

03062

1
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFEECTO DEL SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA EN LA RESPUESTA AL ESTRES
POR CALOR EN Escherichia coli.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA PRESENTA EL BIOLOGO RAFAEL CAMACHO CARRANZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Los genes de E. coli se clasifican en tres grupos según su dependencia del grado de superenrollamiento (SE) del DNA para su expresión: 1) los que requieren de un alto grado de SE; 2) los que no tienen dependencia del SE; y 3) los que se expresan mejor en condiciones de bajo SE. Por ello es que se ha postulado al SE como una de las señales importantes en la coordinación de la expresión de genes dispersos en el cromosoma bacteriano.

En las respuestas celulares en que se activan los sistemas globales de regulación, se requiere de la expresión coordinada de genes dispersos en el genoma. Esto se logra mediante la acción de reguladores específicos para cada sistema; sin embargo, en algunos sistemas globales como en los de estrés osmótico y oxidativo, la regulación depende además de cambios importantes en el nivel de SE del DNA.

La inducción de otros sistemas, como el de estrés calórico (HS) y SOS, se acompañan de cambios importantes en la estructura del DNA cromosomal o nucleóide. Estos cambios se deben principalmente a la presencia de cortes en el DNA.

El interés del trabajo es evaluar la importancia del SE del DNA antes y durante la inducción de los sistemas de estrés calórico y SOS. Para ello se utilizó como modelo la inducción por mitomicina de SOS en E. coli, y el estrés calórico a 50°C, en presencia o ausencia de novobiocina, (Nov.) un inhibidor de topoisomerasa II. Las principales observaciones y conclusiones de este trabajo son:

1) La modificación del grado de SE en la bacteria mediante el empleo de Nov., reduce la cantidad de las proteínas DnaK y GroE que se sintetizan en respuesta al estrés de calor. Este resultado sugiere que el SE puede modificar la inducción de la respuesta HS, tal vez a través de la expresión del gene regulador rpoH.

2) Durante la respuesta HS se presenta un incremento en la capacidad citoplásmica para SE al DNA. Los antibióticos clo-ranfenicol y novobiocina inhiben este incremento, mientras que rifampicina no. El cloranfenicol no inhibe si se añade después de 5 minutos del cambio de temperatura. Estos resultados muestran que una proteína o proteínas, que son sintetizadas durante los primeros 5 minutos del estrés y cuya síntesis no se inhibe con rifampicina, son requeridas para SE al DNA.

3) La respuesta HS es más intensa en una mutante GyrA temperatura-sensible. Este resultado sugiere que aún cuando se bloquea a la actividad de girasa durante el HS y con ello el incremento en la capacidad de SE al DNA, se inicia la respuesta al estrés por calor.

4) Al inducir el sistema SOS, dos de los genes se expresaron de manera diferente al disminuir el grado de superenrollamiento del DNA. Este resultado sugiere que la expresión de los genes del sistema SOS en relación al SE no es homogénea.

Este trabajo tiene como perspectiva estudiar la fisiología de las células en la etapa de recuperación al salir de la condición de estrés y la importancia que el SE tiene en la misma .

I N D I C E

= <u>Resumen</u>	2
= <u>Introducción</u>	7
1. - Superenrollamiento del DNA.....	7
2. - Distribución de la tensión estructural del DNA....	7
3. - Regulación del grado de SE del nucleóide.	9
4. - Expresión genética y SE del nucleóide.....	11
5. - Respuesta celular al estrés por calor (HS).....	15
6. - Proteínas de HS.....	15
7. - Factor sigma 32.....	16
8. - Inductores de la respuesta HS.....	18
9. - Protección térmica.....	19
10. - Detección de la respuesta HS.....	20
11. - La respuesta SOS.....	21
12. - Represor LexA.....	22
= <u>Objetivos</u>	24
= <u>Material y Métodos</u>	26
1. - Cepas y plásmido.....	26
2. - Medios de cultivo.....	27
3. - Reactivos.....	28
4. - Marcaje de proteínas.....	28

5.	- Electroforesis de proteínas.....	28
6.	- Transformación.....	28
7.	- Electroforesis de topoisomeros.....	29
8.	- Sistema in vitro para medir actividad de topoisomerasas.....	29
9.	- Medición de actividad para β -galactosidasa.....	31
	<u>= Resultados y Discusión.....</u>	<u>32</u>
	I) Efecto de Novobiocina en la respuesta al estrés por calor (HS) en cultivos de <u>Escherichia coli</u> en diferentes fases de crecimiento.....	32
	II) Efecto de la Novobiocina en dos diferentes tiempos de duración del estrés de calor y en células de cultivos en dos diferentes fases de crecimiento.....	41
	III) Modificaciones en el superenrollamiento del DNA durante el estrés de calor.....	45
	IV) Efecto del cloranfenicol y la rifampicina en el superenrollamiento de los plásmidos reporteros en células sometidas a estrés por calor.....	49
	V) Papel de la proteína sigma 32 en la modificación del superenrollamiento del DNA durante la respuesta al estrés por calor.....	55
	VI) Estrés por calor en una mutante <u>gyrA</u> termo-sensible y en	

presencia de Novobiocina -----	60
VII) Viabilidad de la mutante RecA 51 durante el estrés por calor.-----	64
VIII) Efecto del grado de SE en la expresión de tres genes pertenecientes al sistema global SOS.-----	67
IX) Efecto de la respuesta SOS en el SE de plásmidos.-----	72
X) Comportamiento del SE celular del DNA de los plásmidos en la mutante umuC.-----	75
XI) Evaluación in vitro de la actividad de las topoisomerasas I y II.-----	79
= Conclusiones.-----	82
= Referencias.-----	85

INTRODUCCION

1) Superenrollamiento del DNA.

El DNA es una macromolécula con capacidad plástica de extraordinaria versatilidad, con información, no sólo en la secuencia de sus pares de bases, sino también en el arreglo estructural que tiene en el espacio, el cual permite o no la interacción con diversos factores celulares (Drew 1990).

Como macromolécula en el espacio, el DNA presenta diversos arreglos estructurales, dependiendo de los parámetros fisicoquímicos en su entorno y de una fina regulación mediada por la actividad enzimática de proteínas, que liberan o generan estados de tensión estructural en el DNA. Estas enzimas permiten una adecuada coordinación, entre los requerimientos fisiológicos de la célula y los parámetros fisicoquímicos que determinan el estado estructural del DNA. El nombre genérico que se ha dado a estas enzimas es el de topoisomerasas (Drlica 1984; Brady 1987).

2) Distribución de la tensión estructural del DNA.

El DNA es sometido a sistemas de tensión estructural (TE), mediados por los giros de una cadena (Crick) en relación a la cadena apareada (Watson). Estos giros pueden ser en sentido normal (positivo) o bien, en sentido inverso (negativo), generándose así los diferentes grados de superenrollamiento del DNA (SE). La liberación de la TE en un sistema con alto grado de SE, se logra girando libremente a la

molécula de DNA, lo que sucede cuando existe rompimiento del enlace fosfodiéster en una de las dos cadenas; pero de no existir la posibilidad del libre giro, el DNA tiende a generar arreglos estructurales en el espacio, dando lugar a la formación de supervueltas, que permiten una mejor distribución de la tensión acumulada en la molécula (Sinden et al. 1981).

Cuando la molécula de DNA ha formado arreglos en el espacio generando supervueltas, distribuye la tensión estructural a lo largo de sus pares de bases, afectando los puentes de hidrógeno. En las regiones ricas en citosinas y guaninas, donde existen tres puentes de hidrógeno por par de bases, la distribución de la torsión es diferente a la de zonas donde hay un alto contenido de adeninas y timinas con sólo dos puentes de hidrógeno por par de bases. Esto presupone que, las estructuras adoptadas por el DNA dependen, entre otros factores, de la secuencia primaria (Nordheim et al. 1982).

El cromosoma bacteriano consiste de una sola molécula de DNA en forma de anillo cerrado, que es sometido a un sistema de TE compartimentalizado en alrededor de 43 topodominios o regiones con barreras topológicas que evitan el libre giro del DNA; este arreglo permite la formación de asas de DNA, que junto con moléculas de RNA y proteína estructuran al nucleóide bacteriano (Winston et al. 1988; Stonington et al. 1971).

Para cuantificar el SE del DNA, se ha considerado la relación existente entre el número de supervueltas y la longitud del DNA. Esta relación ha sido descrita para el parámetro L que representa el número de giros de las cadenas apareadas y se define como $L=W+T$, donde

W es el número de veces que cruza una doble cadena de DNA sobre si misma, al ser obligada la molécula a extenderse en un plano imaginario. El parámetro T, se refiere a la cantidad de giros completos que efectúa la cadena de DNA sobre su eje imaginario, en el caso de DNA B este será de una vuelta completa positiva cada 10.5 pares de bases, por lo que T es aproximadamente igual al número de pares de bases del DNA entre 10.5. Por tanto, en la ecuación $L=W+T$ a cada supervuelta se le da el valor imaginario de un giro del DNA sobre su propio eje.

Existe otra forma de expresar la torsión del DNA, y está dada por la expresión $\sigma=\gamma/\beta$, donde γ se refiere, como en el caso del término W, al número de veces que las cadenas de DNA dobles se cruzan entre si, y β al número de giros completos del DNA sobre su propio eje, como en el caso del término T; y la intención del término σ es dar un valor de supervuelta por cada giro completo del DNA sobre su propio eje.

La fórmula $L=W+T$ es una suma algebraica en la que el término L puede disminuir o aumentar dependiendo del sentido del giro de las supervueltas del DNA (Drluca 1984; Goldstein et al. 1984). En el caso de los procariontes, con excepción de bacterias termofilicas como Sulfobolus acidocaldarius donde existe una girasa reversa, las supervueltas del DNA son generadas por la enzima TopII siempre en sentido negativo al giro del DNA, por lo que a un mayor SE hay un número menor "L", y consecuentemente un mayor σ negativo (Bouthier et al. 1991).

3) Regulación del grado de SE del nucleóide.

En el caso de los procariontes, el SE está regulado principalmente por un balance entre las actividades de dos enzimas antagónicas, llamadas topoisomerasa I y topoisomerasa II (TopI y TopII).

La topoisomerasa I es una enzima producto del gen topA, que actúa sobre el DNA SE como sustrato, induce el corte de una cadena y establece un enlace covalente entre una tirosina de la enzima y el fosfato 5' de una de las dos cadenas del DNA, permitiendo la liberación parcial de la cadena con el grupo OH en 3', la cual mediante un giro libera una supervuelta de la cadena de DNA. Posteriormente se liga nuevamente la cadena de DNA. Tanto el corte, el giro y el restablecimiento del enlace fosfodiéster, es independiente de ATP, y utiliza la energía acumulada en forma de arreglo estructural del DNA.

La topoisomerasa II actúa como un tetrámero de dos subunidades diferentes de 105 y 95 kilodaltons producto de los genes gyrA y gyrB respectivamente, mientras que el tetrámero se comporta como un complejo de 400 KDa. En la TopII, la subunidad GyrA es la responsable del corte de doble cadena y unión del DNA, mientras que la subunidad GyrB se encarga de generar la torsión en la cadena de DNA, lo cual logra haciendo pasar la cadena de DNA a través del corte en doble cadena efectuado por GyrA, que al ligar nuevamente el DNA, retiene el nuevo SE introducido en la molécula, esto requiere del gasto de ATP (Wang 1985; Bouthier et al. 1991).

La expresión de los genes que codifican para las proteínas GyrA y GyrB, requiere de un DNA con bajo SE (Menzel et al. 1983; Franco et al. 1989), mientras que para la expresión de topA se requiere un DNA con alto grado de SE (Tse-Dinh et al. 1988). El balance

entre las actividades de TopI y TopII se regula a nivel de la transcripción de sus genes la cual está dada por la actividad de las propias enzimas Top I y II y por todo aquello que modifique el grado de SE celular del DNA. Se ha postulado que el balance de las pozas ATP/ADP en la célula, es uno de los más importantes parámetros en la regulación de la actividad TopI-TopII, con lo cual todo aquello que modifique la carga energética de la célula, modificaría a su vez al grado de SE del nucleóide (Westerhoff et al. 1988; Hsieh et al. 1991).

4) Expresión genética y SE del nucleóide.

A partir de los trabajos iniciales en 1978 de Smith et al., en 79 de Kreuzer et al., Kubo et al., Sanzey y Yang et al., y posteriormente en 81 de Gómez et al.; se han identificado varios genes que muestran, dependencia del grado de SE del DNA para su expresión. Esto posiblemente se debe a los cambios en la interacción de la RNA polimerasa con el promotor en el DNA con diferente grado de SE.

En relación al SE, los genes pueden clasificarse en tres categorías: 1) aquéllos que se expresan mejor en un genoma con alto grado de SE; 2) los que se expresan preferencialmente en condiciones de bajo nivel de SE en el DNA y, 3) los genes que no tienen dependencia alguna del SE del genoma para su expresión (Drlica 1984).

El por qué algunos genes dependen y otros no del grado de SE celular del DNA para su expresión se desconoce. En el trabajo de León et al. (1988) se intentó responder a esta pregunta evaluando las entalpías de los puentes de hidrógeno en la región promotora de genes

con diferente grado de dependencia al SE para su expresión, buscando un patrón propio para cada una de las tres categorías de genes. No se encontró correlación y se abrió la posibilidad de que no sea solamente la región promotora, sino el entorno del promotor lo que determine la dependencia por el grado de SE del DNA.

El darse cuenta de que es posible formar tres grupos de genes en cuanto a la dependencia por el SE del DNA para su expresión, llevó a suponer que el SE del DNA podría ser un factor importante para la regulación coordinada de la expresión de genes dispersos en el cromosoma bacteriano. Lo anterior fue demostrado en 1985 por Yamamoto et al. (1985) al identificar como paso primario, el cambio estructural en el genoma bacteriano para poder hacer la transición de un crecimiento en aerobiosis a un estado de anaerobiosis; si no es posible generar este cambio en el grado de SE del cromosoma bacteriano, la capacidad facultativa de Salmonella tiphymurium se pierde.

C.Higgins demostró, que mediante la modulación del grado de SE celular del DNA es posible la expresión adecuada de los sistemas globales de regulación, como es la respuesta a estrés osmótico (SO) o el estrés oxidativo (SOx) (Higgins et al. 1988); así también, probó que variando el SE celular del DNA es posible inducir genes, que perteneciendo al sistema SO pueden responder a señales propias del sistema SOx, y que algunos genes del sistema oxidativo, es posible inducirlos con señales descritas como exclusivas del sistema SO (Bhriain et al. 1989).

Queda por demostrarse que efectivamente el SE celular del DNA esté actuando como un supranivel de regulación, el cual genera

condiciones de permisividad, para que un siguiente nivel, compuesto por reguladores específicos de cada sistema global, puedan o no actuar ante la presencia de señales inductoras en el medio.

Dos sistemas globales de regulación en los cuales no se ha evaluado la importancia que tiene el SE celular del DNA para su expresión, son los de respuesta al estrés por calor (HS) y el de respuesta a daño en el DNA (SOS). En estos sistemas, durante su inducción se dan cambios importantes en el grado de SE del nucleóide bacteriano, que se mide por los cambios en la densidad del mismo en gradientes de ficol (Rupp 1968; Drlica et al. 1975; Pellon et al. 1981). Los cambios en la densidad del nucleóide probablemente estén mediados por daño en una de las dos cadenas de DNA, lo cual permite la liberación de tensión estructural presente en la molécula de DNA (Pellon et al. 1980). Por otra parte los sistemas HS y SOS comparten algunas proteínas como Lon, GroE (Neidhardt et al. 1984; Donnelly et al. 1989; Walker 1984; Liu et al. 1990) y tienen agentes inductores comunes como Nov. y ácido nalidixico, aunque en diferentes dosis y sin que se expresen completamente las dos respuestas (Herrero et al. 1981; Hagensee et al. 1986; Krueger et al. 1983; Arrigo et al. 1988; VanBogelen et al. 1987). Esto sugiere la existencia de un mecanismo que permite coordinar a los dos sistemas globales. El interés del presente trabajo consiste en evaluar el papel del SE del DNA en las respuestas HS y SOS, proponiendo al SE como una señal importante en la coordinación de estas respuestas.

5) Respuesta celular al estrés por calor (HS).

Cuando la célula se somete a un estado de estrés por incremento en la temperatura del medio, esta responde accionando mecanismos que posiblemente le permiten contender con los diversos efectos adversos a su viabilidad, que la temperatura pudiera provocar. Estos mecanismos actúan a diferentes niveles, e incluyen la reubicación intracelular de proteínas (Velazquez et al. 1984), modificaciones en lípidos y proteínas (Arrigo et al. 1988; Ingraham 1987); así como una respuesta a nivel de transcripción, que permite la expresión de genes cuyos productos están posiblemente involucrados en una "termo tolerancia" de la célula (Li et al. 1982; Heikkila et al. 1985; Raina 1990).

La respuesta celular al estrés por calor fue descubierta inicialmente en moscas Drosophila, donde al ser tratadas con calor se presentaron modificaciones en los patrones de bandeado de los cromosomas politécnicos, lo cual se interpretó como síntesis nueva de RNA inducida por calor (Ashburner 1979). Posteriormente se describió esta respuesta en Escherichia coli, donde se mostró que se trata de una respuesta compleja que involucra alrededor de 17 genes dispersos en el cromosoma, y que son coordinados en su expresión, por una proteína sigma de peso molecular de 32 Kd. (Neidhardt et al. 1987). Esta proteína reguladora aumenta su concentración durante el HS. El incremento en la transcripción del gene de sigma 32, rpoH depende de sigma 70 y posiblemente también de un nuevo sigma 24 (Erickson et al. 1987; Wang et al. 1989).

La proteína sigma 32 induce la expresión de los genes reconociendo una secuencia específica de unión en el DNA en la región 5' del gen, este reconocimiento parece estar en competencia con la pro-

teína sigma 70 (Grossman 1985). Esta proteína es a su vez una proteína de HS. El gen de esta proteína, rpoD se transcribe con sigma 32 durante el estrés. Sigma 70 es el producto del gen RpoD y es el factor sigma funcional más importante fuera del estrés por calor (Neidhardt et al. 1987).

La respuesta al calor es un evento fisiológico transitorio en la célula, que le permite adaptarse a nuevas condiciones de crecimiento o resistir a eventos momentáneos de estrés intenso, pero no permanentes; para ello suspende parcialmente la síntesis de diversas proteínas y expresa preferencialmente las propias del heat shock.

6) Proteínas de HS.

De las proteínas que se inducen durante el HS sólo se conoce la función de unas cuantas; destacan GroEL, GroES y DnaK, a las cuales se les ha atribuido funciones de estabilización de otras proteínas durante el estrés de calor. Se propone que lo hacen formando agregados con esas proteínas, por lo que se ha dado en llamarlas proteínas chaperoninas (Ellis 1987; Bochkareva et al. 1988; Fayet et al. 1986; Jenkins et al. 1986; Deshaies et al. 1988). Tanto DnaK como GroE L y S son proteínas que se requieren también fuera de condiciones de estrés, siendo indispensables para el crecimiento bacteriano (Neidhardt et al. 1987).

Otro grupo de proteínas importantes inducidas durante el estrés está integrado por la proteína Lon, una proteasa que degrada al inhibidor de la división en E.coli SulA (Goff et al. 1985); la proteína DnaJ, necesaria para la replicación de DNA de fagos; la lisil tRNA

sintetasa tipo II (sólo activa en determinadas condiciones nutricionales); y GrpE que es una proteína involucrada en la iniciación de la replicación del fago lambda (Neidhardt et al. 1987; Ang et al. 1987).

Existen otras proteínas no identificadas pero que presentan homología con proteínas de HS de eucariotes. En el caso de la proteína C62.5, hay una homología del 30% con el gen hsp80 de eucariote (Bardwell et al. 1987).

7) Factor sigma 32.

La proteína sigma 32 es el producto del gen htpR, que posteriormente fue renombrado como rpoH, al descubrirse que se trataba de un factor sigma. El gen rpoH tiene cinco promotores, de los cuales tres son reconocidos por la proteína sigma 70 y uno por un posible nuevo factor sigma de peso molecular de 24 kilodaltones (Wang 1989). Estos promotores funcionan dependiendo de la temperatura del medio, a 30°C el promotor uno y cuatro, bajo la acción de sigma 70, produciendo el 90% del total de la proteína sigma 32, ya que ésta es requerida también fuera del HS, siendo las mutantes rpoH incapaces de crecer por debajo o arriba de los 30 grados centígrados. A los 43.5 grados principia el promotor tres a ser activado por acción de la proteína sigma 24, y a los 50 grados centígrados, que es temperatura letal, el promotor tres entra en función mientras que los promotores uno y cuatro son apagados completamente después de 20 a 30 minutos de comenzar el HS intenso. Este patrón de inducción se mantiene por tiempos largos (85 minutos o más). De los promotores de htpR, el cuarto y el primero han

sido caracterizados como dependientes del SE del DNA para su adecuado funcionamiento, aunque existe otro grupo de investigación en controversia en cuanto a la dependencia del promotor uno hacia el SE (Fujita et al. 1987; Ueshima et al. 1989; Erickson et al. 1987). El quinto promotor requiere para su expresión de la proteína cap y permanece activo hasta los 42°C (Nagar et al. 1990).

Al iniciar la respuesta HS, se presenta un incremento total de 5 veces la concentración celular de la proteína sigma 32 y de dos veces la concentración del RNA mensajero para esta proteína. Los máximos niveles se alcanzan minutos después de haber comenzado el estrés (Tilly et al. 1986; Straus et al. 1987), y la diferencia en los incrementos de concentración en la proteína con respecto a la cantidad de RNA mensajero, se explica por el incremento en las vidas medias de los mensajeros y una mayor traducción de éstos; ya que se ha postulado la existencia de una región reguladora negativa en la zona codificadora del mensajero para sigma 32, que deja de actuar al elevarse la temperatura del medio (Loeb et al. 1991). Mientras tanto, la síntesis de otras proteínas, no propias del HS, comienza a disminuir, dependiendo de la intensidad del HS, siendo de aproximadamente 5 minutos el tiempo que tarda en dejar de sintetizarse las proteínas no específicas de HS, cuando el cambio es de 30 a 50 grados centígrados, pero si el cambio es moderado (30 a 42 grados) el patron normal de síntesis de proteínas casi no varía (Neidhardt et al. 1984). Por otra parte las proteínas de HS comienzan a inducirse desde el inicio del HS con un retardo de sólo un minuto, aún antes de que sigma 32 incremente al máximo sus niveles, quizá a expensas de la reserva de proteína sigma 32 presente antes de haber entrado en el estrés. Por otra parte

la inducción de proteínas de HS mediada por sigma 32, puede interrumpirse por la acción de rifampicina (Yamamori 1980).

8) Inductores de la respuesta HS.

El inductor característico de la respuesta HS es el calor, aunque existen otros agentes capaces también de inducir total o parcialmente esta respuesta. Entre estos agentes está el etanol, la puromicina, infecciones virales, el ácido nalidixico, agentes metilantes, ayuno de aminoácidos, peróxido de hidrogeno, agentes alquilantes y cloruro de cadmio (Van Bogelén et al. 1987; Neidhardt et al. 1987). Estos agentes inducen una respuesta similar, pero no idéntica, a la respuesta por estrés de calor, e inducen la expresión de proteínas de otros sistemas globales de regulación como el de respuesta a estrés oxidativo y respuesta SOS (VanBogelen et al. 1987; Krueger et al. 1983; Hagensee et al. 1986).

A pesar de conocerse los agentes inductores de la respuesta HS, aún se ignora la manera por la cual, teniendo diferentes blancos de acción en la célula, pueden inducir la síntesis de sigma 32 y con ello el sistema de HS; más aún, se desconoce si la inducción de las diferentes proteínas que participan durante el HS es siempre dependiente de sigma 32, o si existen reguladores alternos para los diferentes agentes inductores (Grossman 1985).

Se han postulado tres mecanismos para activar la respuesta HS y debido a que aún no se ha descrito cual es, en la célula, la señal inductora del HS, no ha sido posible evaluar estas tres hipóte-

sis. La primera plantea la posibilidad de que diversos agentes inductores generen una señal común para activar la respuesta: la segunda propone que diversos agentes inductores generan diferentes señales, pero que estas señales actúan directamente en la inducción del gen rpoH y la tercera propone que los diferentes agentes inductores generan diferentes señales con blancos distintos capaces de generar segundas señales que son participes de una ruta de cascada bioquímica que como blanco final tiene al gen rpoH (Neidhardt et al. 1987).

9) Protección térmica.

El fenómeno de termo protección se ha descrito en diversos sistemas, entre ellos levadura y E.coli. Esta protección se induce con tratamientos térmicos moderados anteriores al cambio fuerte de temperatura, para evitar que se pierda viabilidad en el cultivo, en comparación a cuando, sin un tratamiento previo, se realiza el cambio brusco de la temperatura del cultivo (Li et al. 1982; Heikkila et al. 1985; Raina et al. 1990). La pérdida de viabilidad en el cultivo es proporcional al delta del cambio en la temperatura y al tiempo de exposición al estrés. Sin embargo, se desconoce la razón de la pérdida en la viabilidad. Tampoco se conoce el mecanismo molecular de la termo-protección, pero se cree que la inducción de proteínas que estabilizan la estructura de otras proteínas, y que son llamadas chaperoninas está involucrado en este comportamiento. Por ejemplo, se sabe que una sobrecarga de las proteínas GroEL y GroES, suprime la termo-sensibilidad de diversas mutaciones (Kusukawa et al. 1988).

Recientemente se ha descrito la existencia de un gen llamado

htrC (Raina 1990), que induce su transcripción durante el HS y que está situado en el minuto 90 hacia la región 3' del gen rpoC. Mutantes en este gen presentan lisis al subir la temperatura del medio de 30 a 42 grados centígrados; no se sabe la manera en la que actúa esta proteína, pero está involucrada en la sobrevivencia de la bacteria al estrés por calor.

En relación a la muerte celular durante el HS, nuestro grupo de investigación mostro que las células proximas a dividirse son más susceptibles a la lisis por calor, señalando a la división celular como un evento importante en la comprensión de la lisis durante el estrés por calor.

10) Detección de la respuesta HS.

Para caracterizar el HS se utiliza el marcaje radioactivo de proteínas sintetizadas durante el estrés, ya que durante el mismo, el patrón normal de expresión de las proteínas se modifica de manera importante dependiendo de la intensidad del estímulo. Existen diversos grados de estrés calórico y cada uno induce una modificación característica en la expresión de proteínas, de forma que células sometidas a un HS de 30 a 42 grados expresan diferentes proteínas a cuando se somete a un estrés de 30 a 45 o 50 grados.

Cuando un cultivo de bacterias a 30° centígrados se incuba a 50°. la síntesis de las proteínas codificadas por genes que no son parte del regulón HS, disminuye se sintetizan preferencialmente las proteínas propias de HS. Esta síntesis se detecta aún varias horas

después del cambio de temperatura.

Por otra parte, durante el HS los mRNA de otros genes permanecen sin ser degradados y traducidos, y se ha propuesto que al salir del estado de estrés, es con los mensajeros que dejaron de traducirse, que se reinicia la actividad normal de la célula (Neidhardt et al. 1987).

11) La respuesta SOS.

La respuesta SOS es también un sistema global de regulación, que está integrada por genes dispersos en el cromosoma; tiene un regulador central y posee genes que se comparten con otros sistemas globales. A diferencia de la respuesta HS, se conoce con precisión el agente inductor de la respuesta es el daño al DNA (Walker 1984; Little et al. 1982; Gottesman 1981).

El sistema SOS tiene en su repertorio, más de 17 genes inducibles que tienen como represor común de su expresión a la proteína LexA (Little et al. 1981; Brent et al. 1981). Esta proteína, a su vez, es parte de la misma respuesta SOS. La proteína reguladora de este sistema es RecA, la cual al presentarse daño en el DNA, e independientemente de cual fue el agente inductor del daño, modifica su comportamiento como proteína de recombinación (Radding 1981; Salles et al. 1983), y adquiere una actividad tal que permite la proteólisis de las proteínas LexA y CI (Little et al. 1984; Roberts et al. 1975; Roberts et al. 1977; Roberts et al. 1978). La proteína LexA es un represor de la transcripción de genes dispersos en el cromosoma bacte-

riano, mientras que CI reprime genes del bacteriófago Lambda. Aún se desconoce como el daño en el DNA modifica la actividad de RecA.

12) Represor LexA

Una vez que la proteína LexA se rompe por proteólisis, los genes reprimidos por ella, inician la síntesis de RNA mensajero para su posterior traducción, incluyéndose el gen que codifica para la misma proteína LexA. Los productos de estos genes están involucrados en la reparación del DNA, y se sintetizan hasta que el daño en el DNA se repara, por lo tanto la señal inductora de la actividad proteolítica de RecA disminuye, aumenta la concentración de LexA activa, y esto reprime nuevamente la transcripción de los genes SOS (Walker 1987).

La proteína LexA, no tiene la misma afinidad por todos los promotores. Cuando disminuye la cantidad de la proteína LexA en la célula, uno de los primeros genes en desreprimirse es lexA, lo que aumenta nuevamente la concentración de la proteína LexA y mantiene el estado de represión en todos los demás genes (Little et al. 1982). Esta diferencia de afinidades puede explicar en parte, el que durante la respuesta SOS existan genes tempranos en su expresión como los uvr y genes tardíos como en el caso de lon, el cual también es parte del sistema HS (Walker 1987; Neidhardt et al. 1987).

La respuesta SOS, a diferencia de la respuesta HS, requiere de mayor tiempo para activar la síntesis de todos sus genes, tardando de treinta a sesenta minutos, mientras que el HS lo hace en diez a quince minutos. Además los genes del sistema SOS son en general dis-

pensables, en tanto que muchos de los genes del sistema HS son esenciales.

OBJETIVOS.

El presente trabajo tiene como objetivo general, evaluar la importancia que la estructura del DNA, mediada por el SE, tiene en las respuestas HS y SOS.

Para abordar el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- estudiar la respuesta HS, cuando previamente a la inducción del estrés se ha relajado el SE del -- cromosoma bacteriano.
- estudiar la respuesta HS en células donde, simultáneamente a la inducción del estrés, se disminuye el grado de SE del DNA cromosomal.
- determinar si el SE del DNA tiene la misma importancia en la respuesta HS en diferentes fases del crecimiento bacteriano.
- estudiar la posible interrelación del sistema SOS con el HS para la viabilidad de la bacteria después del estrés.
- determinar si alguno o varios de los genes del sistema SOS tienen dependencia, para su expresión

del grado de SE del DNA celular.

- evaluar el balance de actividades enzimáticas de las topoisomerasas durante la respuesta HS y SOS mediante el uso de plásmidos reporteros.

MATERIAL Y METODOS.

1) Cepas y plásmido.

Se emplearon las siguientes
cepas de Escherichia coli K12:

Cepa	Genotipo mas importante y procedencia.
AB1157	F-; thr-1; leu-6; thi-1; lacY-1; galK-2; ara-14; xyl-5; mtl-1; proA-2; argE3; rpsL31; tsx-33; \-; supE44; his-4; recE- (Kenyon <u>et al.</u> 1982)
JC2924	como AB1157. recA56. (Clarke, J.)
GW1000	recA441; sulA11; lacU169; thr-1; leu-6; his-4; argE3; ilv(ts); galK2; rps31; (Kenyon <u>et al.</u> 1982.)
GW1010	como GW1000, dinA1::Mud(Ap,lac) (Kenyon, 1980; Kenyon, 1982)
GW1040	como GW1000, dinD1::Mud(AP,lac) (Kenyon <u>et al.</u> 1980; Kenyon <u>et al.</u> 1982)
GW1104	como GW1000, umuC::Mud(Ap,lac); malE::Tn5.
GW1105	como GW1104, lexA3.

K165 F-; lac(am); trp(am); pho(am); mal(am);
rpsL; sup4(ts); htpR(am). (Yamamori et. al.
1982; Goff et al. 1985; Krueger et al.
1983).

KRE447 silvestre. (Rudd et al. 1987).

KRE449 gyrA43(ts). (Rudd et al. 1987).

W3110 F-; \-; prototrofa.

pMS01 derivado de pBR322, sin resistencia a
tetraciclina, construido en el labora-
torio de Gómez.E.C. por Jaime Martínez.

2) Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados fueron LB y mínimo M9 según Miller (1872). El medio M9 se suplementó con 20 µg/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos: leucina, prolina, arginina, histidina, timina y glutamina.

En los casos en que se empleó novobiocina, ésta se utilizó en concentraciones de 20 y 600 µg/ml en el medio mínimo, según si se aplicó desde el inicio del cultivo o fue aplicada en pulso ya iniciado el cultivo.

Tanto la rifampicina como el cloranfenicol se emplearon a 50 µg/ml de concentración final.

3) Reactivos.

Como marcador de peso molecular de proteínas, se empleó el estándar del sistema Bio-Rad, para electroforesis con SDS.

Tanto la cloroquina, la mitomicina C, así como la novobiocina empleados se obtuvieron de Sigma.

4) Marcaje de proteínas.

Para marcar proteínas se empleó S^{35} -Met Amersham, 10 μ Ci/ml en medio mínimo.

5) Electroforesis de proteínas.

Se llevó a cabo según la técnica de Laemmli (1970), y Shapiro et al. (1967) para SDS, y en el caso de doble dimensión, según O'Farrell (1975).

6) Transformación.

Se realizó según Chung et al. (1989), que emplea polietilenglicol 8000 al 20%, dimetilsulfóxido 10% y sulfato de magnesio 100 mM a pH 6.5, en medio Luria, (solución TSS-2X).

El cultivo de la bacteria a transformar se diluye 1:1 en la solución TSS 2X y se toma 0.1 ml del cultivo para ponerse en contacto con 100 pg de DNA del plásmido pMS01, durante 30 minutos a 4 grados centígrados: posteriormente se añade 0.9 ml de medio LB suplementado con 20 mM de Glucosa y se deja incubar a 37 grados durante una hora

para expresión de resistencia a ampicilina, antes de seleccionar en cajas LB con ampicilina 200µg/ml.

7) Electroforesis de topoisómeros.

A partir de 5 ml de cultivo en Luria con una DO a 550 de 0.4 y de 0.2 cuando se creció en medio mínimo, se extrajeron los plásmidos por lisis alcalina según Sambrook et al. (1989), sin extracción fenólica, con tratamiento de RNasa 1mg/ml.

Las muestras de DNA fueron sometidas a electroforesis en presencia de 10 o 25 µg/ml de cloroquina para favorecer la separación del plásmido pMS01 en sus diferentes topoisómeros, según si se deseaba que migrarán más rápido o menos rápido, respectivamente, los topoisómeros con mayor grado de SE. Se empleó buffer de Tris 90 mM, Acido Borico 90 mM, y EDTA 10 mM (TBE), un voltaje constante de 2.5 V cm, durante 20 hrs. y la electroforesis se llevó a cabo en agarosa al 1%. Posteriormente, durante 4 hrs se incubó el gel en agua destilada y se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml durante 30 minutos. El gel iluminado con luz ultravioleta a 360 nm fue fotografiado con filtro rojo (Dorman et al. 1988).

8) Sistema in vitro para medir actividad de topoisomerasas.

Se emplaron las siguientes soluciones:

A: Sacarosa al 10%, Fosfato de potasio 0.08 M pH 7.9

B: Fosfato de potasio 0.08 M pH 7.9, Sacarosa 8%, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM, y tRNA de E. coli. 100 µg/ml.

C: EDTA 0.2 M y Azul de bromofenol 400 µg/ml.

D: Tris 50 mM pH 7.6, KCl 20 mM, MgCl₂ 10mM, Dithiotreitol 2 mM, ATP 1.5 mM, Espermidina 5 mM, y Albumina 50 µg/ml.

E: Tris 50 mM pH 7.6, KCl 20 mM, Dithiotreitol 2 mM, y Albumina 50 µg/ml.

F: SDS 2%, Ficoll 20%, y Azul de bromofenol 400 µg/ml.

Se centrifugaron 5 ml de cultivo en Luria a 5000 rpm por 10 minutos, en el rotor SS34; se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de solución A. Se centrifugó nuevamente a las células y se les resuspendió en 0.5 ml de solución A, para ser sonicadas dos veces 10 segundos en hielo. Se centrifugó el sonicado y se realizó el ensayo con el sobrenadante (Liu, 1983; Martin et al. 1983; Kenneth et al. 1983; Hsieh et al. 1983; Otter et al. 1983).

Ensayo para topoisomerasa I.

A 1 µg del extracto de células sonicadas, se le adiciona 5 µl del plásmido reportero en solución B y se incuba 40 minutos a 42 grados centígrados. Se interrumpe la reacción agregando 2 µl de C y 5 µl de colorante para DNA. Posteriormente se separan los topoisómeros por electroforesis en geles de agarosa-cloroquina.

Ensayo para topoisomerasa II.

A 1 µg de extracto de células sonicadas, se le agrega 5 µl de plásmido reportero en solución D, y 5 µl de solución E. se Incuba 30 minutos a 30 grados centígrados y se para la reacción con 7 µl de F y 5 µl de colorante para DNA. Se separa los topoisómeros por electro-

foresis.

9) Medición de actividad para B-galactosidasa.

Se realizó según el método descrito por Miller (1972)

RESULTADOS Y DISCUSION.

I) Efecto de novobiocina (Nov.) en la respuesta al estrés por calor (HS) en cultivos de Escherichia coli en diferente fase de crecimiento.

Para observar la respuesta HS, en condiciones adecuadas, a nivel de síntesis de proteínas, se probaron diversas temperaturas como inductores de la misma y se marcó con L-[³⁵S] Metionina las proteínas sintetizadas durante los primeros minutos después del cambio de temperatura. Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis en gel, y se obtuvo la autoradiografía del gel seco (ver Material y Métodos). Los resultados muestran, como se esperaba, que la intensidad de la respuesta celular depende del delta de temperatura (Fig.1). Por lo que se decidió trabajar con un estrés de 30 a 50 grados centígrados.

En los experimentos anteriores, dos bandas de pesos moleculares de 69 y 62 Kd. fueron las de mayor intensidad durante el HS, por lo que se decidió identificarlas en una separación de doble dimensión tipo O'Farrel (Fig.2). En la primer dimensión del gel, las dos proteínas mostraron un punto isoeléctrico de 5.9. y en la segunda, los pesos moleculares ya mencionados. Los pesos moleculares y el punto isoeléctrico de estas proteínas corresponden a DnaK (69Kd) y GroE (62Kd), cuyos patrones en geles ya han sido reportados.

Por otro lado, al ser la Nov. un antibiótico de efectos pleiotrópicos, y por desearse que solamente desarrollara al genoma

bacteriano, afectando lo menos posible la fisiología de la célula, se buscó la dosis adecuada para lograr lo anterior.

Se realizaron experimentos de crecimiento bacteriano en presencia de diversas concentraciones de Nov. en medio mínimo M9. Usando la curva de crecimiento del cultivo como un parámetro importante para conocer en términos generales la fisiología de la bacteria (Fig.3) se eligió una concentración de Nov. de 20 µg/ml.

Para verificar que esta dosis de Nov. relaja al DNA bacteriano, se transformó a la bacteria AB1157 con el plásmido reportero pMS01. y mediante la distribución de sus topoisómeros, se determina indirectamente el grado de SE del DNA celular. También se probó con 600µg de Nov., para experimentos en los cuales el antibiótico se añadió al momento de realizar el cambio de temperatura (Fig.4). Se observó que: 20µg/ml de Nov., presente durante todo el tiempo en el cultivo, modifica el SE celular sin alterar la curva de crecimiento, mientras que 600µg/ml de Nov. modifican el SE del DNA a los 5 min de añadirse al cultivo.

Para el estudio del comportamiento de la respuesta HS en diferentes condiciones de SE celular, se emplearon dos estrategias: a) explorar el HS en diferentes fases del crecimiento bacteriano, ya que entre mayor es el crecimiento del cultivo, menor es el grado de SE del DNA cromosomal, y b) el uso de Nov. en el medio de cultivo como otra forma de modificar el SE. El experimento se realizó tomando tres muestras de un cultivo de E.coliK12 AB1157 en diferentes fases del crecimiento: D.O.600nm 0.08, 0.13 y 0.23 que corresponden a las fases inicial, temprana y media de la curva de crecimiento bacteriano. En

medio M9, la fase estacionaria tiene una densidad de 0.4 a D.O. 600nm. Cada muestra fue separada en dos, una parte se utilizó para marcar proteínas totales a 30' centigrados y la otra para ser sometida al HS de 50°C marcando proteínas totales. Se realizó un experimento similar con células cultivadas en presencia de Nov. (20µg).

De este primer experimento se pudo observar que la presencia de Nov. previa al inicio del HS, ocasiona que la intensidad de las bandas propias de las proteínas de HS se vean disminuidas en comparación a las que presenta el cultivo en ausencia de Nov. Esta diferencia en intensidades es más clara en las células de la fase inicial de crecimiento (Fig. 5).

Una segunda observación de este experimento es, que el número de proteínas, que se expresan en el HS, varía dependiendo de la fase de crecimiento en la cual se realizó el marcaje, de tal forma que los carriles de proteínas de células con D.O. 0.23, muestran mayor número de proteínas que los carriles de muestras de células de cultivos a D.O. 0.08. Esta diferencia se observa tanto en las células control como en las cultivadas en presencia de Nov. Este resultado sugiere que la respuesta HS no es igual en células en diferente fase de crecimiento.

Cabe señalar que las diferencias observadas en la síntesis de proteínas durante HS en presencia o ausencia de Nov., fueron siempre mínimas y difíciles de reproducir, por lo que es necesario confirmar estas observaciones con otras metodologías; posiblemente aumentar las dosis de Nov. y la evaluación de transcritos de RNA sea lo más adecuado.

Por último, es importante hacer resaltar que las diferencias entre cultivos con y sin Nov. se observan en el total de las proteínas inducidas por el HS. Esto sugiere que la expresión de los genes de las proteínas de HS se modifican de manera similar al relajarse el DNA o bien que Nov. afecta la expresión de RpoH y secundariamente la de las proteínas HS, ya que se sabe que in vitro el regulador de la respuesta HS posee al menos un promotor dependiente del SE celular.

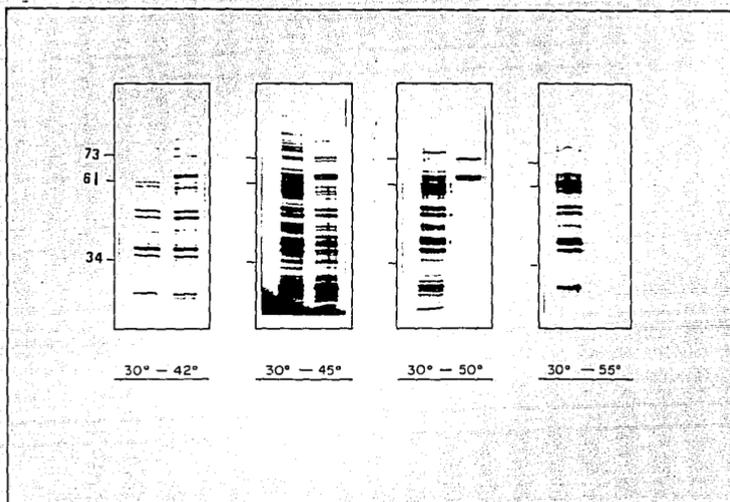


Figura 1: Efecto de la intensidad del estrés de calor en la síntesis de proteínas de HS.

Proteínas de células AB1157 en HS de diferente intensidad: 42, 45, 50 y 55 grados centígrados. Las células se crecieron en M9 a $DO_{500nm} = 0.2$ y se sometieron al estrés durante 15'. El marcaje se realizó con Metionina S^{35} $10\mu Ci\ ml^{-1}$.

Se muestra cada patrón de expresión de proteínas de HS con su correspondiente control a 30°C.

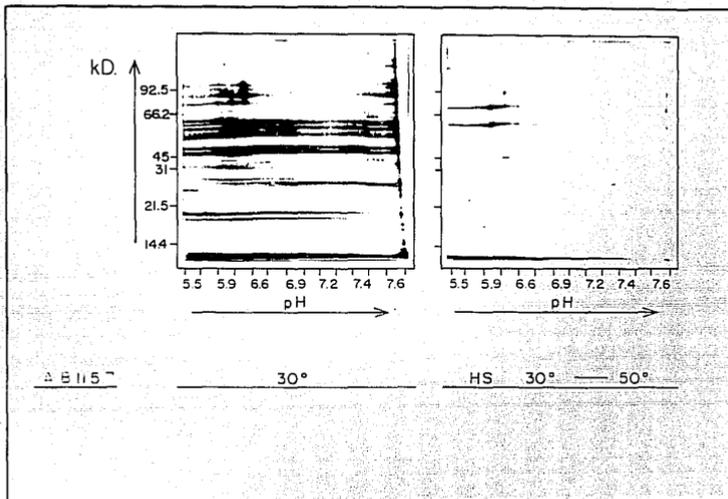


Figura 2: Identificación de las proteínas DnaK v GroEL.
 Separación de proteínas en geles bidimensionales tipo
 O'Farrell de la cepa AB1157 a 30°C y 50°C 15'. Las
 células se crecieron en M9 a DO_{600nm} 0.2.

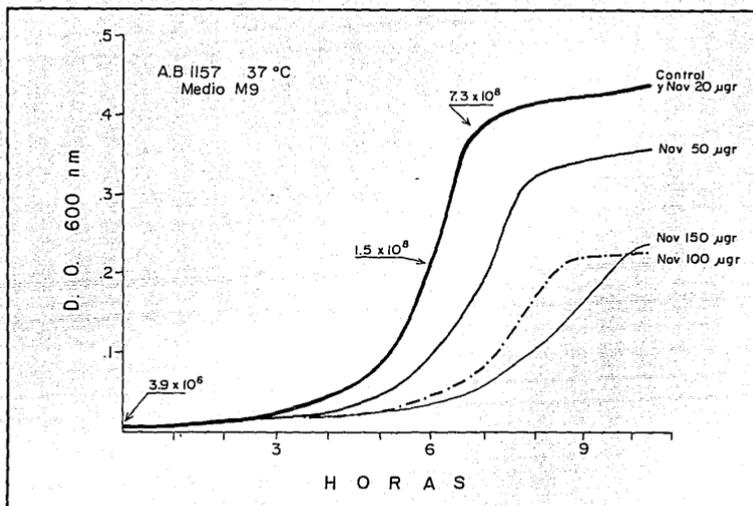


Figura 3: Efecto de la Nov. en el crecimiento de AB1157.

Curva de crecimiento de la cepa AB1157 a 37°C con aereación en presencia de diferentes concentraciones de novobiocina 20, 50, 100 v 150 µg ml⁻¹ desde el inicio del crecimiento bacteriano. El numero correspondiente a cada flecha muestra el numero de células/ml en ese punto de la curva.

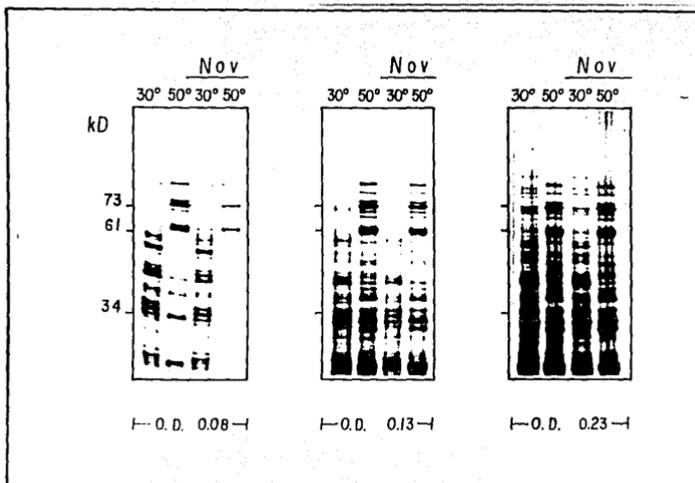


Figura 5: Efecto de la Nov. en la expresión de proteínas de HS en diferentes fases de crecimiento.

Expresión de proteínas de HS a 50°C en presencia de 20µg ml⁻¹ de novobiocina o en ausencia de antibiótico. La cepa AB1157 se creció en M9 a DO de 0.08, 0.13 y 0.23 y el HS fue durante 15'. Cada experimento presenta su control a 30°C.

II) Efecto de la Nov. dos diferentes tiempos de estrés por calor en células de diferentes fases de crecimiento.

Por ser el HS una respuesta transitoria, es posible que existan momentos en los cuales la respuesta se encuentre más comprometida con el estado estructural del cromosoma bacteriano. Por lo que se evaluó la respuesta HS en presencia de Nov. en diferentes tiempos de inducción.

Para poder ver el efecto de Nov. en la síntesis de proteínas de HS, se realizó un experimento de marcaje de proteínas en presencia o ausencia del antibiótico con distintos tiempos de duración del estrés: 0, 5', 10', 15' y 20' minutos (Fig.6). El efecto de la Nov. en la respuesta HS fue más acentuado a los 5, 10 y 15 min. en los que se observó una pequeña disminución en la cantidad de las proteínas de HS.

Debido a que el efecto de Nov. en el HS se apreció mejor durante las fases iniciales del cultivo, se decidió emplear dos D.O. para estudiarlo. Se colectaron células crecidas a 30°C a D.O. 0.11 y 0.23 y se les sometió a HS de 50°C durante 10 y 15 minutos, marcando las proteínas durante 10 min (Fig.7).

Es posible advertir un ligero efecto de Nov. en la inducción de la respuesta HS, que al igual que el experimento anterior (Fig.5), presenta una disminución en la síntesis de proteínas durante el HS, pero que es dependiente de la fase de crecimiento y de la duración del estrés.

Durante el crecimiento celular, son acumulados en la

célula productos protéicos como GroE y DnaK, que son miembros del grupo de proteínas de HS. lo que sugiere que a medida que avanza la fase de crecimiento, la inducción de los genes para estas proteínas durante el estrés, varíe dependiendo de la fase de crecimiento, y sea por ello que el efecto de Nov. también es diferente. Por otro lado, se sabe que durante el crecimiento bacteriano existe disminución de SE del cromosoma, por lo que el efecto de la Nov. deberá ser mayor en tanto que la célula requiere estados fisiológicos con alto grado de SE.

La presencia continua de Nov. en el medio, puede causar cambios fisiológicos en la célula que impidan observar adecuadamente el efecto de Nov. en el HS. siendo quizás una estrategia más adecuada la de presentar y luego retirar el antibiótico de la célula, momentos antes de iniciar el estrés, con la finalidad de ver el efecto de Nov. en el HS añadido antes de la inducción, y no sumar así, los efectos ocasionados por mantener el antibiótico en el medio una vez que se ha iniciado la respuesta.

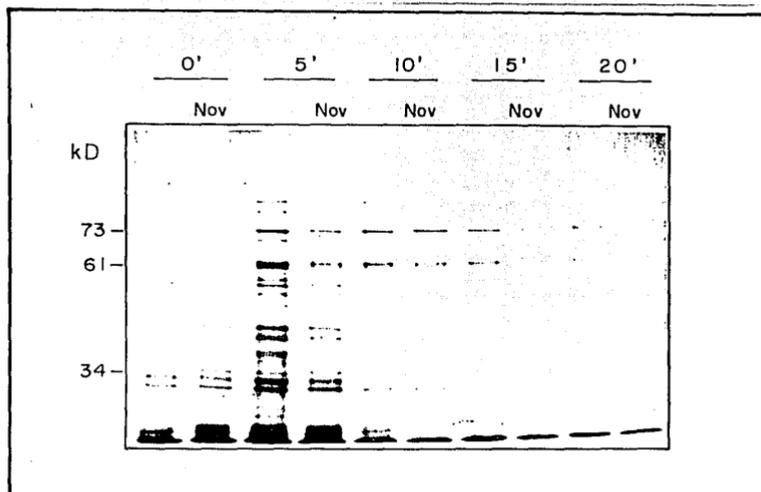


Figura 6: Efecto de Nov. en la inducción de proteínas de HS a diferentes tiempos de inicio del estrés.

Proteínas de HS inducidas después de distintos tiempos de incubación a 50°C. La cepa AB1157 se creció a DO de 0.2 en M9 en agitación y a 30°C. La novobiocina estuvo presente desde el inicio del cultivo a 20µg ml⁻¹.

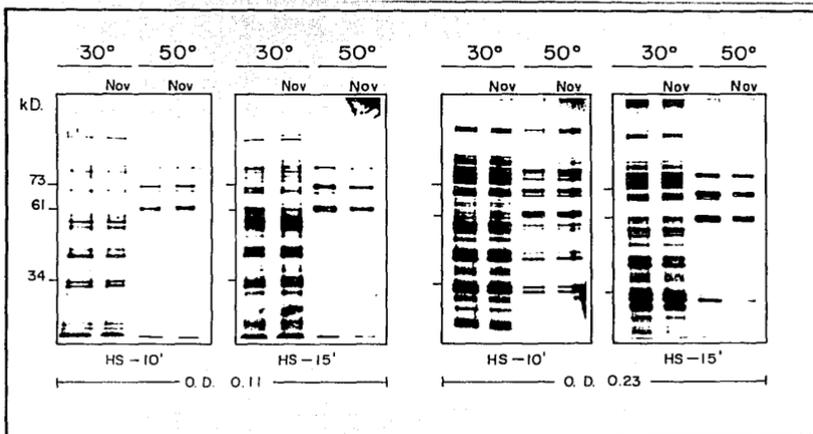


Figura 7: Efecto de la novobiocina en la inducción de proteínas de HS a dos distintos tiempos de exposición al estrés y dos diferentes fases de crecimiento.

AB1157 se creció en M9 a 30°C a DO de 0.11 y 0.23 y la novobiocina se añadió desde el inicio del cultivo a 20µg ml⁻¹.

III) Modificaciones en el superenrollamiento del DNA durante el estrés de calor.

Se ha reportado que durante el HS existen importantes cambios en la densidad del nucleóide bacteriano, lo cual puede ser explicado por la presencia de cortes en las cadenas de DNA (Pellon *et al.* 1980). Por esto, se decidió explorar la actividad celular de las enzimas topoisomerasa I y II *in vivo*. Para ello las células se expusieron a 50°C por 5, 10 y 15 min.

La actividad celular para SE al DNA se determinó indirectamente con un plásmido reportero. La distribución de topoisómeros del plásmido reportero, muestra un incremento en el grado de SE del plásmido, a partir de los primeros 5 min. que fue mayor a tiempos más largos de HS (15 y 20 min). (Fig.8).

Se verificó el comportamiento del SE del plásmido durante el HS en diferentes fases de crecimiento del cultivo, observándose cambios más acentuados de SE en las células de cultivos con 0.2 de D.O. 600nm, expuestas a 50 grados por 20 minutos de HS a 50 grados (Fig.9).

Resulta aparentemente contradictorio que durante la respuesta HS exista un mayor grado de SE del DNA de los plásmidos reporteros, en lugar de relajarse el SE como se ha reportado para el cromosoma bacteriano.

Sin embargo, debido al tamaño del plásmido reportero, éste responde al balance global de la actividad enzimática que genera el SE del DNA, y no refleja los eventos de corte sencillo presentes

durante el HS en las cadenas de DNA, ya que deben ser poco frecuentes para moléculas del tamaño del plásmido utilizado, aunque si suficientes para relajar el DNA cromosomal, el cual es aproximadamente 1623 veces más grande que el plásmido.

Es también notable que a pesar de que en etapas más avanzadas del cultivo, cuando el genoma bacteriano se encuentra más relajado (lo cual se ve por la distribución de topoisómeros controles Fig.9), siga dándose un incremento en el SE del DNA durante el HS, en vez de ser éste un evento más moderado. Por último queda por cuestionarse a qué nivel de regulación es controlado el evento de SE durante el HS.

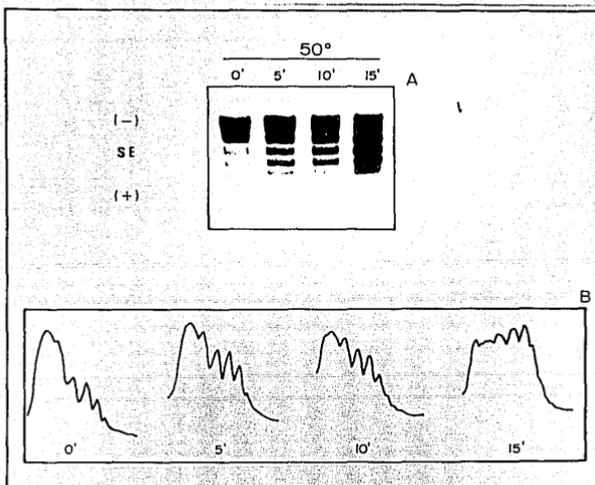


Figura 8: Cinética de la modificación de SE del plásmido reportero durante el HS.

A) Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de topoisómeros del plásmido pMSO1 en la cepa AB1157 sometida a HS de 50°C durante diferentes tiempos. La cepa AB1157 se creció en M9 a DO de 0.2

B) Gráfica de la distribución de los topoisómeros a diferentes tiempos.

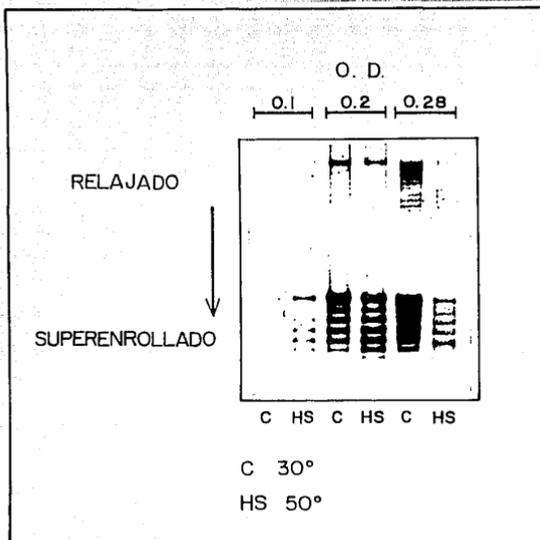


Figura 9: Efecto de la fase de crecimiento en la modificación del SE del plásmido reportero durante HS.

Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de topoisómeros de pMSO1 en AB1157 a diferentes densidades ópticas en HS de 50°C 15'.

La cepa AB1157 se creció con agitación (200rpm) en M9 a 30°C.

IV) Efecto del cloranfenicol y la rifampicina en el superenrollamiento de los plásmidos reporteros en células en estrés por calor.

Con el objeto de estudiar si el incremento del SE celular durante el HS, requiere de la síntesis de nuevas proteínas, se agregó cloranfenicol al medio, a diferentes tiempos después de iniciado el HS. El incremento en el SE del DNA, se presentó cuando el antibiótico se añadió 5 minutos después de iniciarse el estrés (Fig.10). Por el contrario, al añadirse el antibiótico al inicio del estrés, se impedía el efecto observado en el SE. Por lo cual se infiere la necesidad de síntesis de proteínas durante los primeros cinco min. del HS, para que se dé el incremento de SE en el DNA.

Para analizar el tipo de HS que se tiene en presencia de cloranfenicol, se marcó a las proteínas celulares durante el HS, añadiendo cloranfenicol a diversos tiempos de iniciado el estrés. Se observó que la respuesta al HS, a nivel de síntesis de proteínas, se inhibe aún cuando se dan 5 minutos de estrés previos a la adición del antibiótico (Fig.11). Esto permite suponer la existencia de un mecanismo independiente de la respuesta general de HS, que regula los niveles de SE celular del DNA en las condiciones de estrés por calor.

Para determinar si la regulación de la actividad de SE durante el HS, es a nivel de transcripción, se empleó la rifampicina en el medio de cultivo. Este antibiótico se añadió 10 minutos antes de un HS de 15 minutos a 50°. En total fueron 25 minutos en presencia del antibiótico. Se observó que la rifampicina no inhibe el incremento del SE en los plásmidos durante el HS (Fig.12).

Se estudió si las proteínas de HS podían expresarse en presencia de rifampicina, para lo cual se marcaron las proteínas durante el estrés, con y sin rifampicina en el medio. El antibiótico se añadió a diferentes tiempos previos al estrés (Fig.13). La síntesis de proteínas de HS se inhibe, pero otras proteínas se expresan durante el HS aún en presencia de rifampicina.

Se puede concluir que el efecto en el SE del DNA durante el HS, depende de la síntesis de al menos una proteína que se induce durante el HS. Esta proteína podría ser una girasa, o bien alguna chaperonina que estabiliza a la girasa en temperaturas altas. Esa proteína, posiblemente no pertenece al grupo de las de HS, ya que la rifampicina, que bloquea la síntesis de las proteínas de HS (Yamamori et al. 1980), no es capaz de evitar su síntesis. Cabría preguntarse si existe relación entre el SE en HS y el regulador sigma 32.

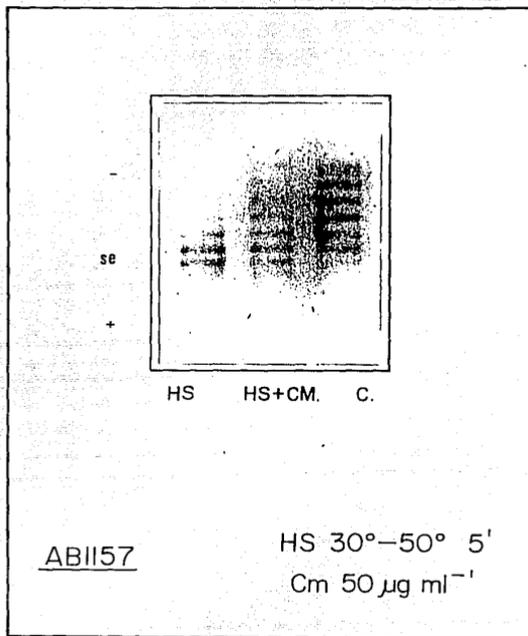


Figura 10: Efecto del cloranfenicol en la distribución de topoisómeros durante el HS.
 Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de toposómeros del plásmido pMS01.
 Se creció la cepa AB1157 en M9 a 30°C a DO de 0.2 en agitación y se sometió a HS de 50°C durante 10'.
 El cloranfenicol, se añadió 50 µg ml⁻¹ a una concentración de 5' después de iniciar el HS.

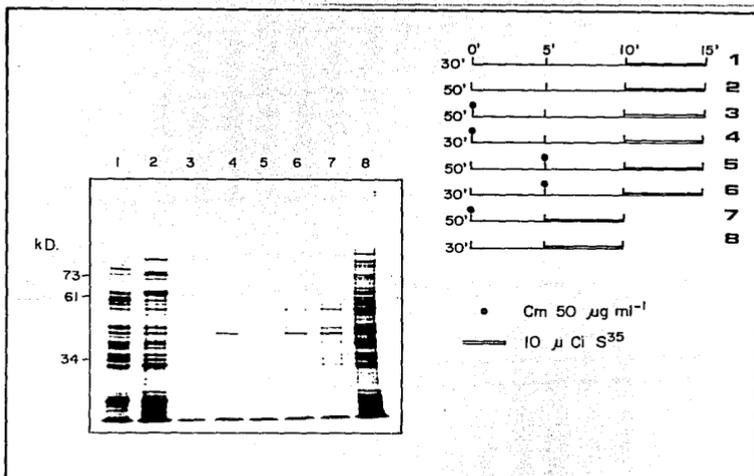


Figura 11: Expresión de proteínas durante el HS en presencia de cloranfenicol.

La cepa AB1157 se creció en M9 a estandarizar a D.O. de 0.2 a 30°C

El cloranfenicol se añadió a 50µg ml⁻¹ en diferentes momentos del HS. El estrés fué a 50°C durante 15' y 10' y se marcó durante los últimos 5 minutos con 5-35 Metionina 10uCi ml⁻¹.

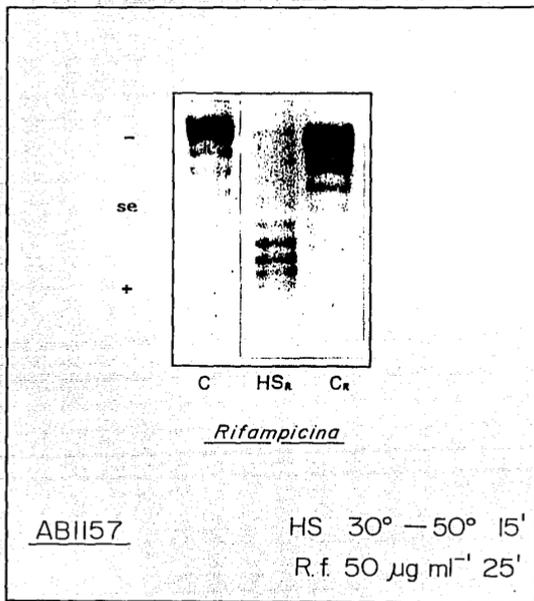


Figura 12: Efecto de la rifampicina en el SE de los plásmidos durante el HS.

Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de topoisómeros del plásmido pMSO1 en la cepa AB1157 en presencia de rifampicina durante el HS. El HS fue de 50°C 15'.

Se añadió la rifampicina a una concentración de 50µg ml⁻¹ 10' antes de iniciar el HS. La figura muestra dos controles con y sin rifampicina.

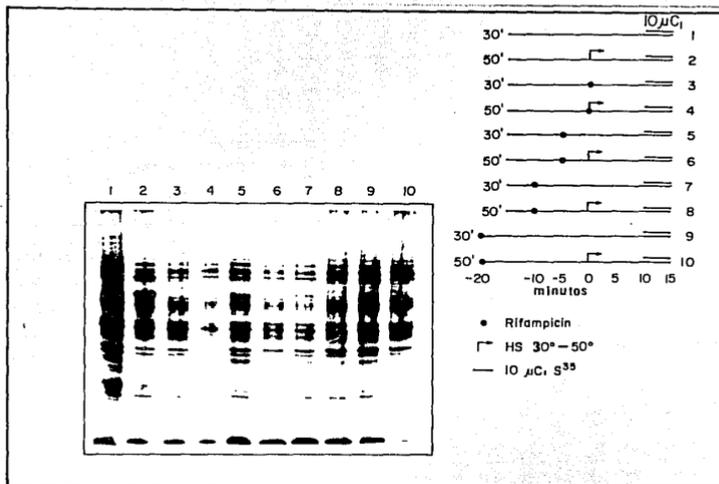


Figura 13: Síntesis de proteínas durante el HS en presencia de rifampicina.

Proteínas de HS en presencia de rifampicina añadida en diferentes momentos antes o al inicio del HS.

La cepa AB1157 se creció en M9 a DO de 0.2 a 30°C y se sometió a HS de 50°C 15'. Las proteínas se marcaron con S-35-Met como se indica en el esquema de la derecha. La rifampicina se añadió a 50 μg ml⁻¹.

V) Papel de la proteína sigma 32 en la modificación del superenrollamiento del DNA durante la respuesta al estrés por calor.

Para estudiar el papel de la proteína sigma 32 en el SE de los plásmidos reporteros, se transformó la cepa K165 con el plásmido pMS01. Esta cepa tiene un supresor ámbar termo sensible y una mutación ámbar en rpoH. A 42° el supresor no es funcional, por tanto no se sintetiza sigma-32 y no se induce la respuesta HS. En estas condiciones se realizó el ensayo de HS en la cepa AB1157 como control, en la K165 y en una K165 revertante caracterizada para termo-resistencia. Los resultados se presentan en la Figura 14 y muestran que tanto la K165 como su revertante, no generaron el incremento de SE durante el HS, sino que, al contrario, se aprecia una tendencia a formar topoisómeros con menor grado de SE. Como no se ha estudiado el mecanismo para termo-resistencia de la K165 revertante, no es posible explicar el resultado con los topoisómeros en esta cepa.

Con el objeto de conocer si el incremento en la actividad para SE a los plásmidos reporteros, es particular del HS, o si se trata de una respuesta generalizada de sistemas de estrés relacionados, se decidió comparar el efecto del calor en los topoisómeros, con el efecto del etanol, que es un inductor alternativo para una respuesta similar a la del HS. Se empleó la cepa W3110 como alternativa de silvestre a la AB1157 y la K165. Los resultados se muestran en la Figura 15. Etanol al 1% y 10% tanto en la W3110 como en la K165, induce una disminución en el grado de SE del plásmido reportero; por tanto el incremento en la capacidad celular para SE al DNA parece ser particular del estrés por calor.

Para comprobar que sin la síntesis de sigma 32 en la cepa K165, no se podía generar la respuesta HS, se hizo un marcaje de proteínas durante el estrés por calor en células K165 y AB1157 (Figura 16). Este resultado muestra una relación entre el SE del DNA generado durante el HS y la respuesta al estrés controlada por sigma 32. Por lo que puede suponerse que alguna proteína de la respuesta HS, interaccione con sistemas que regulan el grado de SE celular. Por lo que es posible suponer que el SE celular tiene un papel importante en la respuesta a estrés por calor.

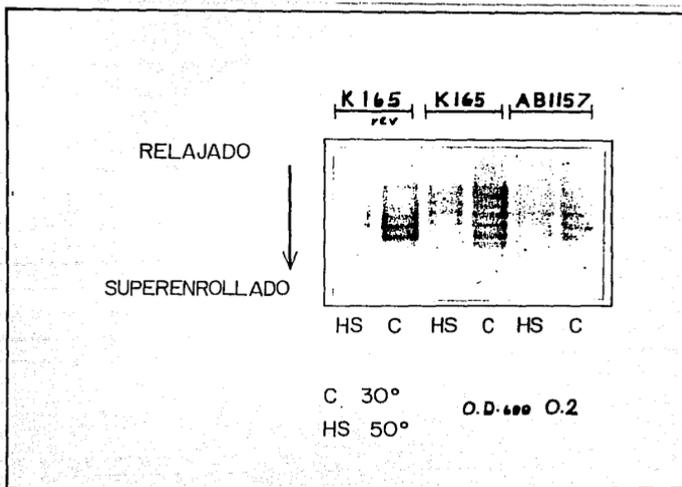


Figura 14: Dependencia por sigma 32 del SE generado durante HS. Topoisómeros de pMS01 en las cepas AB1157, K165 y K165 revertante termo-resistente. Las cepas se crecieron en M9 a 30°C hasta DO de 0.2 y se sometieron a 15' de HS a 50°C.

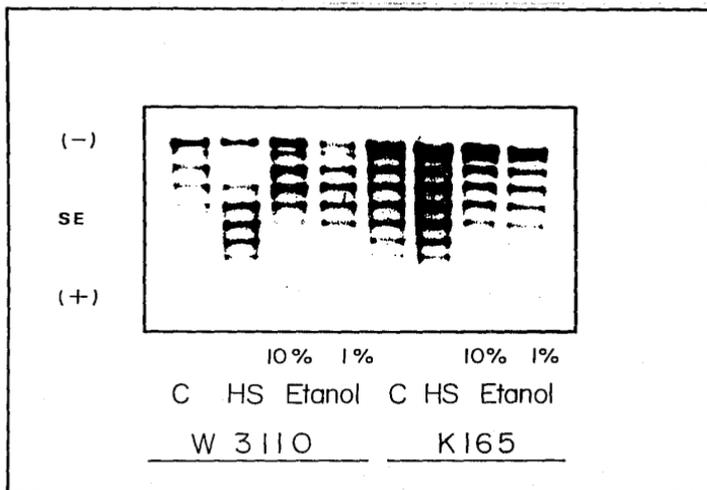


Figura 15: SE de plásmidos reporteros durante el estrés inducido por etanol y calor.

Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de los topoisómeros de pMSO1 en las cepas W3110 (wt) y K165 (htr ambar, sup4ts) durante la inducción de HS con calor 50°C 10' y etanol al 10% y 1% durante 10'. Las cepas se crecieron en medio Luria a 30°C a DO de 0.4.

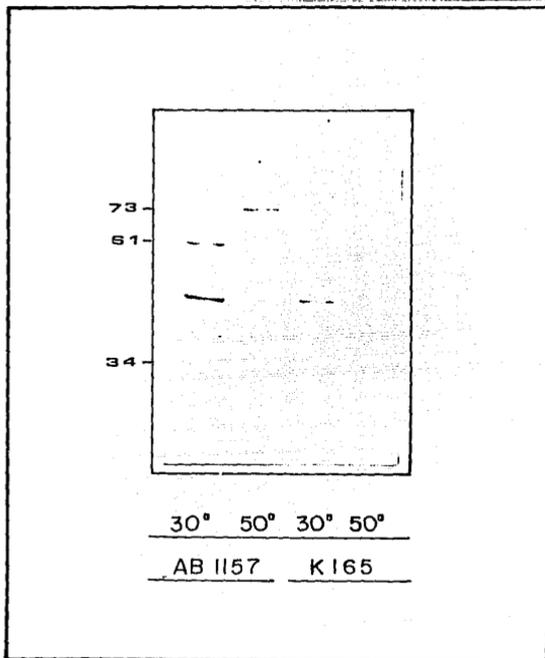


Figura 16: Inducción de proteínas de HS en una cepa silvestre y una cepa termosensible.

Proteínas de HS en la cepa AB1157 y K165 a 30° y 50°C durante 15'.

Ambas cepas se crecieron en M9 a 30°C a una DO de 0.2. Se marcaron las proteínas con S-35 Metionina 10 μCi ml^{-1} durante los últimos 5 minutos del HS.

VI) Estrés por calor en una mutante gyrA termo-sensible y en presencia de Nov.

Por ser el SE del DNA un fenómeno que durante el HS, está relacionado al regulador RpoH, y habiendo observado que la adición de Nov. al cultivo antes del HS modifica el patrón de proteínas propias del estrés, se decidió explorar si es o no indispensable que durante la inducción del estrés por calor exista el incremento del SE para darse la respuesta HS adecuada al nivel de síntesis de proteínas. Para esto se emplearon dos estrategias: estudiar las proteínas inducidas por HS en una cepa KRE449 gyrA termosensible, la cual no podría generar un incremento en el SE del DNA a temperaturas altas, y la utilización de altas dosis de Nov. en pulso durante el momento de la inducción del HS. En las figuras 17 y 18 se puede observar que las proteínas de HS, fueron inducidas sin que hubiera necesidad de incremento en el SE y se mostró que en la cepa gyrA(ts), la respuesta HS fue aún más intensa.

El SE que se genera durante la inducción de la respuesta HS, no es condición necesaria para poderse dar una respuesta inicial al estímulo de calor, y por el contrario, la pérdida de SE durante el HS potencia la expresión de las proteínas de HS. Queda entonces preguntarse cuál es la importancia del incremento del SE, coordinado con la respuesta HS.

Se puede especular que durante la respuesta al estrés existen dos fases, una inicial donde el SE dentro del HS no es importante, pero si lo es antes del estrés, y una segunda fase cuando la célula ha sido retirada del estrés o ha llegado ésta a un nuevo equi-

librio fisiológico con la nueva temperatura de crecimiento, y es posible que el SE en esta segunda fase sea de importancia crucial para el recobre de la actividad fisiológica fuera del HS, y que por ello esté relacionado el SE al sistema global HS.

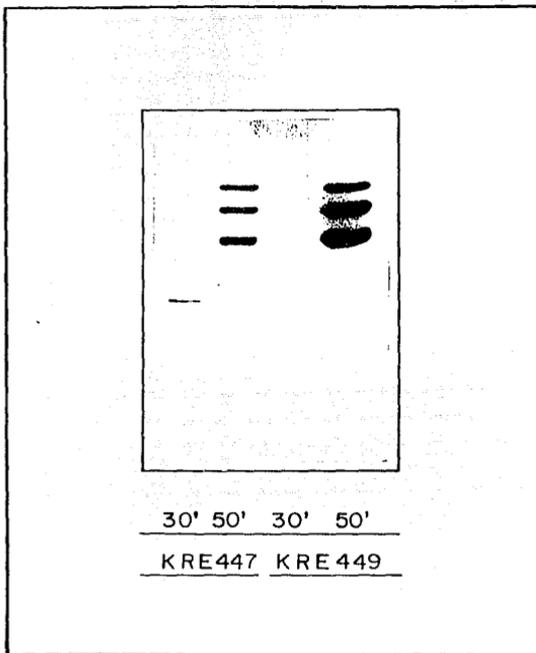


Figura 17: Inducción de proteínas HS en una mutante (gyrA(ts))
 Proteínas de HS de las cepas KRE 447 y KRE 449
 Las cepas fueron crecidas en M9 a 30°C hasta DO₆₀₀
 de 0.2 y sometidas a 50°C durante 15', marcados con
 Metionina ³⁵S los últimos 5 minutos del estrés.

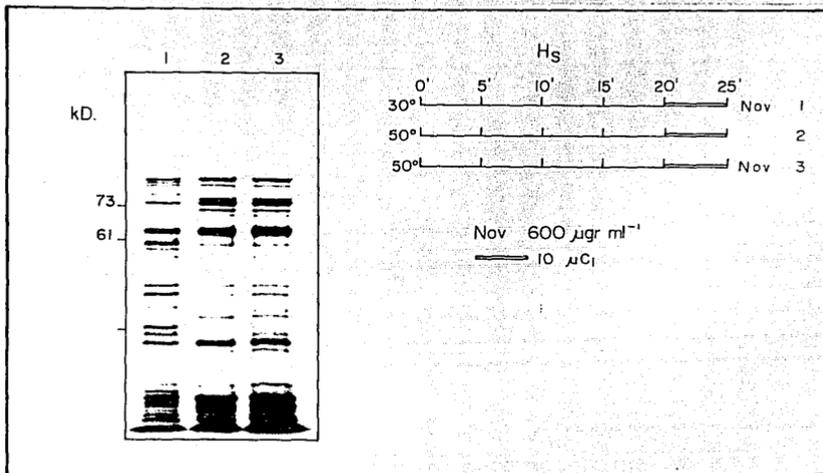


Figura 18: Síntesis de proteínas de HS en presencia de Nov. al inicio del estrés.

Proteínas de HS en presencia de novobiocina 600µg ml⁻¹ añadida al iniciar el estrés. El HS fue de 50°C durante 25 minutos. La cepa AB1157 se creció en M9 a 30°C con agitación (200 rpm) a DO de 0.2.

VII) Viabilidad de la mutante recA51 durante el estrés por calor.

Al igual que en el sistema global HS, el sistema SOS al ser inducido se acompaña de modificaciones en la densidad del nucleóide, ya que los agentes que activan a la respuesta también dañan al DNA. Por ello, se analizó si la proteína RecA, parte clave de la regulación de la respuesta SOS, estaba involucrada en la resistencia celular al estrés por calor (HS). Con esto se buscó establecer un nexo entre los dos sistemas, ya que los cambios en el SE del DNA son similares en ambos. Para esto, se realizaron cuentas viables de la cepa control AB1157 y la cepa JC2924 recA51, antes y después de someterse al HS. El estrés se aplicó con variaciones en el tiempo de duración, así como con diferentes concentraciones de Nov. en el medio y en dos diferentes medios de cultivo: Luria y M9.

En el caso de la cepa recA51, se observó un descenso de la población, después de ser sometida al estrés, y comparada con su control la bacteria AB1157 (Tabla 1, A y B). La cepa recA 51 resultó ser más sensible al HS que la cepa silvestre, lo cual es de esperar ya que durante la inducción HS se generan daños en el DNA que deben ser reparados y al bloquear el sistema de recombinación dependiente de RecA, se está comprometiendo la viabilidad celular. El experimento se realizó tanto en medio mínimo M9 como en medio Luria, y en dos tiempos de estrés calórico, y muestra la interacción entre los sistemas globales HS y SOS para mantener la viabilidad de la célula.

Viabilidad de la cepa AB1157 en HS después de ser sometido a HS y en presencia de Nov.

AB1157	D.O.600nm.	1X10 ⁶ células ml.lsl			
		0.25		0.14	
		L-1 30°C	L-1 50°C	M-9 30°C	M-9 50°C
H.S.,30°-50°C t'-30'					
Control		1.6	1.6	1.8	1.8
10µgml ⁻¹ Novobiocina		1.0	1.4	1.2	1.6
20µgml ⁻¹ Novobiocina		1.5	2.0	2.4	2.1
H.S.30°C 50°C t'-40'					
Control		1.6	2.1	1.9	2.0
10µgml ⁻¹ Novobiocina		0.6	1.8	0.1	1.7
20µgml ⁻¹ Novobiocina		1.6	1.9	1.5	1.1

Tabla 1: A) Viabilidad de la cepa AB1157 al ser sometida a HS de 50°C durante 30 y 40 minutos en presencia (10 y 20µg ml⁻¹) o ausencia de novobiocina, en medio Luria (L-1) o medio mínimo M9 (M-9) a DO₆₀₀ nm de 0.14, se hizo cuenta viable después del estrés y se expresan los resultados en 1X10⁶ células/ml. El experimento se inició con 5X10⁷ células/ml.

Viabilidad de la cepa AB1157 recA56 después de ser sometida a HS y en presencia de Nov.

AB1157 RecA51	1x10 ⁶ células/ml			
	D.O. 600nm.	0.25	0.14	
	L-1 30'	L-1 50'	M-9 30'	M-9 50'
H.S. 30°-50° t'-30'				
Control	0.2	0.1	0.3	0.1
10µgml ⁻¹ Novobiocina	0.9	.04	1.1	.08
20µgml ⁻¹ Novobiocina	0.4	.04	0.7	.01
H.S. 30°-50° t'-40'				
Control	1.2	.07	1.3	.05
10µgml ⁻¹ Novobiocina	0.8	0.01	.9	.01
20µgml ⁻¹ Novobiocina	1.5	.02	2.4	.01

Tabla 1: B) Viabilidad de la cepa JC2924 RecA⁵¹ derivada de la cepa AB1157, sometida a HS de 50°C 30 y 40 minutos con y sin novobiocina y en dos medios diferentes: Luria (L-1) y M9 (M-9). Se hizo cuenta viable después del estrés y se expresan los resultados en 1x10⁶ células/ml. El experimento se inició con 5x10⁷ células/ml.

VIII) Efecto del grado de SE en la expresión de tres genes pertenecientes al sistema global SOS.

Para evaluar si la respuesta SOS es dependiente del grado de SE celular, se cuantificó la actividad de B-galactosidasa (B-gal) a partir de tres fusiones Mud(lac, Ap) en los genes del sistema SOS dinA1, dinD1 y umuC, de células cultivadas en ausencia o presencia de concentraciones subletales de Nov. Se hicieron curvas de crecimiento con las fusiones dinA1, dinD1 y umuC, para seleccionar la dosis de Nov. máxima que no modifique la curva de crecimiento. La Figura 19 muestra las curvas de crecimiento de las cepas GW1010 y GW1040, que tienen las mutaciones dinA1 y dinD1 respectivamente. La Figura 20 presenta el comportamiento de dos cepas umuC- en presencia de bajas dosis de Nov.

Tanto para la cepa silvestre, como para las cepas portadoras de las fusiones Mud(lac, Ap) en los genes dinA1 y dinD1, la dosis adecuada de Nov. fue 20µg/ml. En el caso de la fusión en el gen umuC, la sensibilidad a la Nov fue mucho mayor de lo esperado. Esto es difícil de explicar. Lo que se sabe del gen umuC, es que está involucrado en eventos de mutagénesis durante SOS, al permitir junto con el producto de degradación de umuD, el paso de la polimerasa a través de regiones con apareamiento erróneo de bases, lo cual permite que sea fijada la mutación, sin embargo no explica esto el comportamiento de la mutante umuC ante la Nov.

La expresión de β-gal en las fusiones dinA1 y dinD1, se cuantificó en presencia o ausencia de Nov. en el medio (Tabla 2). Se pudo apreciar que la cepa con la fusión en el gen dinA1 incrementó la

expresión de β -gal al disminuir el SE, mientras que la fusión en el gen dinD1 presentó los mismos niveles de expresión en presencia o ausencia de Nov. en el medio. La expresión de B-gal no se analizó en la fusión umuC.

A diferencia del sistema HS, donde al modificar el SE del nucleoide todos sus genes modifican su expresión, el sistema SOS no parece tener la misma estrategia con relación al nivel de SE celular, ya que al menos dos de sus genes presentan comportamientos diferentes.

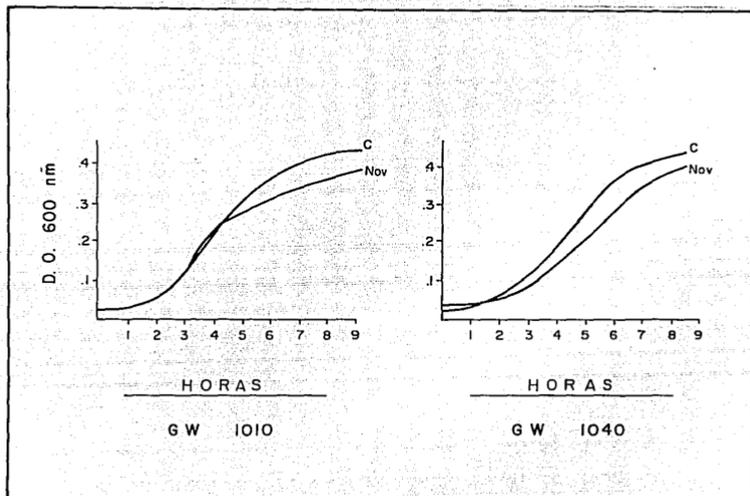


Figura 19: Efecto de la Nov. en el crecimiento de dos cepas con mutaciones en genes de SOS.

Gráficas de crecimiento de la cepa GW1010 dinA1 y GW1040 dinD1 en presencia de $20\mu\text{g ml}^{-1}$ de novobiocina (Nov.) a 30°C en 200 rpm de agitación. Se muestra su control (C) sin novobiocina.

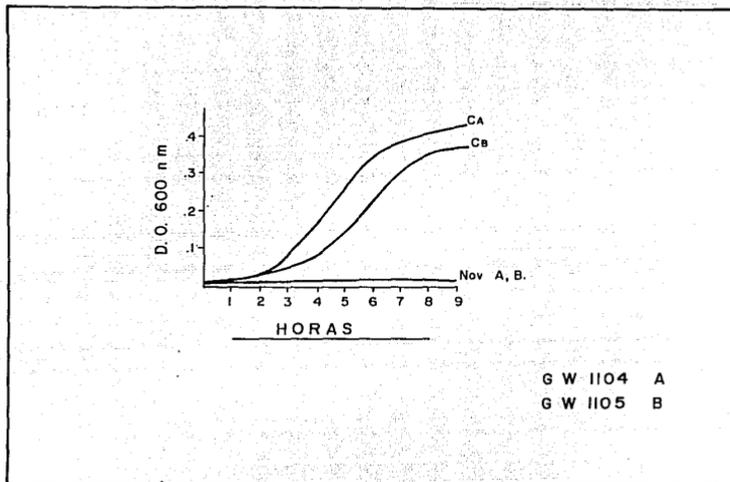


Figura 20: Efecto de Nov. en el crecimiento de dos cepas umuC.

Graficas de crecimiento de la cepa GW1010 dinA1 y GW1104 umuC y GW1105 umuC lexA3 con y sin novobiocina $20\mu\text{g ml}^{-1}$ a 30°C 200 rpm de agitación.

UNIDADES DE β -GALACTOSIDASA DE FUSIONES Mud(lac.Ap')

CEPA	Tiempo en horas después de inducción con mitomicina C a D.O. 0.24 en M9.			
	t=0	t=2hrs	t=4hrs	t=6hrs
GW1010 <u>dinA1</u>				
Control	18.9	12	9.9	9.9
Novobiocina	22	16	13.5	14.2
Mitomicina C	20.5	30	19	24.6
Nov. + Mit C	29.9	62.5	46.3	41.7
GW1040 <u>dinD1</u>				
Control	13	10.8	9.4	6.5
Novobiocina	7.8	4	8.6	7.5
Mitomicina C	9.7	38.6	27.1	35.5
Nov. + Mit C	11.7	22.6	27.1	29.3

$$U = 1000 * [(D.O.420 - 1.75 * D.O.550) / t * V * D.O.600]$$

Tabla 2: Efecto de Nov. en la inducción de 2 genes del sistema SOS.

Inducción de β -galactosidasa en las cepas GW1010 dinA1 y GW1040 dinD1 con mitomicina C $5\mu\text{g ml}^{-1}$ a DO_{600} de 0.24. Las cepas fueron crecidas a 30°C en M9.

IX) Efecto de la respuesta SOS en el SE de plásmidos.

Se evaluó durante la respuesta SOS el nivel de SE en plásmidos reporteros, a fin de determinar si, como en el caso de la respuesta HS, existe durante la inducción un incremento en el SE. Para ello se analizó la distribución de los topoisómeros de un plásmido reportero, extraído de células en las cuales se indujo la respuesta SOS durante 10 minutos con mitomicina C en el medio (Figura 21). No se detectó un incremento significativo en el SE de los plásmidos, aún cuando se de más tiempo en la inducción de la respuesta SOS (Figura 22). Lo cual indica que existe un mecanismo que permite el incremento del SE de los plásmidos en HS y que no es igualmente activo durante el sistema SOS, o que se requieren tiempos de inducción diferentes.

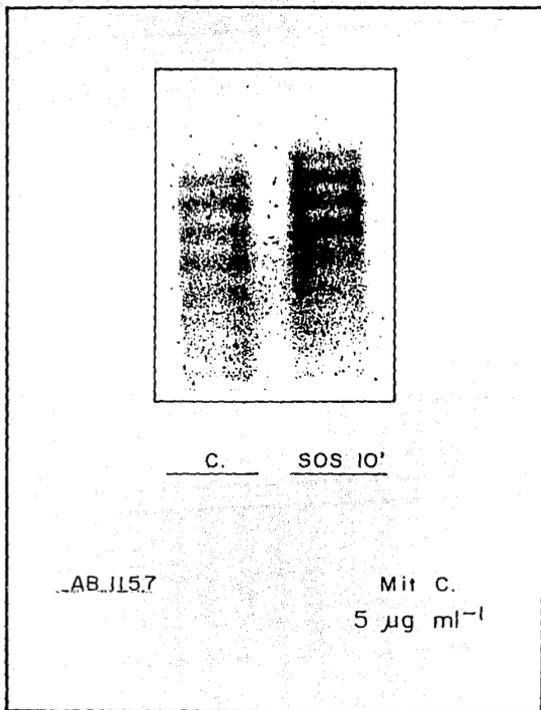


Figura 21: SE de plásmidos durante la respuesta SOS.

Topoisomeros del plásmido pMSO1 en AB1157 durante la inducción de SOS con mitomicina C 5µg ml⁻¹ 10 minutos. AB1157 creció a 30°C en M9 a DO de 600nm a 0.2.

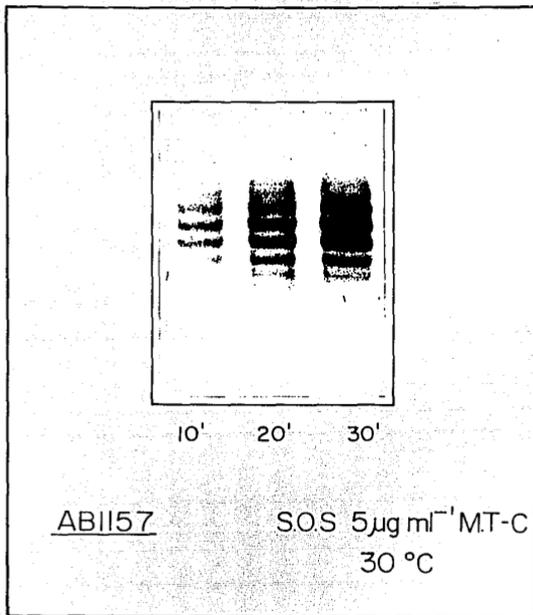


Figura 22: SE de plásmidos durante la respuesta SOS.

Topoisómeros del plásmido pMSO1 en ABI157 durante la respuesta SOS inducida con mitomicina C 5µg ml⁻¹ a 30°C. La cepa se creció a DO de 0.2 en M9.

X) Comportamiento del SE celular del DNA de los plásmidos en la mutante UmuC.

Procurando encontrar la dosis de Nov. a la cual se pueda trabajar el SE de la cepa UmuC, sin que resulte letal o modifique la curva de crecimiento, se realizaron ensayos con diferentes dosis de Nov. en el medio (Fig. 23). Con lo cual se seleccionó 0.5µg/ml de Nov. como equivalentes a los 20µg/ml utilizados con la cepa silvestre.

Posteriormente se compararon los niveles de SE de los plásmidos presentes en la mutante UmuC con la isógena silvestre, esto, en diferentes fases de crecimiento y en presencia o no de Nov. en el medio; se extrajeron los plásmidos reporteros y posteriormente se separaron por electroforesis para observar la distribución de sus topoisómeros (Figura 24).

El SE del DNA en la cepa UmuC presentó un comportamiento diferente al de su isogénica, difícil de explicar debido al desconocimiento de la función de la proteína UmuC en relación al SE del DNA en la célula. Es claro que su isogénica, como otras cepas bacterianas, conforme aumenta la DO del cultivo, disminuye el nivel de SE de su DNA, pero en la UmuC no se llega a relajar notablemente el genoma, permaneciendo en un estado de mayor SE; sin embargo el efecto de la Nov. en la distribución de los topoisómeros del plásmido reportero en la cepa UmuC, es mayor conforme aumenta la DO del cultivo.

Para determinar si la sensibilidad a Nov., por parte de la UmuC es específica o no, se creció a la cepa en medio Luria sólido y en presencia de bromuro de etidio, coumestricina o bien con

rifampicina. que son antibióticos de pesos moleculares y blancos de acción diferentes, observándose en todos los casos mayor susceptibilidad por parte de la cepa umuC. Esto se podría explicar proponiendo que la cepa con la fusión en umuC presenta una alteración en la permeabilidad de membrana a los diferentes antibióticos.

Por otro lado habría que explicar cómo un efecto generalizado en la sensibilidad a los antibióticos es también capaz de modificar el comportamiento del SE del DNA.

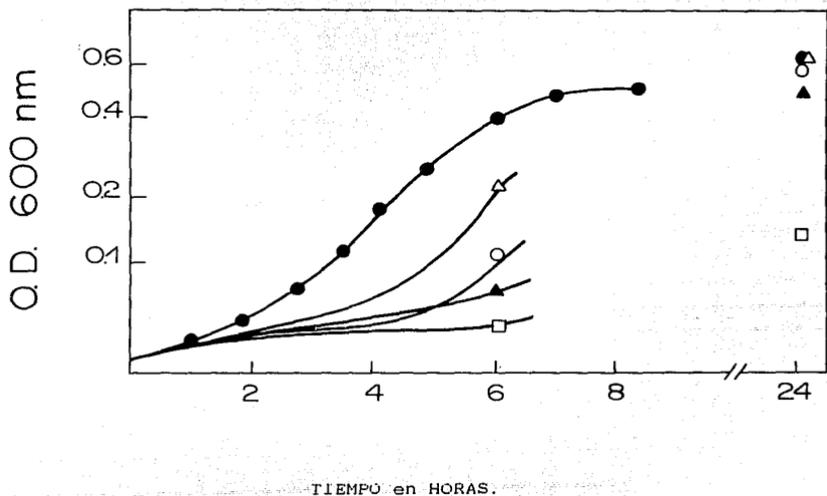


Figura 23: Efecto de Nov. en el crecimiento de la cepa umuc.
 Curvas de crecimiento de la cepa GW1104 umuc en presencia de diferentes concentraciones de novobiocina (●)0, (△)0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (○)1 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (▲)4 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (□)5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y (◻)10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.
 El crecimiento fue en M9 a 30°C.

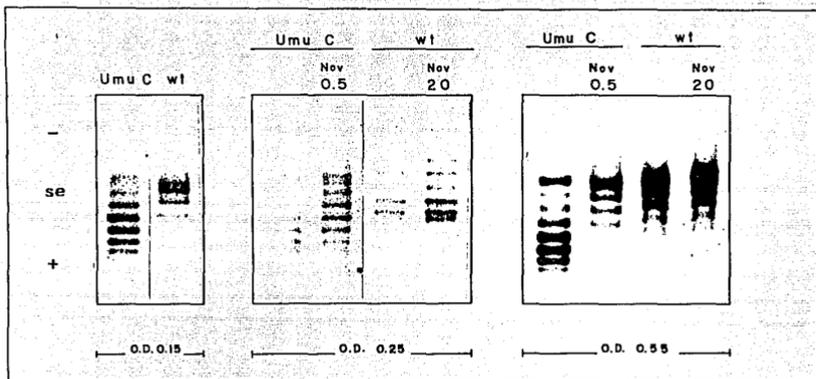


Figura 24: Comportamiento del SE de los plásmidos en la cepa umuC en diferentes fases del crecimiento y en presencia de Nov. Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de topoisómeros del plásmido pMSO1 en la cepa GW1000 y GW1104 umuC, en presencia o ausencia de novobiocina 0.5µg/ml en GW1104 y 20µg en GW1000. La novobiocina se añadió desde el inicio del cultivo, y las muestras se obtuvieron a DO de 0.15, 0.25 y 0.55 de medio M9 a 30°C.

XI) Evaluación in vitro de la actividad de las topoisomerasas I y II.

Una explicación al comportamiento del SE durante el HS, puede ser que las topoisomerasas I y II tengan diferente sensibilidad a la temperatura y que las actividades correspondientes se vean modificadas, presentándose nuevos patrones de SE celular.

Durante la inducción del HS se requiere de la síntesis de al menos una proteína para que se de el incremento en el SE, por lo que se hace atractivo estudiar in vitro la actividad de las topoisomerasas con extractos citoplasmáticos de bacterias en estrés calórico, para detectar la presencia de esta proteína.

Con el objeto de poder analizar el comportamiento del SE del DNA en sistemas globales como HS y SOS, se decidió plantear el análisis in vitro de las actividades de las topoisomerasas I y II a través de la modificación del patrón de distribución de topoisómeros en geles con cloroquina (Figura 25).

En el ensayo para Top II a 45°C se observaron 2 bandas de plásmidos que posiblemente señalan la presencia de cortes de una y 2 cadenas en el DNA y que muestran actividad parcial de la Girasa, sin embargo a 30 grados que es la temperatura recomendable para el ensayo, no se detecta una actividad fuerte de la enzima. la top I presenta actividad a 42°C pero enriqueciendo la zona de plásmidos con cortes, sin verse la actividad de relajación y ligación para generar el topoisómero siguiente.

Se observó que en las condiciones establecidas sólo se

está detectando la actividad de corte por parte de las enzimas, y no la actividad completa de las mismas, faltando aún por estandarizar adecuadamente la técnica.

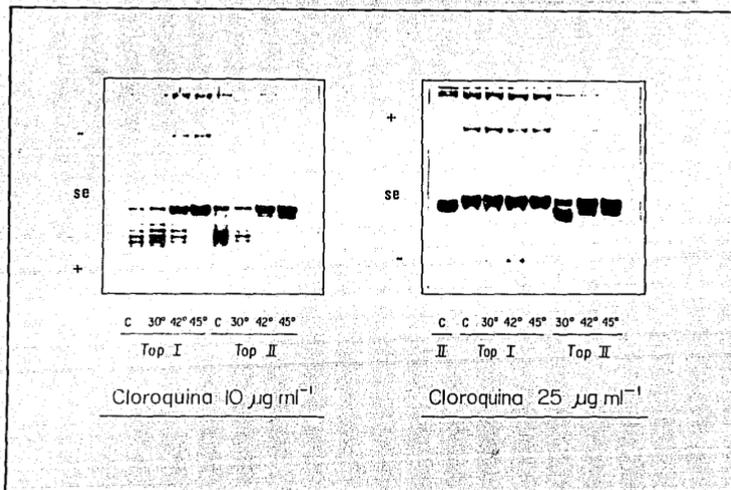


Figura 25: Ensayo in vitro de SE de plásmidos para top I y II a diferentes temperaturas.

Electroforesis en gel de agarosa-cloroquina de topoisómeros del plásmido pMSO1 de ensayos in vitro para topoisomerasa I y II. Los ensayos se realizaron a 30, 42 y 45 grados centígrados y la electroforesis se realizó en presencia de cloroquina 10 y 25 µg ml⁻¹ para hacer migrar más o menos rápido las moléculas más superenrolladas.

CONCLUSIONES

Con el objeto de evaluar la importancia que el grado de SE tiene en la regulación de las respuestas HS y SOS se realizaron las siguientes estrategias:

- Determinar el efecto que el grado de SE tiene en la expresión de proteínas de HS variando, mediante el empleo de Nov y fase de crecimiento, el SE celular (resultados I, II y VI).
- Estudiar el incremento en la actividad del SE durante la respuesta HS mediante el empleo de los antibióticos cloranfenicol y rifampicina y la mutante rpoH termosensible (resultados III, IV y V).
- Determinar si para la sobrevivencia de células sometidas a estrés por calor, se requiere de la participación de la proteína RecA, que es parte del sistema de regulación de la respuesta SOS (resultado VII).
- Estudiar el efecto que el grado de SE tiene en la expresión de 2 genes del sistema SOS y el comportamiento del SE en una mutante umuc (resultados VIII, IX y X).
- Procurar establecer un sistema in vitro para evaluar el efecto que la temperatura tiene en la actividad de las enzimas top I y II procurando reproducir el incremento en la actividad de SE durante el HS, con extractos celulares (resultados XI).

Obteniéndose las siguientes observaciones y conclusiones:

- 1) En las bacterias la modificación del grado de SE,

mediante el empleo de Nov., reduce la cantidad de proteína DnaK y GroE que se sintetiza en respuesta a un estrés de calor. Esta disminución es más clara a los 10 minutos después del cambio de temperatura y en fases tempranas del cultivo bacteriano. Este resultado sugiere que el SE puede modificar la inducción de la respuesta HS, tal vez a través de la expresión del gene regulador rpoH.

2) Durante la respuesta HS se presenta un claro incremento en la capacidad citoplásmica para SE al DNA. Los antibióticos cloranfenicol y novobiocina inhiben este efecto, mientras que rifampicina no. El cloranfenicol no inhibe si se añade después de 5 minutos del cambio de temperatura. Estos resultados muestran que una proteína o proteínas que son sintetizadas durante los primeros 5 minutos del estrés y cuya síntesis no se inhibe con rifampicina, son requeridas para SE al DNA. La girasa no se ha descrito como proteína de HS, por lo que una explicación atractiva es que se trate de proteínas que estabilizan o incrementan la actividad de Girasa.

3) La respuesta HS es más intensa en una mutante GyrA temperatura-sensible. Así también si se bloquea a la Girasa durante el HS y con ello el incremento en la capacidad de SE al DNA, se aumenta la intensidad de esta respuesta. Por lo que no es igual, el efecto en el HS al bloquear a la Girasa antes del estrés o bloquearla durante el HS.

4) Al inducir el sistema SOS, dos de sus genes se expresaron de manera diferente al disminuir el grado de SE del DNA. Este resultado sugiere que en el sistema SOS a diferencia del sistema HS, la regulación de la expresión de sus genes en relación al SE no es

homogenea. por lo que es poco probable que dependa de un solo regulador como en el caso del HS.

5) Una cepa E. coli con una mutación en el gene umuC, presenta un SE diferente al de su isogenica. Esto es una característica fenotipica de umuC no descrita y sin una explicación clara hasta el momento, pero que indica que el gene umuC es relevante en la fisiología de la célula aún fuera del sistema SOS.

REFERENCIAS.

- Ang, D.; Chandrasekhar, G.N.; Johnson, C.; Zyllicz, M. and Georgopoulos, C. (1987). A Genetic and Biochemical analysis of the Escherichia coli grpE gene and its product. Alan R. Liss Inc., 523-532.
- Arrigo, A.P., Suhan, J.P. y Welch, W.J. (1988). Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. Molecular and cellular Biology. 8:5059-5071.
- Ashburner, M. y Bonner, J.J. (1979). The induction of gene activity in Drosophila by Heat-Shock. Cell. 17:241-254.
- Bardwell, J.A. and Craig, E.A. (1987). Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:5177-5181.
- Battista, J.R.; Nohmi, T.; Donnelly, C.E. y Walker, G.C. (1983). Hela topoisomerase I. Methods in Enzymology. 100:133-137.
- Bhriain, N.N.; Dorman, C.J. and Higgins, C.F. (1989). An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. Molecular Microbiology. 933-942.
- Brady, G. W. (1987). Environmental Influences on DNA Superhelicity the effect of ionic strength on superhelix conformation in solution. J. Mol. Biol. 185-191.
- Brent, R. and Ptashne, M. (1981). Mechanism of action of the lexA gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:4204-4208.
- Bochkareva, E.S.; Lissin, N.M. and Girshovich, a.s. (1988). Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. Nature, 36:254-257.
- Bouthier de la Tour, C.; Fortemer, C.; Huber, R.; Forterre, P. and Duguet, M. (1991). Reverse Gyrase in Thermophilic Eubacteria. Journal of Bacteriology. 173:3921-3923.
- Chung, C.T., Neimela, S.L. y Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2172-2175.
- Deshais, R. J.; Koch, B.D.; Washburne, M.W.; Carig, E.a. and Schekman, r. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature, 332:800-810.
- Donnelly, C.e. and Walker, G.C. (1989). groE mutants of Escherichia

coli are defective in umuDC-dependent UV mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 171:6117-6125.

Dorman, C.J.; Barr, G.C.; Brriain, N.N. and Higgins, C.F. (1988). DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of tonB gene expression. *Journal of Bacteriology*, 170:2816-2826.

Drew, H.R. McCall, M.J. y Calladine, C.R. (1990). New approaches to DNA in the crystal and in solution on DNA topology and its biological affects. (ed. Cozzarelli, N.R. y Wang, J.C.) pp.1-56. Cold Spring Harbor, New York.

Drlica, K. and Worcel, a. (1975). Conformational transitions in the *Escherichia coli* chromosome: analysis by viscometry and sedimentation. *J. Mol. Biol.* 393-411.

Drlica, (1984). *Biology of Bacterial Deoxyribonucleic Acid topoisomerases*. *Microbiological Reviews*, 48:273-289.

Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Cellular biochemistry*, 328:378-379.

Erickson, J.W.; Vaughn, V.; Walter, W.a.; Neidhardt, F.C. and Gross, C.A. (1987). Regulation of the promoters and transcripts of rpoH, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes & development*, 1:419-432.

Fayet, O.; Louarn, J.M. and Georgopoulos, C. (1986). Suppression of the *Escherichia coli* dnaA46 mutation by amplification of the groES and groEL genes. *Mol. Gen Genet.* 202:435-445.

Franco, R.J. and Drlica, K. (1989). Gyrase inhibitors can increase gyrA expression and DNA supercoiling. *Journal of Bacteriology Dec.*, 171:6573-6579.

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

Gellert, M. (1981). DNA Topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 50:879-910.

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

Goldstein, E. and Drlica, K. (1984). Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4046-4050.

Gomez, E. C. (1981). Effect of Nalidixic Acid and Novobiocin on pBR322 Genetic Expression in *Escherichia coli* minicells. *Journal of Bacteriology*, 148:745-752.

Gottesman, S. (1981). Genetic control of the SOS system in *E. coli*. *Cell*, 23:1-2. Grossman, A.D.; Zhou, Y.; Gross, C.; Heilig, J.;

Christie, G.E., and Calendar, R. (1985). Mutations in the rpoH (htpR) gene of *Escherichia coli* K-12 phenotypically suppress a temperature-sensitive mutant defective in the α -70 subunit of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, 161:939-943.

Grossman, A.D.; Zhou, Y.; Gross, C.; Heiling, J.; Christie, G.E. and Calendar, R. (1985). Mutations in the rpoH (htpR) gene of *Escherichia coli* K-12 phenotypically suppress a temperature-sensitive mutant defective in the α -70 subunit of RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*, 161:939-943.

Hagensee, M.E. and Moses, R.E. (1986). Repair response of *Escherichia coli* to hydrogen peroxide DNA damage. *Journal of Bacteriology*, 168:1059-1065.

Heikkila, J.J.; Kloc, M.; Bury, J.; Schultz, G.A. and Browder, L.W. (1985). Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 107:483-489.

Herrero, E.; Orr, E. and Holland I.B. (1981). Induction of recA protein: effect of inactivation of dna gyrase. *FEMS Microbiology Letters*, 369-372.

Higgins, C.F.; Dorman, C.J.; Stirling, D. A.; Waddell, L.; Booth, L. R.; May, G. and Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*, 52:569-584.

Hsieh, T. (1983). Purification and properties of type II DNA Topoisomerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Methods in Enzymology* 100:161-170.

Hsieh, L.; Rouviere-Yaniv, J. and Drlica, K. (1991). Bacterial DNA supercoiling and ATP/ADP ratio: changes associated with salt shock. *Journal of Bacteriology*, 173:3914-3917.

Ingraham, J. (1987). Effect of temperature, pH, Water activity, and pressure on growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology (ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E.) 1543-1554.

Jenkins, A.J.; March, J.B.; Oliver, I.R. and Masters, M. (1986). A DNA fragment containing the groE genes can suppress mutations in the *Escherichia coli* dnaA gene. *Mol. Gen. Genet.*, 202:446-454.

Kenneth, N.; Kreuzer, y Jongeneel, C.V. (1983). *Escherichia coli* phag T4 Topoisomerase *Methods in Enzymology*. 100:144-160

Kenyon, C.J. y Walker, G.c. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2819-2823.

Kenyon, C.J., Brent, R., Ptzshne, M. y Walker, G.c. (1982). Regulation

of Damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 160:445-457.

Kreuzer, K.N., and Cozzarelli, N.R. (1979). *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* 140:424-435.

Krueger, J.H. and Walker, G.C. (1983). *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.

Kubo, M., Kano, Y., Nakamura, H., Nagata, A. and Imamoto, F. (1979). In vivo enhancement of general and specific transcription in *Escherichia coli* by DNA gyrase activity. *Gene* 7:153-171.

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

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

León, P.; Alvarez, G.; Diaz de León, F. and Eichelmann, C. G. (1988). Effect of DNA supercoiling and catabolite repression on the expression of the *tetA* genes in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 34:839-842.

Li, G.C. and Werb, Z. (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3218-3222.

Little, J.W.; Mount, D.W. and Perron, C.Y. (1981). Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4199-4203.

Little, J.W. and Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29:11-22.

Little, J.W. (1984). Autodigestion of *lexA* and phage repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1375-1379.

Liu, S. and Tessman, I. (1990). *groE* genes affect SOS repair in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172:6135-6138.

Loeb, A.K. and Gross, C.A. (1991). Translational regulation of σ^{32} synthesis: requirement for an internal control element. *Journal of Bacteriology*, 173:3904-3906.

Martin, S.R.; McCoubrey, W.K.; McConaughy, B.L.; Young, L.S.; Been, M.D.; Brewer, B.J. y Champoux, J.J. (1983). Multiple forms of rat liver type I Topoisomerase. *Methods in Enzymology*. 100:137-14

Menzel, R. and Gellert, M. (1983). Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell*,

34:105-113.

Miller, J.H. en: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor New York. (1972). 352-359.

Nagal, H.; Yano, R.; Erickson, W.J. and Yura, T. (1990). Transcriptional regulation of the Heat Shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *Journal Bacteriology*, 172:2710-2715.

Neidhardt, F.C.; Vanbogelen, R.a. and Vaughn, V. (1984). The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 18:295-329.

Neidhardt, F.C. y VanBogelen, R.a. (1987). Heat shock response en *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* celular and molecular biology (ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E.) 1334-1345. American Society for Microbiology. Washington.

Nordheim, a.; Lafer, M.E.; peck, J.L.; Wang, J.c.; Stollar, B.D. and Rich, A. (1982). negatively supercoiled plasmids contain left-handed Z-DNA segments as detected by specific antibody binding. *Cell*, 31:309-318.

O'Farrel, P.H. (1975). high-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.

Otter, R. y Cozzarelli, N.R. (1983). *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Methods in Enzymology*. 100:171-180.

Pellon, J.R., Ulmer, K.M. y Gómez, R.f. (1980). heat damage to the folded chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:358-364.

Pellon, J.R. y Gómez, R.F. (1981). Repair of thermal damage to the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 145:1456-1458.

Radding, C.M. (1981). Recombination activities of *E. coli* RecA protein. *Cell*, 25:3-4.

Raina, S. and Georgopoulos, C. (1990). A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only at high temperatures. *Journal of Bacteriology*, 172:3417-3426.

Roberts, J.W. and Roberts, C.W. (1975). Proteolytic cleavage of Bacteriophage lambda repressor in induction. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 72:147-151.

Roberts, F.W.; Roberts, C.W. and Mount, D.W. (1977). Inactivation and proteolytic cleavage of phage repressor in vitro in ATP-dependent reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:2283-2287.

Roberts, J.W.; Roberts, C.W. and Carig, N.L. (1978). *Escherichia coli* *recA* gene product inactivates phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 75:4714-4718.

Rudd, K.E. y Menzel, R. (1987). His operons of Escherichia coli and Salmonella typhimurium are regulated by DNA supercoiling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:517-521.

Rupp, W.D. y Howard-Flamanders, P. (1968). Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of Escherichia coli following ultraviolet irradiation. J. Mol. Biol. 31:291-304.

Salles, B. and Paoletti, C. (1983). Control of UV induction of recA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:65-69.

Sambrook, J., Frisch, e.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory and ed. Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanzey, B. (1979). Modulation of gene expression by drug affecting deoxyribonucleic acid gyrase. J. Bacteriol. 138:40-47.

Shapiro, A. L.; Viñuelas, E. y Maizel, J.V. (1967). Molecular weight estimation of polipeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 28:815-820.

Sinden, r.R. and Pettijohn, E. D. (1981). Chromosomes in living Escherichia coli cells are segregated into domains of supercoiling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:224-228.

Smith, C.L., Kubo, M. and Imamoto, F. (1978). Promoter-specific inhibition of transcription by antibiotics which act on DNA gyrase. Nature (London) 275:420-423.

Stonington, G. y Pettijohn, D.E. 1971. Folded genome of Escherichia coli isolated protein-DNA-RNA complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:6-9.

Straus, D.B.; Walter, W.a. and Gross, C.a. (1987). The heat shock response of E. coli is regulated by changes in the concentration of σ -32. Nature, 329:348-351.

Tilly, K.; Erickson, J.; Sharma, S. and Georgopoulos, C. (1986). heat shock regulatory gene rpoH mRNA level increases after heat shock in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 168:1155-1158.

Tse-Dinh, Y. and Beran, r.K. (1988). Multiple promoters for transcription of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. J. Mol. Biol., 202:735-742.

Ueshima, R.; Fujita, N. and Ishihama, A. (1989). DNA supercoiling and temperature shift affect the promoter activity of the Escherichia coli rpoH gene encoding the heat-shock sigma subunit of RNA polymerase. Mol. Gen. Genet., 215:185-189.

VanBogelen, r.A., Kelley, P.M. y Neidhardt, F.C. (1987). Differential Induction of Heat Shock, SOS, and Oxidation stress regulons and accu-

mulation of nucleotides in Escherichia coli. J. Bacteriology 169:26-32.

Velazquez, J.M., Lindquist, S. (1984). hsp 70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. Cell. 36:655-662.

Walker, G.C. (1984). Inducible DNA repair systems. Rev. Biochem., 54:425-427.

Walker, G.C. (1987). The SOS Response of Escherichia coli en Escherichia coli and Salmonella typhimurium celular and molecular biology (ed. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E.) 1346-2347.

Wang, J.C. (1985). DNA Topoisomerases Ann. Rev. Biochem. 54:665-697.

Wang, Q. and Kaguni, J.M. (1989). A novel sigma factor is involved in expression of the rpoH gene of Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 171:4248-4253.

Westerhoff, H.V.; O'Dea, M.H.; Maxwell, A. y Gellert, M. (1988). DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. Cell Biophys. 12:157-181.

Winston, S. y Pettijohn, D.E. 1988. Relaxation of DNA torsional tension in defined domains of bacterial chromosomes in vivo. Can. J. Microbiol. 34:522-525.

Yamamori, T. and Yura, T. (1980). Temperature-induced synthesis of specific proteins in Escherichia coli: Evidence for transcriptional control. Journal of Bacteriology, 142:843-851.

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

Yamamori, T. and Yura, T. (1990). Temperature-induced synthesis of specific proteins in Escherichia coli: Evidence for transcriptional control. Journal of Bacteriology, 142:843-851.

Yamamoto, N. and Droffner, M.L. (1985). Mechanims determining aerobic or anaerobic growth in the facultative aneerober Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:2077-2081.

Yang, H.L., K. Heller, M. Gellert, and G. Zubay. (1979). Differential sensitivity of gene expression in vitro to inhibitors of DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3304-3308.