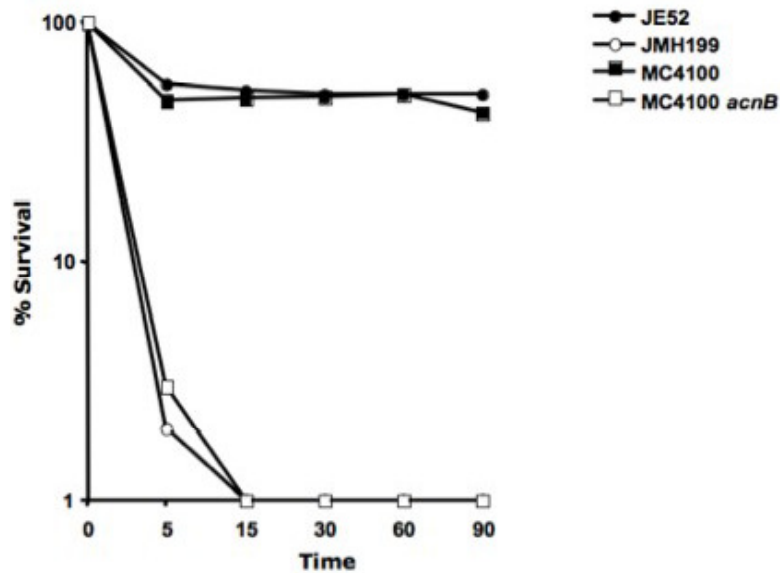


Figura 8. Viabilidad de las cepas MC4100, JE52, JMH0199 y *acnB* después de exposición a H₂O₂ 8 mM por 90 minutos. Número de experimentos independientes: 4. Medio LB glucosa 0.2%.

3.2.4.2.3.2.11. Patrón de carbonilación de proteínas

Realizamos la detección de proteínas carboniladas en las cepas MC4100, JE52 y mutante JMH0199. Encontramos que después de 1 hora con 4 mM de H₂O₂ las cepas MC4100 y JE52 no muestran mayor cantidad de proteínas carboniladas, consistente con su respuesta a H₂O₂ (figura 8). Sin embargo, la mutante JMH0199 muestra mayor intensidad en la carbonilación (figura 9).

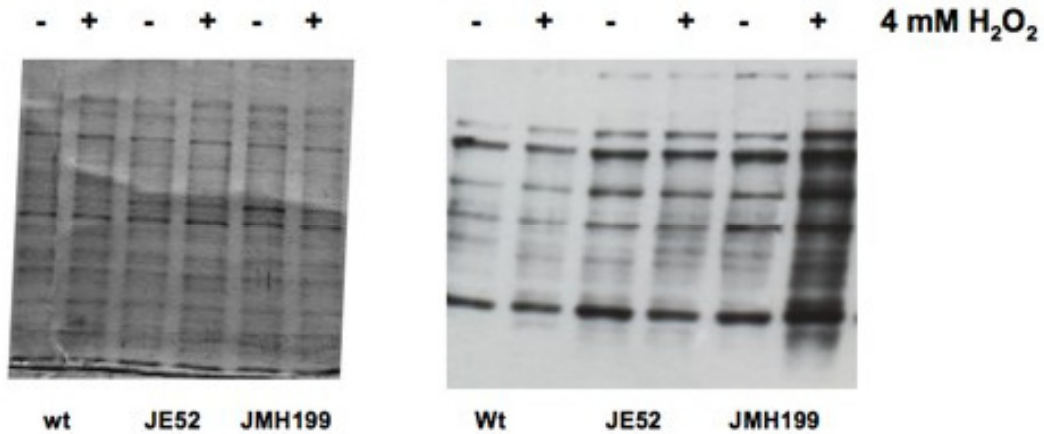


Figura 9. Oxidación de proteínas por carbonilación determinada por Western Blot en las cepas MC4100 (wt), JE52 y JMH0199, con (+) y sin (-) exposición a H₂O₂ 4 mM. La imagen de la izquierda es un SDS-PAGE teñido con Coomassie en el cual se observan concentraciones similares de proteína. La imagen de la derecha es la autorradiografía del Western Blot realizado con anticuerpo primario anti-grupos carbonilo. La intensidad de las bandas es directamente proporcional al grado de oxidación de las proteínas (a mayor oxidación, mayor intensidad).

La función exacta que AcnB en forma apo ejerce en el complejo de protección alrededor de AdhE nos es desconocida, pero pensamos que AcnB es, junto con DnaK, un escudo de protección contra oxidación del proteoma en general, pues nuestros datos indican que en ausencia de AcnB la oxidación por carbonilación de una amplia gama de proteínas aumenta (figura 9 y 10). La importancia de AcnB en la protección general de la viabilidad celular fue otro resultado obtenido en este trabajo y que consistente con los datos reportados.

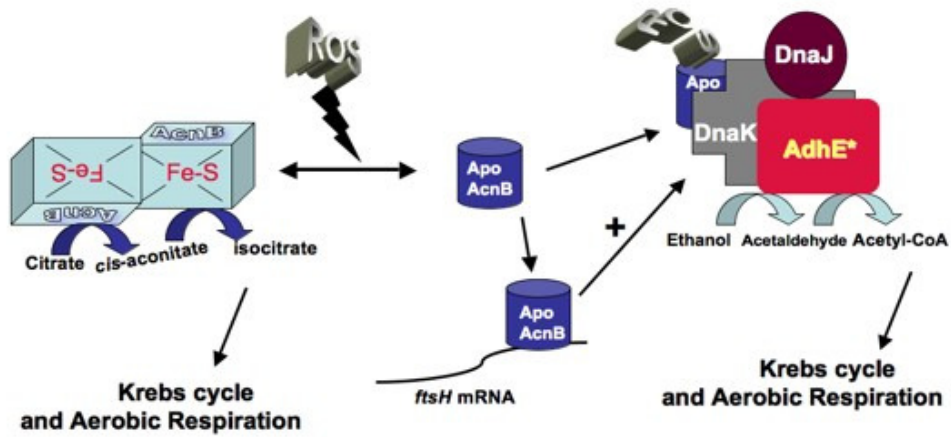


Figura 10. Modelo de protección de AcnB. En su forma holo AcnB cataliza en Ciclo de Krebs la conversión de citrato a isocitrato. El centro 4Fe-4S de holo AcnB se oxida por aumento de EROs, lo cual la convierte en la forma no catalítica apo AcnB que regula la traducción de ciertos transcritos y también participa dentro de complejos de protección junto con chaperonas para evitar la oxidación de AdhE y su desactivación en aerobiosis.

CONCLUSIONES

Efecto de las condiciones anaeróbicas y fase estacionaria en las respuestas contra estrés por calor y oxidativo en *Escherichia coli*

1. El estrés por calor disminuye la viabilidad celular sólo en fase exponencial aeróbica, no teniendo efecto en fase exponencial anaeróbica y estacionaria tanto aeróbica como anaeróbica.
2. La insensibilidad al calor en fase estacionaria aeróbica es independiente de la síntesis *de novo* de Hsps, aunque no descartamos la posibilidad de que sea dependiente de Hsps previamente sintetizadas.
3. El estrés calórico en células en fase estacionaria anaeróbica desencadena la síntesis de Hsps más rápido y por más tiempo que en aerobiosis.
4. RpoH activa la transcripción de Hsps en fase exponencial aeróbica, pero no en fase exponencial anaeróbica, fase estacionaria aeróbica ni fase estacionaria anaeróbica. Por lo tanto, RpoH no es el único regulador transcripcional que activa mecanismos de resistencia al calor.
5. La oxidación de proteínas por H₂O₂ es mayor en células en estrés calórico en fase exponencial.

Papel de Aconitasa B en la protección de proteínas contra el daño por oxidación

1. AcnB junto con DnaK forman parte de un complejo alrededor de AdhE cuya función podría ser evitar la oxidación de AdhE.
2. La falta de AcnB torna a la célula sensible ante la oxidación generalizada de sus proteínas, lo que conlleva a la disminución de la viabilidad celular si el estrés se prolonga. Sin embargo, no sabemos si su única función en la protección contra estrés oxidativo es servir de escudo de ciertos blancos proteicos.

3. AcnB es una proteína multifuncional, con dos funciones ampliamente descritas hasta el momento: enzima de ciclo de Krebs que cataliza la conversión de citrato a isocitrato y modulador de la transcripción de ciertos mRNAs. Nosotros proponemos con este trabajo de investigación una tercera función, como escudo molecular de protección de ciertas proteínas en contra de oxidación, junto con chaperonas como DnaK.

PERSPECTIVAS

Efecto de las condiciones anaeróbicas y fase estacionaria en las respuestas contra estrés por calor y oxidativo en *Escherichia coli*

6. La topología del DNA podría jugar un papel importante en la activación de la transcripción en fase exponencial anaeróbica y fase estacionaria ante un cambio abrupto de temperatura. Se debe profundizar en el estudio de la relajación del DNA ante diferentes estreses. Esto pudiera aumentar la disponibilidad de ciertos promotores para su transcripción.
7. Para profundizar en el estudio de los factores sigma en la expresión de Hsps en diferentes estreses, se deben realizar experimentos enfatizando el efector a nivel transcripcional, por ejemplo, mediante fusiones transcripcionales de ORFs de Hsps con promotores con cajas exclusivas para un factor sigma particular. Se debe tomar en cuenta la gran controversia que existe en la determinación de secuencias consenso de reconocimiento para cada factor sigma.

Papel de Aconitasa B en la protección de proteínas contra el daño por oxidación

4. Se debe demostrar si AcnB y DnaK se oxidan más al ser parte de un complejo-escudo de protección contra oxidación proteica, que la proteína a la que se unen para “protegerla”.
5. Experimentos preliminares de marcaje de proteínas para monitorear la síntesis post-estrés calórico y oxidativo, indican que AcnB es importante para la traducción de proteínas. Mutantes en *acnB* muestran nula síntesis post-estrés. Se requieren experimentos concluyentes para fundamentar esta observación.

6. El análisis detallado de la función de AcnB en estrés oxidativo es un campo interesante de investigación dada la amplia distribución filogenética de las aconitasas.

1. **Ades, S.E., Conolly, L.E., Alba, B.M., y Gross, C.A.** 1999. The *Escherichia coli* sigma (E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* 12:2449-2461.
2. **Alba, B.M., y Gross, C.A.** 2004. Regulation of the *Escherichia coli* σ^E -dependent envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 52:613-619.
3. **Arsène, F., Tomoyasu, T., Bukau, B.** 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int .J. Food Microbiol.* 55:3-9
4. **Beck, B.J., Conolly, L.E., De las Peñas, A., y Downs, D.M.,** 1997 Evidence that *rseC*, a gene in the *rpoE* cluster, has a role in thiamine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 179:6504-6508
5. **Benov, L., Fridovich, I.** 1995. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli* O157:H7. *J.Appl.Microbiol.* 85:231-237.
6. **Bock, A. y Sawers,G.** 1996. Fermentation. En: *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. (Eds. Neidhart F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reiznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H.E.) ASM Press Washington, D.C.
7. **Bukau, B.** 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* 9:671-680.
8. **Cabiscol, E., Tamarit, J., y Ros, J.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.*, 3:3-8.
9. **Camacho-Carranza, R., Membrillo-Hernández, J., Ramírez-Santos, J., Castro-Dorante, J., Chagoya de Sánchez, V., Gómez-Eichelmann, M.C.** 1995. Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 177:3619-3622.
10. **Cambell, E.A., T.,Mupy, J.L., Gruber, T.M., Wang, S., Sharp, M.M., Gross, C.A. y Darse, S.A.** 2003. Crystal structure of *Escherichia coli* sigma (E) with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cel.* 11:1067-1078.
11. **Chen , Y.M. y Lin, E.C.C.** 1991. Regulation of the *adhE* gene, which encodes etanol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:8009-8013.

12. **Clark , D.P. y Conan, J.E.** 1980. *Escherichia coli* mutant with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. J. Bacteriol. 141:177-183.
13. **Collinet, B., Yuzawa, H., Chen, T., Herrera, C., y Missiakas, D.** 2000. RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA: sigma interaction in the cytoplasm and the availability of sigma.RNA polymerase. J. Biol. Chem. 275:33898-33904.
14. **Darwin, A.J, y Stewart, V.** 1996. The NAR modulon systems: nitrate and nitrite regulation of the anaerobic gene expression, p.343-359. En E.C.C. Lin y A.S. Lynch (ed.), Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. R.G. Landes Company, Austin, Tex.
15. **De las Peñas, A., Connolly, L., y Gross, C.A.** 1997. Sigma E is a essential sigma factor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179:682-6864.
16. **De las Peñas, A., Connolly, L.,y Gross, C.A.** 1997. The sigma E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigma E. Mol. Microbiol. 24:373-385.
17. **Demple, B.** 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review Gene 179:5-57.
18. **Ding, Q., Kusano, S., Villarejo. M., Ishihama, A.** 1995. Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strenght: differential recognition of osmoregulated promoters by E σ^D and E σ^S holoenzymes. Mol.Microbiol. 16:649-656.
19. **Echave, P., Esparza-Cerón, M.A., Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., Membrillo-Hernández, J., Lin, E.C.C.** 2002. The DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 4626-4631.
20. **Echave, P., Tamarit, J., Cabiscol, E., Ros, J.** 2003. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 278:30193-30198.
21. **Espinosa, A., Yan, L., Zhang, Z., Foster, L., Clark, D.P., Li, E. y Stanley, S.** 2001. The bifunctional *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) protein is necessary for amebic growth and

- survival and requires an intact C-terminal domain for both alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 276:20136-20143.
22. **Fang, F.C.** 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts y controversias. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:820-832.
 23. **Finkel, S.E., y Johnson, R.C.** 1992. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Mol. Microbiol.* 6:3257-3265.
 24. **Georgellis,D., Kwon, O., Lin, E.C.C.** 2001. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science.* 292:2314-2316.
 25. **González-Flecha, B. y Demple, B.** 2005. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and genetic control. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899:69-87.
 26. **Groat, R.G., Shultz, J.E., Zychlinsky, E., Bockman, A., Martin, A.** 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168:486-493.
 27. **Gross, C. A.** 1996. Function and regulation of the heat shock proteins, pp.1382-1399. *En* F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* American Society for Microbiology. Washington D.C.
 28. **Guan, K.L., Dixon, J.E.** 1991. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.* 266:17026-17030.
 29. **Guisbert E., Herman C., Lu C.Z., Gross C.A.** 2004. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev.* 18:2812-2821.
 30. **Halliwell, B.** 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141:312-322.
 31. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** 1999. Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford University Press, 936 pp.
 32. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.,* 219:1-14

33. **Hansberg-Torres, W.** 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico (Eds. Cea Bonilla A., del Arenal MENA I.P., Riveros Rosas H., Vázquez-Contreras E.) Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, México D.F.
34. **Hengge-Aronis, R.** 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:148-152.
35. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 66:373-395.
36. **Jenkins, D.E., Auger, E.A., Martin, A.** 1991. Role of RpoH, a heat shock regulator protein in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* 173:1992-1996.
37. **Jishage, M., Ishihama, A.** 1998. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major σ subunit of RNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:4953-4958.
38. **Kaga, N., Umitsuki, G., Clark, D.P., Nagai, K., Washi, M.** 2002. Extensive overproduction of the AdhE protein by *rng* mutations depends on mutations in the *cra* gene or in the Cra-box of the *adhE* promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295:92-97.
39. **Kessler, D., Herth, W., Knappe, J.** 1992. Ultrastructure and pyruvate formate lyase quenching property of the multi-enzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:18073-180079.
40. **Kessler, D., Leibrecht, I., Knappe, J.** 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Letters* 281:59-63.
41. **King, T., Ferenci, T.** 2005. Divergent roles of RpoS in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:323-327.
42. **Kolter, R., Siéguele, D.A., Tormo, A.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:855-874.

43. **Koo, M., Lee, J., Rah, S., Yeo, W., Lee, J., Lee, K.** 2003. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. EMBO J. 22:2614-2622.
44. **Krueger, J. H. and G. C. Walker.** 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR+*-dependent fashion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1499-1503.
45. **Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos Preciado, J.I.** 2001. Manual de Infectología Clínica. Méndez Editores. México D.F.
46. **Kusano, S., Ding, Q.Q., Fujita, N., Ishihama, A.** 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes- effect of DNA supercoiling. J. Biol. Chem. 271:1998-2004.
47. **Landick, R., V. Vaughn, E. T. Lau, R. A. VanBogelen, J. W. Erickson, y F. C. Neidhardt.** 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. Cell 38:175-182.
48. **Leonardo, M.R., Cunningham, P.R.C lark, D.P.** 1993. Anaerobic regulation of the *adhE* gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 175:870-878.
49. **Leonardo, M.R., Daille, Y., Clark, D.P.** 1996. Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:6013-6018.
50. **Lin, E.C.C. y Lynch, S.A.** 1996. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Chapman & Hall. Nueva York.
51. **Lonetto, M.A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S., Gross, C.** 1998. Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit. J Mol Biol. 284:1353-1365.
52. **López-Sánchez, F., J. Ramírez-Santos, M., Gómez-Eichelmann, C.** 1997. In vivo effect of DNA relaxation on the transcription of gene *rpoH* in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 1353:79-83.
53. **Madigan, M.T., Martinko, J.M., y Parker, J.** 1999. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid.
54. **Matayoshi, S., Oda, H., Sarwar, G.** 1989. Relationship between the production of spiroosomes and anaerobic glycolysis activity in *Escherichia coli* B. J. Gen. Microbiol. 135:525-529.

55. **McAlister-Henn, L.** 1988. Evolutionary relationships among the malate dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 13:178-81.
56. **Meccas, J., Rouvière, P.E., Ericsson, J.E., Donohue, T.J., y Gross, C.A.** 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma factor, is modulated by the expression of the outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7:2618-2628.
57. **Mejía R., M. C. Gómez-Eichelmann y M. S. Fernández.** 1995. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta.* 1239:195-200.
58. **Membrillo-Hernández, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros., Lin, E.C.C.** 2000. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 275: 33869-33975.
59. **Membrillo-Hernandez, J., Kwon, O., De Wolf, P, Finkel, S.E., Lin, E.C.C.** 1999. Regulation of the *adhE* (encoding ethanol oxidoreductase) by the Fis protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:7390-7393.
60. **Mikulskis, A., Aristarkhov, A., Lin, E.C.C.** 1997. Regulation of expression of the ethanol dehydrogenase gene (*adhE*) in *Escherichia coli* by the catabolite repressor activator protein Cra. *J. Bacteriol.* 179:7139-7134.
61. **Missiakas, D. and S. Raina.** 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179:2465-2471.
62. **Missiakas, D., Betton, J M, y Raina, S.** 1996. New components of protein holding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA y Skp/OpmH. *Mol. Microbiol.* 21:871-884.
63. **Missiakas, D., S. Raina and C. Georgopoulos.** 1996. Heat shock regulation, pp.481-501. *En* E. C. C. Lin and A. S. Lynch (Eds). Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. R. G. Landes Company, Austin, TX.
64. **Mizushima, I., Ohtsuka, Y., Miki, T., 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.

65. **Morimoto, R.I., Kline, M.P., Blimston, D.N., Cotto, J.J.** 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* 32:17-29.
66. **Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T.** 1999. Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* 15:655-665.
67. **Neidhardt, F.C., VanBogelen, R.A., Vaugh, V.** 1984. The genetics and regulation of the heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18:295-329.
68. **Neumann, D. and L. Nover.** 1991. Heat shock-induced changes of cell ultrastructure, pp.346-371. *In* L. Nover (Ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
69. **Nomura, S., Masuda, K., Kawata, T.** 1989. *Microbiol. Immunol.* 33:23-43.
70. **Nover, L.** 1991. Inducers of HSP synthesis: heat shock and chemical stressors, pp.5-40. *En* L. Nover (Ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
71. **Park, S.J., Cotter, P.A., Gunsalus, R.P.** 1995. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J Bacteriol.* 177:6652-6.
72. **Parsell, D. A. y Lindquist, S.** 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496.
73. **Prodromou, C., Haynes, M.J., Guest, J.R.** 1991. The aconitase of *Escherichia coli*: purification of the enzyme and molecular cloning and map location of the gene (*acn*). *J Gen. Microbiol.* 137:2505-2515.
74. **Raina, S., Missiakas, D., y Georgopoulos, C.** 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO, J.* 14:1043-1055.
75. **Reddy, M., Gowrishankar, J.** 1997. Identification and characterization of *ssb* and *uup* mutants with increased frequency of precise excision of transposon Tn10 derivatives: nucleotide sequence of *uup* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 179(9):2892-2899.
76. **Reid, M.F. y Fewson, C.A.** 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:13-56.

77. **Reitzer, L., Schneider, B.** 2001. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:422-444
78. **Reyes-Domiguez, Y., Contreras-Ferrat, G., Ramírez-Santos, J., Membrillo-Hernandez, J., Gomez-Eichelmann, M.C.** 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* 185:1097-1100.
79. **Richmond, C. S., J. D. Glasner, R. Mau, H. Jin and F. R. Blattner.** 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27:3821-3835.
80. **Rockabrand, D., Arthur, T., Korinek, G., Livers, K., 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.
81. **Rockabrand, D., Blum, P.** 1995. Multicopy plasmid suppression of stationary phase chaperone toxicity in *Escherichia coli* by phosphogluconate dehydratase and the N-terminus of DnaK. *Mol. Gen. Genet.* 249:498-506.
82. **Sawers, G.** 1999. The aerobic/anaerobic interfase. *Curr. Op. Microbiol.* 2:181-187.
83. **Silhavy, T.J., Beckwith, J.** 1983. Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* K12 affected in protein localization. *Methods Enzymol.* 97:11-40.
84. **Souza, V., Rocha, M., Sander, L., Eguiarte, L.E.** 2001. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. En: *Microbios en línea*. (Eds. Martínez, R.E. y Martínez R.J.) Coordinación de investigación científica, UNAM.
85. **Storz, G. Y Zheng, M.** 2000. Oxidative stress. En: *Bacterial Stress Responses* (Eds. Storz G. Y Hengge-Aronis R.) ASM Press, Washington, D.C.
86. **Straus D., Walter W., Gross C.A.** 1990. DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes Dev.* 4:2202-2209.

-
87. **Tang, Y., Guest, J.R., Artymiuk, P.J., Read, R.C., Green, J.** 2004. Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins. *Mol. Microbiol.* 51: 1817-1856.
 88. **Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J., Green, J.** 2002. *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: posttranscriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiol.* 148:1027-1037.
 89. **Tilly K, McKittrick N, Zylicz M, Georgopoulos C.** 1983. The *dnaK* protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. *Cell.* 34:641-6.
 90. **Tilly K, Spence J, Georgopoulos C.** 1989. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor sigma. *J Bacteriol.* 1989.171:1585-1589.
 91. **Ubelaker, M.H., Rosenblum, E.D.** Transduction of plasmid determinants in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 1978. *J. Bacteriol.* 133:699-707.
 92. **VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt.** 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5589- 5593.
 93. **VanBogelen, R. A., P. M. Philip and F. C. Neidhardt.** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:26-32.
 94. **Van der Rest, M.E., Frank C., Molenaar D.** 2000. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182:6892-9.
 95. **Vieira, J., Messing, J.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 19:259-268.
 96. **Wachi, M, Kaga, N., Umitsuki, G., Clark, D.P., Nagai, K.** 2001. A novel RNase G mutant that is defective in degradation of the *adhE* mRNA but proficient in the processing of 16S rRNA precursor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 289:1301-1306.
 97. **Walkup, L.K.B. y Kogoma, T.** 1989. *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J. Bacteriol.* 171:1476-1484.

98. **White, D.**, 2000. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2da ed. Oxford University Press. Nueva York.
99. **Williams, M.D., Ouyang, T.X., Flickinger, M.C.** 1994. Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol. Microbiol.* 11:1029-1043.
100. **Wu, J., y Weiss, B.** 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* y *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 2864-2871.
101. **Yamato, M.**, 1998. Purification of spiroisin from *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 and partial characterization based on its amino acid sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:173-175.
102. **Zhao, K., Liu, M., Burgués, R.R.** 2005. The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced σ^{32} protein involves σ^{32} regulon activation followed by inactivation and degradation of σ^{32} *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 6:17758-17768.