

31
2e j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SINTESIS DE LA DNA GIRASA Y RELACION [ATP]/[ADP] DURANTE LA RESPUESTA A ESTRES POR CALOR EN ESCHERICHIA COLI K-12

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JUAN CASTRO DORANTES



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN GOMEZ EICHELMANN

ENERO 1998



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

257500



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Síntesis de la DNA Girasa y relación ATP / ADP durante la respuesta a estrés
por calor en Escherichia coli K-12."

realizado por Juan Castro Dorantes

con número de cuenta 8719407-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María del Carmen Gómez Eichelmann *María del Carmen Gómez Eichelmann*

Propietario M. en C. Benito Estrada Mena *Benito Estrada Mena*

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez *René de Jesús Cárdenas Vázquez*

Suplente Dra. María Alicia Gonzáles Manjarréz *María Alicia Gonzáles Manjarréz*

Suplente M. en C. Victor Manuel Valdés López *Victor Manuel Valdés López*

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO

[Firma]
Consejo Departamental de Biología
M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Esta tesis esta dedicada a mis padres: Juan y Berna, a mis hermanos: Lucila, Adriana, Salvador, Liz, Mauricio y Karina, que con su apoyo y cariño pudo ser posible la realización de esta.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. M. del Carmen Gómez, a la Dra. Alicia González, al M. en C. Benito Estrada, al Dr. René Cárdenas y al M. en C. Víctor Valdés, quienes revisaron esta tesis, por sus comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la misma.

Quisiera agradecer profundamente a Carmen Gómez y Jesús Ramírez, por todo lo que me han enseñado, por su atención, su sinceridad, su paciencia y para conmigo.

Al Dr. Antony Maxwell por la donación de anticuerpos contra la DNA Girasa y al Dr. Edmundo Lamoyi por la donación de los anticuerpos anti IgM.

A la Dra. Victoria Chagoya, al Dr. Jorge Suárez, a la Biól. Lourdes Sánchez y a la Biól. Susana Vidrio por su gran ayuda en el HPLC.

A Tzipe Govenzensky por la ayuda prestada para el análisis densitométrico.

A todos los miembros del laboratorio que hicieron más ameno la estancia y el trabajo en él: Rafael, Tere, Judith, Fernando, Mariana, Don Mike e Irma.

A mis cuates biomédicos: Tania del Río, Irene Lee, Tatiana Sandoval, Clelia Domenzain, Jazmin y Alfonso.

Al grupo Zur-Covs del Instituto de Biotecnología por formar un equipo y porra fenomenal de voli, Los Cobrasbarato.

Al grupo del Trago: Martín, Gabriel, Aristides y Víctor, por haber formado a ese gran grupo.

A la fundación UNAM, que me proporcionó la ayuda económica durante la elaboración de esta tesis.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. M. del Carmen Gómez Eichelmann, del departamento de Biología Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. M. del Carmen Gómez y del M. en C. Jesús Ramírez Santos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Respuesta celular a estrés por calor.....	3
Modelo de la regulación del estrés calórico en <i>E. coli</i>	5
Efecto de la temperatura en la estructura del DNA.....	8
Superenrollamiento del DNA.....	8
Topoisomerasas de DNA.....	12
Mecanismos de acción de las Topoisomerasas.....	12
Topoisomerasas tipo I de <i>E. coli</i>	14
A) Topoisomerasa I.....	14
B) Topoisomerasa III.....	14
Topoisomerasas de tipo II de <i>E. coli</i>	15
A) Topoisomerasa II o DNA Girasa.....	15
B) Topoisomerasa IV.....	20
Regulación homeostática del Superenrollamiento.....	20
Sistemas de Regulación genética dependientes de SE.....	22
SE del DNA y estrés calórico.....	23
SE del DNA y relación [ATP]/[ADP] en situaciones de estrés.....	25
Efecto de cofactores y retención de la estructura nativa de proteínas.....	26
OBJETIVOS.....	27
HIPOTESIS.....	28
MATERIAL Y METODOS.....	29
RESULTADOS.....	43
Cuantificación de las subunidades GyrA y GyrB por Western Blot durante un estrés calórico.....	43
Inmuniprecipitación de GyrA durante un estrés calórico.....	48
Cuantificación del ATP y ADP durante un estrés calórico.....	51
Protección del ATP a la Girasa a altas temperaturas <i>in vitro</i>	60
DISCUSION.....	64
CONCLUSIONES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
REFERENCIAS.....	72

RESUMEN

El genoma de *Escherichia coli* se encuentra organizado en asas superenrolladas negativamente. El grado de superenrollamiento (SE) esta regulado principalmente por la acción de la Topoisomerasa I (Top I) y de la DNA Girasa. La DNA Girasa introduce SE de tipo negativo con la hidrólisis de ATP, mientras que la Top I disminuye el grado de SE negativo. La síntesis de estas enzimas esta regulada por el nivel de SE: en un genoma muy SE induce la síntesis de la Top I y en uno relajado se induce la síntesis de la DNA Girasa. Durante los primeros minutos de la respuesta a un estrés por calor, se ha observado que hay una disminución en el grado de SE y posteriormente hay una recuperación o incremento en el nivel de SE. Además, para la recuperación en el grado de SE se requiere de la síntesis de proteínas en los primeros minutos del estrés. En esta respuesta a estrés se induce un grupo particular de proteínas, llamadas proteínas de estrés calórico, aunque no se ha reportado que se incremente la síntesis de la DNA Girasa. En este trabajo se reporta, que durante la respuesta a estrés por calor no hay un aumento de las subunidades que conforman a la DNA Girasa (GyrA y GyrB) mediante un análisis de proteína total. En un ensayo más sensible (inmunoprecipitación) no se detectó un incremento significativo en el nivel de síntesis de la subunidad GyrA, pero su nivel de síntesis se mantiene constante.

Por otro lado, se ha propuesto que la actividad de la DNA Girasa depende de la relación $[ATP]/[ADP]$. *In vitro*, al aumentar o disminuir esta relación, la actividad de la DNA Girasa aumenta o disminuye respectivamente. *In vivo*, durante un estrés anaeróbico y estrés osmótico, hay un incremento en el grado de SE, así como también en la relación $[ATP]/[ADP]$. Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que también en la respuesta a estrés calórico, el incremento en el SE se acompaña de un aumento de aproximadamente 2.3 veces en la relación $[ATP]/[ADP]$. Por lo que posiblemente este aumento en la relación afecte a la DNA Girasa en su actividad.

La DNA Girasa se mantiene activa a temperaturas de estrés elevadas, incluso en condiciones letales. *In vivo*, durante la respuesta a estrés calórico a 47°C no hay un incremento en la cantidad de la DNA Girasa aunque existe un aumento en la relación

[ATP]/[ADP]. En un estudio *in vitro* con la DNA Girasa a 46°C se observó que su actividad disminuía rápidamente en ausencia de sus cofactores (ATP y ADP). Los resultados obtenidos en este trabajo, al probar la actividad de la DNA Girasa, en presencia y ausencia de ATP, se observó que en presencia de ATP la DNA Girasa retiene un 20% de su actividad a 46°C.

Posiblemente, en la recuperación en el grado de SE esten implicados otros efectos, además del incremento en la relación [ATP]/[ADP], la cantidad constante de DNA Girasa y su parcial actividad a 46°C en presencia de ATP *in vitro*,

INTRODUCCION

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de ajustarse a las condiciones que les presenta el ambiente; a esta característica se le llama plasticidad. Los seres vivos convierten las diferentes condiciones del ambiente en señales, que pueden actuar sobre los sistemas de regulación genética, activando o reprimiendo la transcripción de un conjunto de genes. De esta forma, un cambio ambiental puede inducir varios genes y como resultado dar una respuesta a nivel celular o conductual, permitiéndole al organismo su adaptación o sobrevivencia.

En las bacterias, los sistemas globales de regulación genética se componen de un conjunto de regulones, operones y genes que se expresan de manera coordinada en respuesta a un estímulo. Un regulón es un grupo disperso de operones y genes que son controlados por un regulador común, que puede ser un represor o un activador. Un operón es un conjunto de genes que se transcribe en un solo m RNA (policistrónico), pero en el cual cada gene se traduce independientemente y en forma coordinada (Neidhardt, 1987).

Respuesta celular al estrés por calor.

Durante un incremento súbito en la temperatura del medio, los organismos presentan una respuesta celular transitoria, llamada respuesta a estrés calórico. Esta respuesta se caracteriza por un aumento en la síntesis de un grupo particular de proteínas, denominadas de estrés calórico. La función primordial que se ha propuesto para estas proteínas, es la de contender con los posibles daños celulares producidos por la temperatura. La respuesta celular a estrés calórico se encuentra muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, ya que se presenta en arqueobacterias, eubacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados

incluyendo al hombre (Neidhard y VanBogelen, 1987; Morimoto *et al*, 1990; Yura *et al*, 1993).

Durante la respuesta a estrés calórico, además de un aumento en la síntesis de las proteínas de estrés calórico, varios procesos celulares se ven perturbados. A temperaturas letales (50-53°C) para la enterobacteria *Escherichia coli*, hay inhibición del crecimiento celular, ruptura del DNA, pérdida de la estructura nativa y agregación de proteínas, incremento en la fluidez membranal y eliminación de fragmentos de la membrana externa mediante la formación de vesículas de lipopolisacáridos (Katsui *et al*, 1982; Tsuchido *et al*, 1985; Tsuchido *et al*, 1986; Mejía *et al*, 1995).

Además del calor, existen otros estímulos que pueden inducir un aumento en la síntesis de algunas de las proteínas de estrés calórico. Entre estos estímulos se encuentran: factores fisicoquímicos (cambios en el pH y la osmolaridad, radiación con luz ultravioleta), sustancias tóxicas al metabolismo (etanol, antibióticos, metales pesados, agentes intercalantes o aductores del DNA) y procesos metabólicos complejos (ayuno de aminoácidos y carbono, estrés oxidativo e infecciones vírales). Sin embargo, el aumento en la síntesis de proteínas y su cinética es diferente a la presentada por el estímulo de la temperatura, por lo que se sugiere la existencia de diferentes niveles en la regulación a la respuesta a estrés calórico (Brady *et al*, 1987; Bukau, 1993).

Las proteínas de estrés calórico, además de tener un papel en la protección contra los efectos producidos por la temperatura, son importantes para la fisiología basal de la célula. Estas proteínas participan en la replicación del DNA, la oligomerización, transporte y secreción de proteínas, en el plegamiento correcto de la cadena polipeptídica naciente durante la traducción, así como en la disociación de posibles agregados proteicos (Morimoto *et al*, 1990; Ellis y Van der Vies, 1991; Hendrick y Hartl, 1993; Yura, 1993).

Modelo de la regulación del estrés calórico en *E. coli*.

El modelo de la respuesta celular a estrés calórico, se basa principalmente en los estudios de cambios de temperatura de 30 a 42°C. Durante la respuesta se inducen dos regulones, el de σ^E (σ^{24}) (Raina *et al*, 1995) y el de σ^{32} . El regulón de σ^E tiene aproximadamente 10 genes en los que se encuentran: *rpoH*, que codifica para el factor de transcripción σ^{32} y *degP* (*htrA*) que codifica para una endopeptidasa periplasmática esencial para el crecimiento celular a temperaturas superiores de 42°C (Lipinska *et al*, 1989; Strauch *et al*, 1989; Lipinska *et al*, 1990; Hiratsu *et al*, 1995). Los genes del regulón de σ^{32} codifican para las principales proteínas de estrés calórico, entre las cuales se encuentran las chaperonas moleculares y las proteasas (Tabla 1) (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

El principal regulador positivo de la respuesta es σ^{32} , mientras que las chaperonas moleculares DnaK, DnaJ y GrpE son los reguladores negativos. En condiciones fisiológicas basales o en la recuperación de la respuesta, estas chaperonas se unen al factor σ^{32} , que forman un complejo cuaternario el cual inhiben la actividad del factor de transcripción. Estas chaperonas posiblemente exponen a σ^{32} a la proteasa membranal FtsH para su degradación. Además, la chaperona DnaJ se une al mRNA de *rpoH* inhibiendo su transcripción (Bukau, 1993; Herman *et al*, 1995; Tomoyasu *et al*, 1995).

En la fase inicial de la respuesta a estrés calórico, σ^{32} se libera de este complejo cuaternario, ya que las chaperonas moleculares se desprenden de σ^{32} y se unen a los polipéptidos que perdieron su conformación nativa. El factor σ^{32} induce el incremento en la transcripción de los genes de estrés calórico. El incremento en la síntesis de σ^{32} es de aproximadamente 15 veces durante los

Tabla 1. Principales genes de la respuesta celular a estrés por calor en *Escherichia coli*.

Regulón de σ^E	Regulón de σ^{32}		
	<i>dnaKJ^c</i>	<i>htpH</i>	<i>htpN</i>
<i>degP (htrA)^a</i>	<i>groELS^c</i>	<i>htpI</i>	<i>htpO</i>
<i>rpoH^b</i>	<i>grpE^c</i>	<i>htpK</i>	<i>lon^a</i>
otros	<i>htpG</i>	<i>htpL</i>	<i>lysU</i>
	<i>htpE</i>	<i>htpM</i>	<i>rpoD^b</i>

^a Proteasas; ^b Factores de transcripción; ^c Chaperonas moleculares.

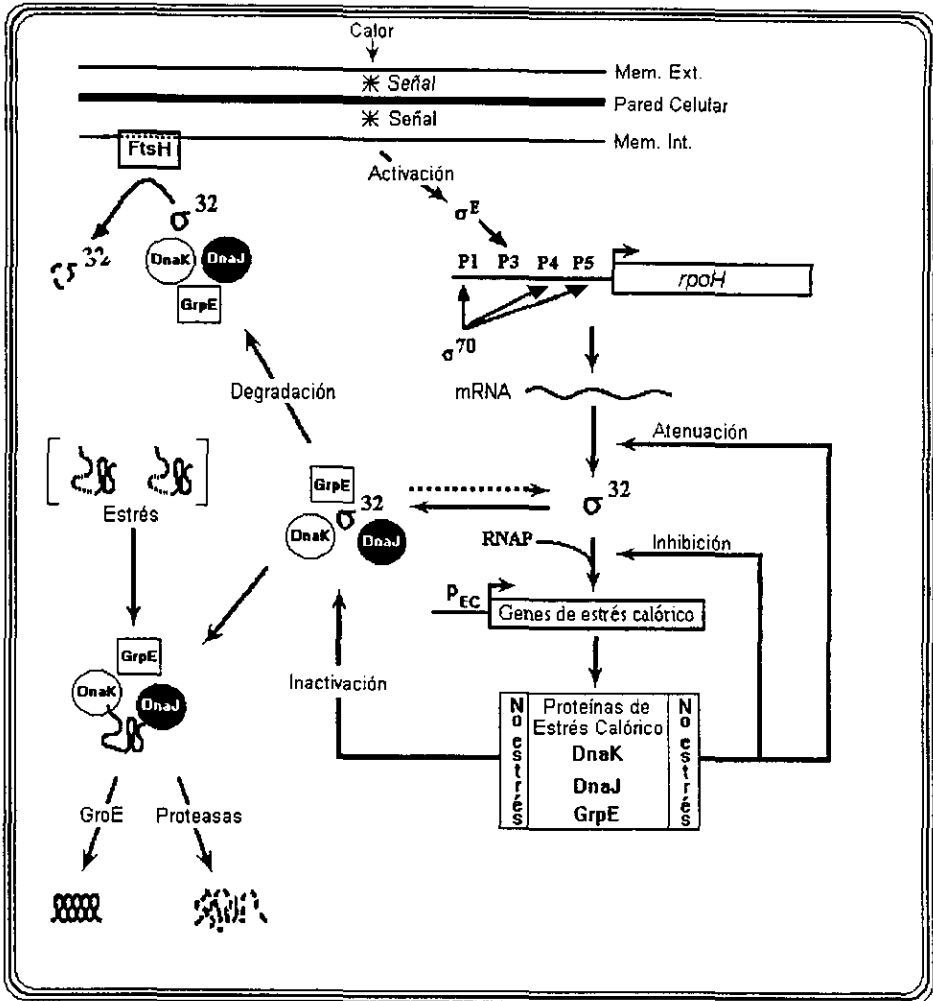


Figura 1. Modelo de la regulación de la respuesta a estrés calórico en *Escherichia coli* (Modificado de Bukau, 1993).

primeros minutos, aunque su $mRNA$ sólo se incrementa dos veces. El aumento en σ^{32} durante la respuesta se debe a un incremento en: la transcripción y traducción del gen, la estabilidad del $mRNA$ y la vida media de σ^{32} . La cantidad de σ^{32} disminuye cuando los niveles de DnaK, DnaJ y GrpE son suficientes para unirse nuevamente a esta proteína. La concentración celular de σ^{32} se reduce y por tanto las proteínas de estrés calórico disminuyen a un nivel particular de la nueva temperatura (Fig. 1).

Efecto de la temperatura en la estructura del DNA.

Además de los efectos producidos sobre la fisiología de la célula, durante un incremento en la temperatura existe daño al DNA. El genoma de la bacteria *E. coli* está organizado en una estructura compacta denominada nucleoide, que está formado por DNA, proteínas y RNA. Los estudios realizados a temperaturas de 50°C han mostrado que hay rupturas de una y dos hebras de DNA que inducen alteraciones estructurales en el nucleoide. Este daño tiene como consecuencia la pérdida del superenrollamiento (SE) del DNA en el nucleoide, además de la incorporación de proteínas (Pauling y Beck, 1975; Pellon *et al*, 1980).

Para comprender el efecto de la temperatura sobre los cambios en el SE del DNA en el nucleoide, se describirá que es el superenrollamiento del DNA.

Superenrollamiento del DNA.

Los primeros trabajos sobre las propiedades hidrodinámicas del DNA mostraron que la molécula de DNA circular del virus SV40 era más compacta que la misma molécula lineal o con un corte en una de sus hebras. La imagen de éste DNA era la de una molécula con torsiones y a esta estructura se le dio el nombre de DNA superhelicoidal o superenrollado. En 1972 se mostró que el DNA de *E.*

coli era una molécula circular, cerrada y superenrollada. Posteriormente se encontró que las moléculas de DNA de todas las células están superenrolladas.

Una misma molécula de DNA puede presentar diferentes estructuras: lineal, circular cerrada relajada, circular cerrada con un corte en una de sus hebras y circular cerrada con diferente grado de superenrollamiento (Weil y Vinograd, 1963; Vinograd *et al*, 1965; Bauer *et al*, 1980).

El superenrollamiento del DNA puede encontrarse intracelularmente en dos tipos: plectonómico y toroidal. Si se toma un eje imaginario que pasa por el centro y corre a lo largo de la doble hélice del DNA, el superenrollamiento plectonómico es aquel en el cual este eje describe una hélice en el espacio. En el superenrollamiento toroidal, el eje se enrolla alrededor de un cilindro, por ejemplo en los nucleosomas (Fig. 2).

El superenrollamiento de tipo plectonómico de una molécula circular cerrada de DNA puede representarse matemáticamente por la siguiente fórmula:

$$Lk = Tw + Wr$$

En donde:

$$Wr = Lk - Tw$$

El parámetro Wr ("writhe number") representa el número de veces que gira el eje helicoidal del DNA en el espacio formando una "superhélice" (supervueltas). Tw ("twist") representa el número de veces que una hebra de DNA pasa sobre la otra cuando la molécula circular cerrada se restringe a ocupar un plano. Tw depende del número de bases por vuelta de la hélice ("helical pitch") y en el caso de DNA-B es igual al número total de bases de la molécula entre 10,4. Este

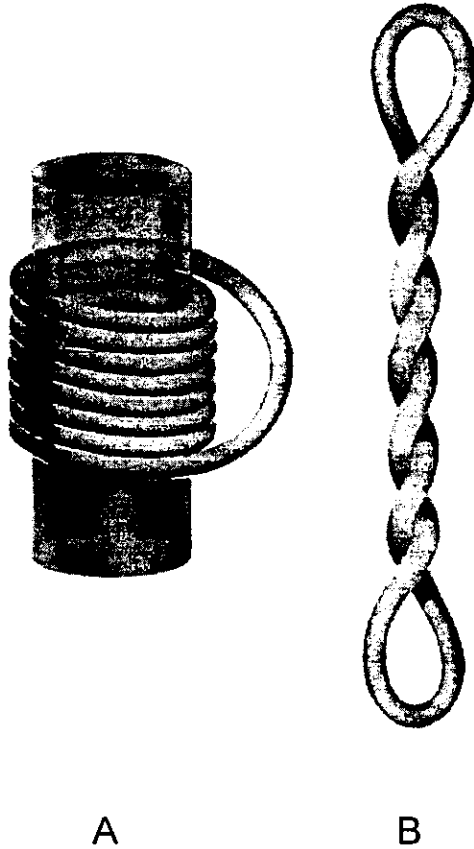


Figura 2. A) Superenrollamiento de tipo toroidal. B) Superenrollamiento de tipo plectonómico.

parámetro permanece constante siempre y cuando las condiciones fisicoquímicas del medio no cambien (sales, pH, temperatura) (Brady *et al*, 1987). El parámetro Lk ("linking number") es un concepto topológico más complejo; representa el número de veces que una hebra del DNA pasa sobre la otra en la molécula de DNA superenrollado. Para cambiar Lk se requiere que se corte la molécula y antes de ligarla nuevamente, se modifique la posición de las hebras en relación a su posición original. Este parámetro se mantiene constante mientras los enlaces fosfodiéster de la molécula de DNA permanezcan intactos. Las enzimas que catalizan los cambios en Lk se denominan topoisomerasas de DNA (Bauer, *et al*. 1980; Reece y Maxwell, 1991; Drlica, 1992).

Sin embargo, estos parámetros son abstractos y representan la topología *in vivo* del DNA dentro de la célula y no pueden aún calcularse. Para calcular el grado de SE del DNA se propuso la siguiente relación:

$$\tau = L - L_0$$

τ es igual al número de supervueltas que puede determinarse experimentalmente en el DNA y equivale a W_r . Este valor se calcula titulando el DNA superenrollado con bromuro de etidio (BrÉt). L_0 representa el número de veces que una hebra cruza a la otra en la molécula relajada de DNA, por lo tanto L_0 equivale a T_w . El parámetro L es equivalente a Lk. Sin embargo, no se sabe aún si existe una relación estricta entre las supervueltas que se calculan experimentalmente y las que se presentan *in vivo* en el DNA (Drlica, 1984).

Cuando una molécula de DNA se encuentra superenrollada puede presentar valores positivos o negativos de τ . Si τ es positivo se dice que la molécula está superenrollada positivamente y por el contrario, si τ es negativo se dice que el DNA está superenrollado negativamente. En la mayoría de las células

tanto procariontes como eucariontes, el DNA se encuentra con SE negativo; la excepción son las bacterias termofilicas que presentan un DNA con superenrollamiento positivo. Entonces en un DNA superenrollado negativamente, τ es un número entero negativo. Para poder comparar las propiedades topológicas de moléculas de DNA de diferente tamaño se utiliza el término de densidad de superenrollamiento σ y la manera de calcularlo es: $(L-L_0)/L_0$. El valor de σ para la mayoría de las moléculas circulares de DNA es de aproximadamente -0.05 . Este valor representa una supervuelta completa aproximadamente cada 200 pares de bases (Reece y Maxwell, 1991; Drilica, 1992).

TOPOISOMERASAS DE DNA.

Las primeras investigaciones para buscar una topoisomerasa de DNA, fueron realizadas al estudiar el problema de separar y rotar las dos hebras de DNA durante la replicación.

En 1971, Wang describió en *E. coli* la actividad de una topoisomerasa capaz de relajar moléculas superenrollada de DNA. Esta enzima se denominó proteína ω y corresponde a la topoisomerasa I. En 1976, Gellert y colaboradores reportaron en *E. coli* a la enzima que cataliza la reacción contraria; es decir que superenrolla a un DNA relajado y la denominó DNA Girasa. En esta misma bacteria se identificaron la topoisomerasa III (Dean *et al*, 1983) y la IV (Kato *et al*, 1990) en 1983 y 1990 respectivamente.

MECANISMOS DE ACCION DE LAS TOPOISOMERASAS.

Las topoisomerasas de DNA son enzimas que cortan al DNA cambiando su topología y se clasifican en topoisomerasas de tipo I y II. Las de tipo I cortan una hebra de DNA y las de tipo II cortan la doble hebra de DNA. Estas enzimas

requieren de iones magnesio, cortan reversiblemente y se unen covalentemente al DNA en el sitio de corte por una unión fosfodiéster. Esta unión se forma entre el grupo fosforilo del DNA en el sitio de corte y una tirosina de la topoisomerasa (Gellert 1981; Drlica 1984; Wang, 1985).

Las topoisomerasas tipo I son endonucleasas que interaccionan preferentemente con un DNA superenrollado. Estas enzimas no requieren ATP y relajan progresivamente un DNA superenrollado. Las topoisomerasas tipo I de bacterias se unen de manera covalente al extremo 5' del DNA en el sitio de corte. Las topoisomerasas tipo I en eucariontes se unen covalentemente al extremo 3' del DNA y relajan al DNA superenrollado tanto negativa como positivamente. Ambas topoisomerasas de tipo I, además de actuar de manera diferente, no están relacionadas filogenéticamente, ya que no presentan una similitud en sus secuencias de aminoácidos (Gellert, 1981; Wang, 1985).

Las topoisomerasas tipo II son endonucleasas que interaccionan preferentemente con un DNA relajado, requieren ATP, inducen un corte de las dos hebras del DNA y disminuyen el valor de L en dos unidades por ciclo de reacción. Los dos tipos de topoisomerasas ligan posteriormente al DNA cortado; sin embargo, lo hacen con las hebras de DNA en una posición topológica diferente a la posición original. Las topoisomerasas tipo II de bacterias y de eucariontes son mecanísticamente diferentes; sin embargo a nivel de secuencia de aminoácidos presentan una similitud importante. Las únicas topoisomerasas tipo II que son capaces de superenrollar negativamente al DNA, son las topoisomerasas de bacterias, por lo que se les denomina girasas (Cozarelli, 1980; Gellert, 1981; Drlica 1982, 1984; Wang, 1985).

En *E. coli* se conocen dos topoisomerasas de tipo I: Topoisomerasa I y Topoisomerasa III y dos topoisomerasas de tipo II: Topoisomerasa II o DNA Girasa y Topoisomerasa IV.

Topoisomerasas tipo I de *E. coli*.

A) Topoisomerasa I.

La topoisomerasa I (Top I) es una proteína de 103 KDa codificada por el gene *topA* que se localiza en el minuto 28 del mapa genético. Esta enzima cataliza *in vitro* las siguientes reacciones: 1) relaja moléculas de DNA superenrolladas negativamente, 2) encadena y desencadena círculos de DNA y 3) genera y resuelve nudos intra-moleculares de DNA circular. Las reacciones 2 y 3 únicamente se realizan si existen cortes y regiones de hebra sencilla en las moléculas de DNA. En estas reacciones la enzima genera el equivalente a un corte doble al cortar la hebra frente al corte previo.

La Top I tiene cierta especificidad por cortar a tres nucleótidos hacia el 3' de un residuo de citosina: 5' CNNN↓ 3' (N representa cualquiera de las cuatro bases).

Además, el incremento en el SE negativo del DNA induce a un incremento en la síntesis de esta enzima. El gene *topA* presenta dos promotores, el promotor 1 es reconocido por σ^{70} , mientras que el promotor 2 es reconocido por σ^{32} (Tse-Dinh y Beran, 1988)

B) Topoisomerasa III.

La topoisomerasa III (Top III) es una proteína de 75 KDa codificada por el gene *topB* que se localiza en el minuto 28.7 del mapa genético de esta bacteria. Esta topoisomerasa presenta una actividad enzimática *in vitro* similar a Top I: corta una hebra de DNA, no requiere ATP, relaja moléculas superenrolladas negativamente al aumentar L en una unidad por ciclo de reacción. Esta enzima también encadena y desencadena, genera y deshace nudos en moléculas circulares que presentan cortes o regiones de hebra sencilla. A diferencia de Top

I, Top III requiere potasio, además de magnesio, corta en sitios diferentes y presenta una mayor actividad a altas temperaturas. Por ejemplo, Top III relaja DNA superenrollado 15 a 20 veces más eficientemente a 52°C que a 30°C; mientras que Top I es sólo 2 veces más eficiente a 52°C que a 30°C.

Topoisomerasas de tipo II de *E. coli*.

A) Topoisomerasa II o DNA Girasa.

La topoisomerasa II o DNA Girasa se describió en 1976 al estudiar los factores necesarios para la integración sitio-específica del bacteriofago λ en el genoma del hospedero. Uno de estos factores era una enzima dependiente de ATP que catalizaba la introducción de supervueltas en el DNA del fago. La DNA Girasa es una enzima tetramérica formada de dos subunidades GyrA y dos GyrB. Estas subunidades están codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, que se localizan en el minuto 48 y 83 respectivamente del mapa genético. Estos genes únicamente tienen un promotor que es reconocido por σ^{70} , además son promotores que al disminuir el grado de SE negativo inducen a su transcripción. La proteína GyrA tiene 874 aminoácidos y pesa 97 KDa, la proteína GyrB tiene 804 aminoácidos y pesa 90 KDa. La proteína GyrA tiene la actividad de cortar una hebra de DNA y de ligarla nuevamente. Esta proteína puede unirse al DNA en ausencia de GyrB. La proteína GyrB tiene una actividad débil de ATPasa que se incrementa importantemente en presencia de GyrA y DNA relajado. La secuencia de aminoácidos de estas proteínas es similar a la de otras topoisomerasas de tipo II; sin embargo, la región de aminoácidos de GyrA del 410 al 443 y del 561 al 731 en GyrB son únicas y características de estas proteínas (Gellert *et al*, 1976, Reece y Maxwell, 1991)

La subunidad GyrA presenta dos dominios estructurales: a) el fragmento amino terminal que presenta una actividad de nucleasa y de ligasa de DNA;

además contiene un sitio de unión a las quinolonas (como el ácido nalidíxico) y b) el fragmento carboxilo terminal que contiene la región que estabiliza al complejo enzimático. La subunidad GyrB presenta también dos dominios: a) uno en el extremo amino, del aminoácido 1 al 394 en el que se localiza el sitio de unión del ATP y de los antibióticos cumarínicos (como la novobiocina) y b) otro en el carboxilo terminal, del aminoácido 394 al 804 que contiene la región de interacción con el DNA y con GyrA (Reece y Maxwell, 1991).

Las funciones realizadas por la Girasa son las siguientes:

1) Superenrollar negativamente al DNA circular cerrado dependiente de ATP; 2) relajar un DNA superenrollado negativamente independiente de ATP; 3) relajar un DNA superenrollado positivamente independiente de ATP; 4) formar y resolver DNA encadenado y 5) resolver nudos de DNA (Reece y Maxwell, 1991).

Los estudios realizados *in vitro* con la enzima DNA Girasa muestran que presenta una actividad dependiente de ATP y DNA; pero esta actividad se ve modificada si se encuentra en presencia de ADP. En 1988 Westerhaff y cols., mostraron que la actividad de superenrollar moléculas de DNA relajadas, depende directamente de la relación $[ATP]/[ADP]$ y no de la suma de la concentración del ATP y ADP. La capacidad de superenrollar moléculas de DNA circulares cerradas relajadas aumenta al incrementar la relación $[ATP]/[ADP]$ y disminuye al decrecer esta relación.

Por otro lado, al estudiarse las propiedades de la enzima DNA Girasa *in vitro*, se encontró que al incubar la enzima a 46°C la actividad de cortar la cadena de DNA por parte de la subunidad GyrA no se ve afectada, mientras que la actividad de ATPasa de la subunidad GyrB se ve afectada dramáticamente. La actividad de la subunidad GyrB después de 10 minutos de incubación presenta el 35% de su actividad y a los 20 minutos únicamente el 10%. La actividad de

superenrollar por parte de la DNA Girasa, también se ve afectada a esta temperatura de una manera similar a la descrita por la subunidad GyrB. Estos estudios se realizaron en ausencia de los cofactores de la Girasa, ATP y ADP (Peebles *et al*, 1979).

El mecanismo que se ha estudiado más a fondo es el de la introducción de supervueltas negativas. El modelo actual propone que la Girasa se une al DNA circular cerrado y forma un complejo DNA-proteína en el que aproximadamente 120 pb de DNA se enrollan alrededor de la enzima, lo que genera el equivalente a la introducción de una supervuelta positiva. Esta tensión estructural se compensa con un giro negativo en otra parte de la molécula. La enzima introduce un corte de doble hebra y las subunidades GyrA se unen covalentemente a través de una tirosina a los extremos 5' del DNA. Posteriormente se cambia la topología de la molécula al pasar la cadena a través del corte, ligar el DNA y desprenderse la enzima del DNA. Esto convierte la supervuelta positiva en negativa. De esta manera, la Girasa introduce dos supervueltas por corte de cadena de DNA. No se conoce con precisión el mecanismo de traslocación de la cadena de DNA a través del corte: sin embargo, los últimos datos de difracción de rayos X del fragmento amino terminal de GyrB sugieren que las dos subunidades GyrB forman una especie de túnel por el cual se transtoca el DNA. La reacción de introducción de supervueltas requiere ATP. Se calcula que por ciclo de reacción (diminución de L en -2) se necesitan dos moléculas de ATP. Aparentemente, la unión ATP-girasa induce un cambio conformacional en la enzima para iniciar un ciclo de reacción y la hidrólisis de ATP se requiere para disociar a la enzima del DNA e iniciar otro ciclo de reacción (Fig. 3) (Wang, 1985; Reece y Maxwell, 1991).

Se ha propuesto que la DNA Girasa, además de actuar catalíticamente, puede contribuir a la organización del DNA en el nucleoide al unirse al DNA en

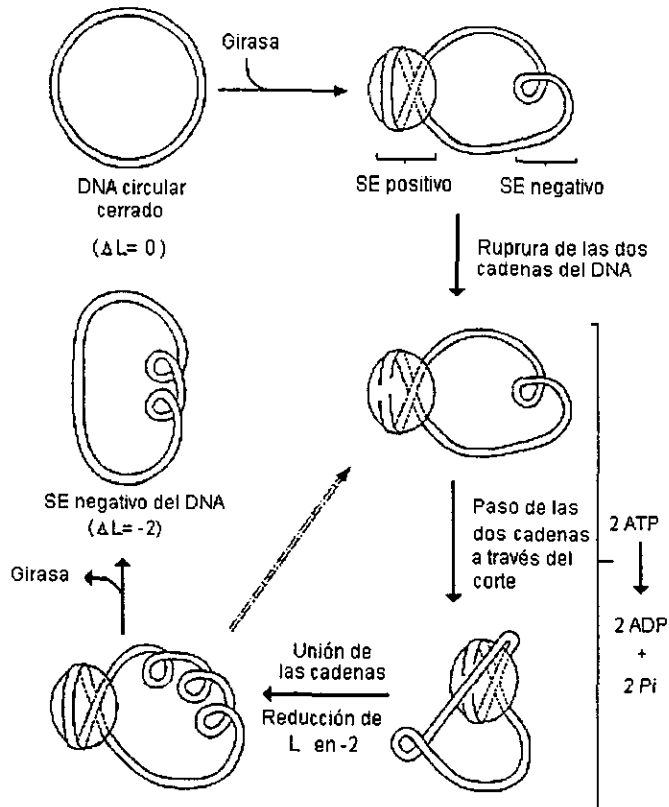


Figura 3. Modelo del mecanismo de introducción de superenrollamiento negativo por la DNA Girasa (Reece y Maxwell, 1991)

ciertos sitios preferenciales, como es la secuencia REP y generar superenrollamiento toroidal. Las secuencias REP ("repetitive extragenic palindromic sequences") son secuencias de aproximadamente 35 pares de bases que se encuentran repetidas de 100 a 200 veces en el genoma de *E. coli* y que representan aproximadamente el 0.5% del genoma. Estas secuencias se encuentran dispersas en regiones extragénicas, frecuentemente en el extremo 3' de los genes. Varias de estas secuencias se encuentran en grupos de 2 a 4 separadas por menos de 25 pares de bases. Se ha calculado que de las 250-500 moléculas de Girasa que hay en una célula aproximadamente el 80% se encuentra unida a esta secuencia. La proteína HU estimula la unión Girasa-REP y posiblemente también participa en la generación del superenrollamiento toroidal que podría generarse a nivel de estas secuencias (Higgins *et al*, 1982; Gilson *et al*, 1984; Stern, 1984; Yang y Ames, 1988; Yang y Ames 1992)

Las topoisomerasas II (Top II) de eucariontes presenta una similitud importante a nivel de secuencia de aminoácidos con la DNA Girasa de bacterias; sin embargo, esta enzima no introduce supervueltas en DNAs circulares cerrados. De manera sencilla se puede decir que mientras la Girasa es capaz de cortar las dos hebras de DNA y cambiar la topología de sus extremos del DNA antes de ligarlos, la topoisomerasa de eucariontes, si bien hace también un corte doble, no es capaz de cambiar las posiciones de los extremos antes de ligarlos. En este caso, el cambio topológico de estos extremos lo realiza otro proceso como puede ser el enrollamiento del DNA alrededor de las histonas. La actividad de la topoisomerasa II de eucarionte permite el ensamble de los nucleosomas al neutralizar la tensión estructural que introduce en el DNA la unión de los nucleosomas. Si se incuba el DNA del virus SV40, que es un DNA circular cerrado, con histonas, se forman nucleosomas y el DNA se enrolla. Si a la mezcla de reacción se le adiciona un extracto celular que contiene a la Top II, se forman nucleosomas, y el DNA queda como un círculo relajado. Sin embargo, si se retira

los nucleosomas sin romper el DNA, la topología de la molécula cambia a DNA superenrollado de tipo plectonómico.

B) Topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV (Top IV) es una enzima tetramérica formada por dos subunidades ParE y dos ParC. Los genes de estas proteínas, *parE* *parC*, se encuentran contiguos en el minuto 65 del mapa genético de *E. coli*. La proteína ParE es de 70 kDa y la ParC de 75 kDa. La secuencia de aminoácidos de ParC presenta una homología importante con el fragmento amino terminal de GyrA. La secuencia de aminoácidos de ParE es similar a la de otras Top II, principalmente a GyrB. La Top IV requiere ATP y corta las dos hebras de DNA; sin embargo no es tipo girasa. Las principales actividades *in vivo* de esta enzima son la de relajar DNA superenrollado y la de separar moléculas de DNA circulares encadenadas. Otra función importante de Top IV es el de desencadenar los dos genomas bacterianos al terminarse un ciclo de replicación (Adams *et al*, 1992)

Regulación Homeostática del Superenrollamiento.

En las bacterias existen mecanismos para regular el grado de superenrollamiento intracelular del DNA. Estos mecanismos están controlados principalmente por la acción de las topoisomerasas de DNA. En mutantes en la enzima Top I presentan elevados niveles de superenrollamiento en el DNA. Estas mutantes presentan un crecimiento lento, sin embargo mutaciones compensatorias permiten a la bacteria su recuperación. Muchas de estas mutaciones compensatorias mapean en los genes de la DNA Girasa (*gyrA* y *gyrB*) y una minoría en los genes de la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), lo que reduce los niveles de superenrollamiento del DNA a sus niveles basales. Estos estudios enfatizan la importancia de la regulación homeostática del superenrollamiento del DNA, por parte de las topoisomerasas en el crecimiento celular (Di Nardo *et al*,

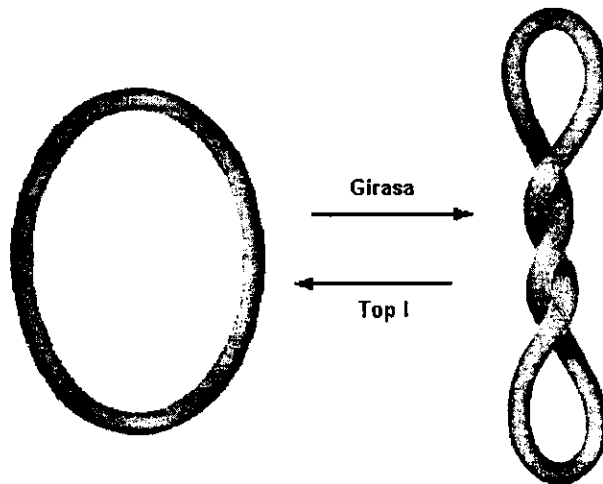


Figura 4. Modelo de la regulación homeostática del superenrollamiento.

1982; Pruss *et al*, 1982; Menzel y Gellert, 1983; McEachern y Fisher, 1989; Reece y Maxwell, 1991)

Hay muy poca evidencia de la participación de las topoisomerasas III y IV en el control del nivel de superenrollamiento. La topoisomerasa III se expresa a muy bajos niveles (de 1 a 10 moléculas por célula) y no se han presentado evidencias de que las mutaciones en estos genes alteren el grado de superenrollamiento, aunque la sobreproducción de Top IV puede suprimir mutantes en Top I.

Sistemas de expresión genética dependientes de SE.

El efecto que el SE del DNA tiene sobre la expresión de los genes, se basa en los mecanismos de interacción entre la RNA polimerasa y el DNA para el inicio de la transcripción. Durante la interacción se generan varios estados intermediarios que concluyen con la separación de las hebras en el complejo abierto (Amouyal y Buc, 1978; Siebenlist, 1979). La facilidad para separar las 2 hebras de DNA influye en la posibilidad de la transcripción de los genes; por lo que el DNA superenrollado negativamente, que tiende a separar las hebras de DNA, teóricamente favorece a la transcripción (Mishra y Chatterji, 1993). Sin embargo, no todos los genes tienen un mejor nivel de expresión en un DNA con SE negativo, hay genes que se expresan mejor con un DNA con menor grado de superenrollamiento, o bien hay genes que se expresan igual en un DNA relajado o que en un SE. Esto ha generado que no se tenga un modelo único para explicar el efecto que tiene el SE del DNA sobre la transcripción de los genes. Una de las hipótesis que ha tenido mayor consenso, propone que los genes que modifican su expresión al variar el SE, presentan promotores débiles. Estos promotores se transcriben mejor cuando cierto grado de SE asegura una posición espacial *óptima de las regiones -10 y -35* (Wang y Syvanen, 1992).

Por otra parte, se ha propuesto que el grado de SE puede modificar no solo la expresión de genes individuales, sino también a la de conjuntos de genes de varios sistemas globales de regulación. Por ejemplo, durante las respuestas a estrés oxidativo, osmótico y calórico se observan cambios en el nivel de SE que podrían ser importantes para la inducción de los genes de estrés.

SE del DNA y estrés calórico.

En estudios realizados *in vitro* con moléculas de DNA circulares, se observó una disminución del ángulo de giro entre las bases del DNA conforme hay un incremento gradual en la temperatura. Esta disminución en el ángulo de giro provoca un número mayor de bases por cada vuelta de 360°C de la doble hélice de DNA; por lo que ocasiona una disminución del parámetro L_0 . La reducción en L_0 provoca la relajación de moléculas de DNA con SE negativo (Depew y Wang 1975; Pulleyblank *et al*, 1975).

In vivo el grado de SE de un plásmido reportero es mayor en células que se encuentran a 37° que en células a 17°C. Además, durante un estrés de 17° a 37°C se observa un aumento gradual en el grado de SE hasta alcanzar el nivel característico de 37°C. Este nivel se presenta durante los 10 y 30 minutos de la respuesta al estrés. Una explicación de estos resultados es que el incremento en la temperatura disminuye L_0 y con ello el grado de SE del DNA; por lo que posiblemente la enzima DNA Girasa se favorezca temporalmente en su actividad y catalice el incremento en el SE del DNA (Goldstein y Drlica, 1984).

En otros estudios sobre el efecto del estrés de temperatura sobre el SE se ha empleado condiciones de temperaturas más elevadas, incluso letales (por arriba de 50°C): cambios de 30°C a 42-52°C (Mizushima *et al*, 1993; Ogata *et al*, 1994; Camacho-Carranza *et al*, 1995). A los 2 minutos del estrés calórico se presentó una disminución del SE (Mizushima *et al*, 1993; Ogata *et al*, 1994)

seguida de un incremento en el SE del plásmido, hasta alcanzar a los 10-15 minutos, un nivel similar o ligeramente superior al de células a 30°C (Mizushima *et al*, 1993; Ogata *et al*, 1994; Camacho-Carranza *et al*, 1995). La recuperación en el grado de SE no se presenta si las células se tratan con novobiocina (un inhibidor de la actividad de la DNA Girasa) o con cloramfenicol (inhibidor de traducción del mRNA). Si el cloramfenicol se adiciona al momento de dar el estrés no se observa la recuperación del SE del plásmido en comparación si el cloramfenicol se adiciona 5 minutos después del estrés. Estos resultados sugieren que la DNA Girasa y/o las proteínas que se sintetizan en los primeros 5 minutos del estrés tienen un papel importante en el nivel del SE del plásmido. Dentro de las proteínas que se sintetizan en los primeros 5 minutos del estrés podrían estar, además de las proteínas de estrés calórico, la DNA Girasa, ya que los genes de esta proteína se inducen al relajarse el DNA (Camacho-Carranza *et al*, 1995).

Es importante resaltar, que la recuperación del SE se observa incluso a temperaturas letales, lo que sugiere fuertemente que la Girasa es activa a estas temperaturas. Sin embargo, la Girasa *in vitro*, como ya se mencionó, es poco activa a temperaturas por arriba de 46°C. Por otro lado, la DNA Girasa no se ha identificado como proteína de estrés calórico, sino de estrés por frío (cold shock) (Jones *et al*, 1992), ya que se observó que en este estrés se presenta un aumento en la cantidad de las subunidades GyrA y GyrB. Sin embargo, en células cancerosas edipermoides humanas, durante la respuesta a estrés calórico se incrementa de manera notable los niveles de la enzima topoisomerasa II. Esto sugiere que la topoisomerasa II de eucarionte es como una proteína de estrés calórico (Matsuo *et al*, 1993).

SE del DNA y relación [ATP]/[ADP] en situaciones de estrés.

En diferentes situaciones de estrés se ha observado que los cambios en el grado de superenrollamiento del DNA se acompañen de cambios en la relación [ATP]/[ADP].

Por ejemplo, en *E. coli*, durante un estrés por anaerobiosis en los primeros 5 minutos se observó una disminución en el grado de SE tanto en el nucleóide bacteriano como en plásmidos. En este mismo periodo de tiempo la relación [ATP]/[ADP] intracelular disminuyó aproximadamente un 67%. Después de 20 minutos del estrés el grado de SE se incrementó, hasta alcanzar mayores niveles que en condiciones basales; justo con el aumento en el SE hubo un incremento en la relación [ATP]/[ADP] (Hsieh *et al*, 1991A).

Posteriormente, se encontró que al incrementar la fuerza osmótica del medio hay un aumento súbito en el SE durante los primeros 5 minutos de la respuesta. Aunado al cambio, la relación [ATP]/[ADP] aumentó alrededor de 8 veces. Después de este tiempo se observó un decremento en la relación [ATP]/[ADP] y en el grado de SE (Hsieh *et al*, 1991B).

Los datos anteriores sugieren que existe una relación entre el nivel de SE del DNA y la relación [ATP]/[ADP]. Es posible que esta relación también cambie en el caso de estrés por calor en *E. coli*. Respecto a esto, existe un estudio sobre los cambios en la concentración celular de las alarmonas (AppppA, ApppGpp, etc) durante un estrés de calor en *Salmonella typhimurium*, donde además se determinó la concentración de ATP y ADP. De los resultados se puede calcular que a los 10-20 minutos del estrés se presenta un incremento en la relación [ATP]/[ADP] de 1.4 veces; posteriormente esta relación regresa a sus niveles basales. En este estudio no se determinó el grado de SE del DNA (Lee *et al*, 1983).

Una hipótesis probable es que exista una correlación entre el nivel de SE y en la relación [ATP]/[ADP]. Un grado de SE alto correlaciona con una relación [ATP]/[ADP] alta y un SE menor con una relación [ATP]/[ADP] menor. Durante la respuesta a estrés calórico de 30 a 47°C donde se incrementa el grado de SE del DNA es posible que haya un incremento en la relación [ATP]/[ADP] intracelular en *E. coli*.

Efecto de cofactores y retención de la estructura nativa de proteínas

Con estudios realizados *in vitro*, se ha tratado de correlacionar el efecto de diferentes cofactores para diferentes enzimas, y la propiedad que ejercen para evitar la pérdida de su estructura nativa a diferentes agentes desnaturizantes.

Por ejemplo, la proteína DnaBts de *E. coli* es más termoestable en presencia de ATP y ADP (Günter *et al*, 1981); la enzima NADP⁺ málica de las hojas de la caña de azúcar, también es más termoestable a 50°C si están presente sus cofactores y su sustrato (MgCl₂, L-malato y NADP⁺) (Iglesias *et al*, 1991). Finalmente, la enzima citrato sintasa de *E. coli*, retiene el 60% de su actividad si se incuba en presencia del oxalacetato en presencia de urea (Faloona y Srere, 1969).

Lo anterior muestra que varias enzimas son más estables ante un agente desnaturizante, siempre y cuando estén en presencia de sus cofactores. Los ensayos *in vitro* de inactivación por calor con la DNA Girasa se realizaron en ausencia de cofactores, como el ATP y ADP, por lo que sería interesante realizar estos ensayos en presencia de éstos nucleótidos, en el caso de que existan cambios en las pozas de ATP y ADP durante el estrés calórico.

OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivos principales:

Determinar la cantidad de las proteínas GyrA y GyrB durante la respuesta celular a estrés calórico a 47°C.

Determinar la concentración intracelular de los nucleótidos de ATP y ADP durante esta respuesta celular a estrés calórico a 47°C.

Correlacionar los cambios de la relación $[ATP] / [ADP]$ durante la respuesta celular a estrés calórico a 47°C, con los cambios reportados en el grado de SE.

Si se observan cambios en la relación $[ATP]/[ADP]$, cuantificar *in vitro* el nivel de actividad de la Gírasa a 46°C en presencia de ATP.

HIPOTESIS

Para abordar estos objetivos, se propusieron las siguientes hipótesis:

En un genoma con superenrollamiento negativo, un aumento súbito de temperatura provoca una disminución del valor de τ , lo que provoca la relajación del DNA superenrollado. Los promotores de los genes de *gyrA* y *gyrB* se transcriben mejor en un genoma relajado, por lo que en los primeros minutos del estrés se espera una mayor síntesis de la DNA Girasa.

Durante la respuesta celular a un estrés osmótico o anaeróbico, se encontró una correlación entre un incremento en el SE y un aumento en la relación $[ATP]/[ADP]$. *In vitro* si se aumenta la relación $[ATP] / [ADP]$ aumenta la actividad por parte de la DNA Girasa. Durante la respuesta celular a estrés calórico a 47°C se observó un incremento en el grado de SE por lo tanto se espera un incremento en la relación $[ATP]/[ADP]$ durante esta respuesta.

Enzimas como la citrato sintasa, la NADP⁺ málica y la DnaB, en presencia de sus cofactores, presentan una mayor estabilidad en su conformación nativa a diferentes agentes desnaturizantes, es posible que la DNA Girasa en presencia de ATP a 46°C, tenga una mayor termoresistencia.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos:

Para la realización de este trabajo se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* K-12: W3110 F⁻ λ⁻ protótrofa, la C600 F⁻ Thr⁻ Leu⁻ Thi⁻ Lac⁻ y la JM109 *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15]*; así como los plásmidos: pMS01 (Amp^R) derivado de pBR322, sin la resistencia a tetraciclina (León *et al*, 1988); el pPH3 (Amp^R) con el gene *gyrA* clonado bajo el control de un promotor *tac* y el pAG111 (Amp^R) con el gene *gyrB* clonado bajo el control del mismo promotor. Los plásmidos pPH3 y pAG111 son derivados del plásmido pTTQ (Hallet *et al*, 1990).

Obtención de curvas de crecimiento bacteriano:

Se preparó un cultivo de toda la noche de la cepa W3110 en el medio de cultivo adecuado. Este cultivo se diluyó 1/50 (200 μL de este cultivo y 10 mL del mismo medio) y se incubó a 30°C en baños con agua en agitación a 180 rpm (New Brunswick Scientific modelo G76). El crecimiento bacteriano se midió indirectamente como turbidez del cultivo en un espectrofotómetro a 550nm de longitud de onda, a intervalos de 20 a 30 minutos (Milton Roy Spectronic 20 D).

Medio Mínimo:	
NH ₄ Cl (Baker)	18 mM
KH ₂ PO ₄ (Baker)	22 mM
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O (Baker)	42 mM
NaCl (Baker)	171 mM
MgSO ₄ (Baker)	0.025%
Dextrosa (Baker)	0.2%

Medio Luria:	
Extracto de levadura (Difco)	0.5 %
Triptona (Merck)	1%
NaCl (Baker)	8.5 mM
Timina (Sigma)	20 μg/ml
pH	7.0

Obtención del plásmido pMS01:

El plásmido pMS01 se obtuvo de la cepa C600/pMS01 por el método de lisis alcalina (Sambrook, *et al.* 1989). Para esto se preparó un cultivo de toda la noche de esta cepa en medio Luria con ampicilina ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Este cultivo se diluyó 1/50 en 10 mL de medio Luria con ampicilina ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubó a 30°C a 180 rpm hasta que alcanzó una D.O._{550nm} de 0.4. Una vez alcanzada esta densidad, se tomó 1 mL del cultivo, se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf 1 minuto a 14 Krpm a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se agregó 90 μL de la solución I y 10 μL de RNAsa (10 mg mL^{-1}). La pastilla celular se resuspendió por agitación y se dejó con aireación durante 5 minutos. A continuación se agregaron 200 μL de la solución II, se mezcló manualmente hasta que se observó un lisado claro y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se añadió 200 μL de la solución III fría, se mezcló manualmente y se centrifugó a 4°C en una microcentrifuga Eppendorf durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se le agregó 250 μL de fenol (USB) y 250 μL de cloroformo (Merck). Esta mezcla se agitó manualmente y se centrifugó durante 1 minuto en una microcentrifuga Eppendorf a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa, se le agregó 650 μL de isopropanol (Merck) y se dejó a -20°C toda la noche. Finalmente se centrifugó por 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf a 4°C , la pastilla de DNA se dejó secar y se resuspendió en 10 μL de agua desionizada estéril.

Solución I:

Dextrosa (Baker)	50 mM
Etilendiamintetraacetato de sodio, EDTA (pH 8)	10 mM
Tris (Sigma) (pH 8)	25 mM
Lisozima (Sigma)	5mg/ml

Solución III:

Acetato de Potasio (Baker)	3 M
Acido acético glacial (Baker)	11.5%
pH	5.6

Solución II:

Dodecil sulfato de sodio, SDS (Sigma)	1 %
NaOH (Baker)	0.2 N

Transformación bacteriana con el plásmido pMS01.

La cepa W3110 se creció en 10 ml de medio Luria con agitación a 180 rpm a 30°C, hasta que alcanzó una D.O._{550nm} de 0.4; se tomó 0.5 mL del cultivo y se le adicionó 0.5 mL de TSS 2X y se mezcló manualmente. De esta mezcla se tomó 100 μL y se le añadió 1 μl del plásmido pMS01 (1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). La mezcla de transformación se incubó 30 minutos en hielo; posteriormente 5 minutos a 43°C y se sembró por goteo a cajas con medio Luria con ampicilina (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como medio de selección.

TSS 2X:		Cajas de Medio Luria:
NaCl (Baker)	1 %	Medio Luria líquido con 2% de Bacto Agar (Difco)
Triptona (Difco)	1 %	
Extracto de levadura (Difco)	0.5 %	
MgCl ₂ (Merck)	50 mM	
Polietilenglicol, PEG, 8000 (Sigma)	20%	
Dimetil sulfóxido, DMSO (Merck)	10 %	
pH	6.5	

Separación de topoisómeros del plásmido pMS01 en geles de agarosa:

a) Obtención del plásmido pMS01.

Se puso un cultivo de toda la noche de la cepa W3110/pMS01 en medio mínimo con ampicilina (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se tomaron 200 μL del cultivo de toda la noche y se agregaron a 10 mL de medio Mínimo. El cultivo se agitó a 180 rpm a 30°C hasta que alcanzara una D.O._{550nm} de 0.35. Las bacterias se colectaron por centrifugación en una Sorvall, con un rotor SS34 durante 16 minutos a 10 Krpm a 5°C. La pastilla de células se colectó y se le agregó 10 mL, ya sea de medio Mínimo nuevo (fresco), medio de dilución (MgSO₄ 10 mM) o agua desionizada estéril. Las células se resuspendieron manualmente y se dejó el cultivo agitándose 5 minutos a 30°C en matraces nefelométricos, en seguida se aplicó el estrés calórico a 47°C durante 15 minutos. Una vez concluido el estrés, se centrifugó el

cultivo a 10 Krpm durante 18 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Sorvall con un rotor SS34. La pastilla de células se resuspendió en 200 μL de la solución I y 60 μL de RNasa (10 mg mL^{-1}); se dejó a temperatura ambiente con aireación durante 5 minutos. Posteriormente se le adicionaron 200 μL de la solución II y se mezcló manualmente hasta que se observara un lisado y se dejó durante 10 minutos a 0°C . A este lisado se le añadieron 150 μL de la solución III fría, se mezcló manualmente y se congeló durante 10 minutos en un baño de hielo seco con etanol. El lisado se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf durante 10 minutos a 14 Krpm a 4°C , se tomó el sobrenadante, se le agregaron 650 μL de isopropanol y se guardó toda una noche a -20°C . Después se centrifugó a 4°C durante 10 minutos, la pastilla de DNA se secó completamente y se resuspendió en 10 μL de agua y 15 μL de colorante para DNA.

b) Separación de los topoisómeros en geles de agarosa.

Las formas isoméricas del plásmido pMS01 se separaron por electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 1%. Se usó un amortiguador de TBE con cloroquina a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se aplicó un voltaje de 20 volts durante 18 horas (2 V/cm). Una vez concluida la electroforesis, el gel se lavó durante 4 horas en agua destilada con cambios de agua cada hora y se tiñó después con bromuro de etidio a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 20 minutos. El gel se lavó nuevamente con agua por 10 minutos y se le tomó una fotografía con películas Kodak TRI-X pan utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y un filtro rojo (Dorman *et al*, 1988; Ni Bhriain *et al*, 1989; Higgings *et al*, 1988).

TBE:		Colorante para DNA:	
Trizma (Sigma)	90 mM	EDTA (Sigma)	1 mM
Ácido Bórico (Baker)	90 mM	Azul de Bromofenol	0.25 %
EDTA (Sigma)	10 mM	Xilencianol	0.25 %
Cloroquina	10 $\mu\text{g/ml}$	Glicerol	30 %
pH	8.3		

Determinación por cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) de la concentración celular de ATP y ADP.

A) Obtención del extracto celular.

Se preparó un cultivo de la cepa W3110 en 10 mL en medio Mínimo preparado con agua especial para HPLC*. Cuando el cultivo alcanzó una $D.O_{550nm}$ de 0.35, se centrifugó durante 2.5 minutos a 6 Krpm en una centrifuga Sorvall, en un rotor SS34. Los 5 mL superiores se retiraron con vacío y los 5 mL inferiores se agitaron manualmente, se vaciaron nuevamente al matraz nefelométrico y se incubó durante 5 minutos a 30°C. En seguida se aplicó el estrés calórico a 47°C durante 5, 10 y 30 minutos. Una vez terminado el estrés se tomaron 3 mL de cultivo y pasaron a un tubo corex con 170 μ L de ácido perclórico (Baker) al 60% que se encontraba en un baño hielo-agua. Se dejó durante 1 hora en el cuarto frío y los pasos posteriores se realizarían en el mismo. Para neutralizar la solución, se tomó 1 mL y se añadieron 80 μ L de carbonato de potasio (Baker) 2.5 M frío. La solución se mezcló y se centrifugó durante 10 minutos en una microcentrifuga Eppendorf a 14 Krpm, se tomó el sobrenadante y se le midió el pH con papel indicador. El procedimiento se repitió, pero con adiciones de 6-7 μ L de carbonato de potasio hasta que alcanzara un pH entre 6.7 y 6.9 y se congelaron a -70°C. El día del análisis de las muestras por HPLC, estas se sacaron del congelador y directamente se centrifugaron 10 minutos en el cuarto frío en una microcentrifuga Eppendorf. El sobrenadante se separó, se le midió el pH final y se incubó en hielo-agua hasta su inyección al aparato de HPLC.

* El agua para HPLC se preparó a partir de agua bidestilada desionizada que se redestiló en un destilador Corning mega-pure.

B) Separación del extracto celular por HPLC en una columna de intercambio iónico.

Se inyectaron 100 μ L del extracto en el aparato para cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) (Diode Array Detector Module 168 de Beckman) con una columna μ -Bondapack C-18 (125 Å, 10 μ m, 3.9 X 300 mm, Waters Millipore) de intercambio iónico. La columna estuvo a un flujo de 1.6 mL por minuto con el amortiguador de corrida. Los nucleótidos se detectaron con luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm. Para poder determinar la zona de retención del ATP y ADP se coinyectaron cantidades conocida de ATP y ADP (200 pmolas) con la muestra. También se realizó una curva de calibración de la concentración del ATP y ADP con 50 y 200 pmolas. La determinación de la concentración del ATP y ADP en las muestras se hizo mediante un programa de computo de Beckman. El cálculo se realizó por la integración de los picos correspondientes de valle a valle y su relación con los estándares de ATP y ADP.

Amortiguador de corrida:	
Hidróxido-butil Amonio (Sigma)	2 %
KH ₂ PO ₄ (Baker)	0.1 M
Metanol (Merck)	18 %
Agua para HPLC	
pH	7.0

Determinación de las proteínas GyrA y GyrB con anticuerpos monoclonales por el método de "Western Blot".

a) Obtención de las proteínas celulares totales.

La cepa de Escherichia coli W3110 se creció en medio Luria con agitación hasta una D.O._{550nm} de 0.4 y a continuación se les sometió a un estrés calórico a 47°C durante de 5, 10 y 15 minutos. Se tomó 1 mL del cultivo a 30°C y de los

cultivos a 47°C a los tiempos indicados y se vaciaron a tubos Eppendorf con 100 µL de ácido tricloroacético al 50%, que se encontraban en una baño hielo-agua. Se incubaron durante 20 minutos y a continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 14 Krpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 40 µl del amortiguador de lisis Laemmli. Las muestras se guardaron a -20°C.

Por otra parte se prepararon proteínas totales de las cepas de *E. coli* sobreproductoras de GyrA y GyrB. Para ello se crecieron las cepas JMTacA y JMTacB a 30°C en medio Luria con ampicilina (50 µg mL⁻¹) hasta una D.O._{550nm} de 0.1, se les adicionó IPTG a una concentración final de 0.05 mM y se incubaron a 30°C con agitación por 4 horas (Hallett, 1990). Se tomó 1 mL del cultivo, se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf durante un minuto a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 µL del amortiguador de lisis Laemmli. Las muestras se guardaron a -20°C.

Amortiguador de lisis Laemmli:	Solución de IPTG (Promega)	20 mM
Glicerol	(Isopropil-β-tiogalactopiranosido)	
SDS (Sigma)		10 %
Tris• HCl (Sigma) (pH 6.8)		2.3 %
β-Mercaptoetanol (Bio Rad)		62.5 mM
Azul de Bromofenol (Merck)		5 %
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF, (Sigma)		0.001 %
		100 µg/ml

b) Separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación de las proteínas se realizó según Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida de 72 X 82 mm y 100 X 140 mm. Para los minigeles (72 X 82 mm) se preparó la parte concentradora del gel con las siguientes cantidades: 3.05 mL de agua desionizada estéril, 1.25 mL de la solución D, 0.66 ml de la solución A, 50 µL de la solución C, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 2.5 µL de

TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina, Bio-Rad) y se dejó 30 minutos para que polimerizara. La parte separadora del gel se preparó al 7.5 % de acrilamida con: 4.85 mL de agua desionizada estéril, 2.5 mL de la solución B, 2.49 mL de la solución A, 100 μ L de la solución C, 25 μ L de persulfato de amonio al 10% y 5 μ L de TEMED (Bio-Rad); se dejó polimerizar durante 30 minutos.

Las muestras con las proteínas en amortiguador de lisis Laemmli se hirvieron durante 5 minutos, se tomaron 5 μ L de las mismas y se realizó su electroforesis con el amortiguador Laemmli. La parte concentradora del gel se corrió a 70 Volts y la parte separadora a 170 Volts. Posteriormente se tiñó el gel con el colorante azul de Coomassie y se destiñó con ácido acético al 10%. Este gel se empleó para comparar de manera gruesa la cantidad relativa de proteínas en los diferentes carriles.

Para el gel de 100 X 140 mm se preparó al 7.5% de acrilamida. La parte concentradora del gel se preparó con: 1.5 mL de la solución A, 1.87 mL de la solución D, 0.15 mL de la solución C, 11.3 mL de agua desionizada, 0.17 mL de persulfato de amino al 10%, 8 μ L de TEMED y se dejó 30 minutos para que polimerizara. La parte separadora del gel se preparó con las siguientes cantidades: 12.5 mL de la solución A, 6.25 mL de la solución B, 0.5 mL de la solución C, 30.6 mL de agua desionizada, 0.2 mL de persulfato de amonio al 10%, 16 μ L TEMED y se dejó polimerizar durante 30 minutos. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, se tomaron 20 μ L de las mismas y se realizó su electroforesis con amortiguador Laemmli. La parte concentradora del gel se corrió a 40 Volts y la parte separadora a 120 Volts. Una vez concluida la electroforesis, la parte superior del gel se cortó (que correspondió de los 53 a los 112 KDa) y se transfirió a papel de nitrocelulosa; la otra mitad inferior se tiñó con azul de Coomassie.

Solución A:		Solución B:	
Acrilamida (Bio Rad)	30%	Tris	3M (pH 8.8)
Bis-acrilamida (Bio Rad)	0.08%		
Solución C:		Solución D:	
SDS	10 %	Tris	0.5 M (pH 6.8)
Tinción para geles de proteína:		Amortiguador Laemli	
Acido acético (Baker)	10 %	Trizma base (Sigma)	25 mM
Metanol (Merck)	30 %	Glicina (Merck)	220 mM
Coomassie R250 (Sigma)	0.06 %	SDS (Sigma)	0.1 %

c) Transferencia de las proteínas del gel a filtros de nitrocelulosa.

La parte superior del gel de proteínas se transfirió a papel de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) en una cámara de transferencia (Idea Científico, Genie) con el amortiguador de transferencia durante 2 horas a 25 volts y un 1 Ampere.

Amortiguador de transferencia:	
Trizma base (Sigma) (pH 8.3)	25 mM
Na ₂ HPO ₄ anhidro	7.2 mM
Glicina (Merck)	192 mM
Metanol (Merck)	20 %

d) Incubación del filtro con los anticuerpos anti GyrA y anti GyrB.

La membrana de nitrocelulosa en una solución de bloqueo y se incubó toda la noche a 4°C, después se lavó 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez. A continuación se incubó 4 horas a temperatura ambiente con agitación lenta constante con solución Biotto (Maxwell, comunicación personal) con el anticuerpo monoclonal de ratón (IgG_{2b}) dirigido al dominio de 64 kDa de la subunidad A de la DNA Girasa ó con el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido al dominio de 40 kDa de la subunidad B de la DNA Girasa (IgM). Los anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:1000. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada vez y se incubó con la proteína A-Biotina (Amersham) a una dilución 1:500

en PBS-Tween durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Para el caso del anticuerpo anti-GyrB la membrana se incubó primero con un segundo anticuerpo policlonal (IgG) contra la región FC de anticuerpos IgM de ratón durante una hora, se lavó 3 veces con PBS-Tween y se incubó después proteína A-biotina. La membrana se lavó nuevamente 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS-Tween y se incubó con Streptavidina-Peroxidasa (Amersham) en PBS-Tween a una dilución 1:500 durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó una vez con PBS-Tween durante 5 minutos y dos veces con PBS por 5 minutos cada una. Las bandas correspondientes a las proteínas GyrA o GyrB en la membrana se revelaron con el método de luz, por medio del Kit ECL™ de Amersham. Para esto, las placas de rayos X (Kodak) se expusieron a las membranas a tiempos diferentes según la luminiscencia de cada filtro y se revelaron según recomendaciones del proveedor.

PBS:		Solución de bloqueo:	
NaH ₂ PO (anhidro)	7.25 mM	Tween 20 (Sigma)	0.3%
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O (Baker)	2.8 mM	BSA fracción V (Gibco BRL)	3%
NaCl (Baker)	126.6 mM	Disueltos en PBS	
pH	7.2		

PBS-Tween:

Polioxietilensorbitan monolaurato (Tween 20) (Sigma) 0.1 % disuelto en PBS

Blotto:

Tween 20 0.1%

Leche Svelty 3 %

Disueltos en PBS

Los anticuerpos monoclonales anti-GyrA y anti-GyrB fueron donados amablemente por el Dr. Anthony Maxwell de la Universidad de Leicester, Inglaterra.

El anticuerpo policlonal anti-IgM de ratón fue donado amablemente por el Dr. Edmundo Lamoyi del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Determinación de las proteínas de GyrA por inmunoprecipitación.

a) Marcaje de proteínas con L-[³⁵S]-Metionina y obtención del extracto.

La cepa W3110 se puso a crecer en 10 mL de medio Mínimo hasta una D.O._{550nm} de 0.35, se tomaron 0.5 mL del cultivo para cada condición experimental, se vaciaron a tubos Eppendorf, se añadieron 20 μ Ci de L-[³⁵S]-Metionina [> 1000 Ci/mmol] (Amersham) a cada tubo y en seguida se dio un estrés calórico a 47°C durante 5 y 10 minutos. Las proteínas de células cultivadas a 30°C y de células cultivadas a 30°C se marcaron con 20 μ Ci de L-[³⁵S]-Metionina [> 1000 Ci/mmol] (Amersham) expuestas a novobiocina (400 μ g mL⁻¹) durante 10 minutos. La incorporación del radioisótopo se detuvo con la adición de 50 μ L de metionina no marcada (50 mg mL⁻¹). Después de un minuto, se le agregaron 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 50% frío y se incubó a 0°C durante 20 minutos. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 4°C en una microcentrifuga Eppendorf y las pastillas se lavaron 2 veces con 1 mL de acetona al 80%. Posteriormente se resuspendieron en 50 μ L de TES. Las muestras se incubaron durante 3 minutos en un baño con agua hirviendo y a continuación se les adicionó 1 mL de Buffer AB frío y se centrifugó 10 minutos a 4°C en una microcentrifuga Eppendorf. Se tomaron 750 μ L del sobrenadante y se vaciaron a otro tubo Eppendorf (Menzel *et al*, 1983).

Alícuotas de 1, 2, 4 y 8 μ L de los sobrenadantes se colocaron sobre filtros Whatman 3MM dejándose secar. Se realizó un primer lavado de los filtros con TCA al 10% frío durante 10 minutos, se retiró y se agregó TCA frío al 5% y se dejó durante 10 minutos, se quitó y finalmente se lavaron con etanol absoluto frío durante 10 minutos. Todo esto se realizó en un baño hielo-agua y se agitó de vez en cuando. Los filtros se secaron, se colocaron en viales con 5 mL de líquido de

centelleo y se determinó el número de cuentas radioactivas por minuto en un contador de centelleo (Packard 1500 Tri-Carb).

b) Incubación del extracto celular con el anticuerpo monoclonar anti-GyrA.

Primero, se incubó el anticuerpo anti *gyrA* (IgG_{2b}) con perlas de sefarosa-proteína A (Pharmacia Biotech) en una relación de 10 μL de perlas de sefarosa-proteína A por 2 μL del anticuerpo ($1.48 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) durante 2 horas con agitación constante en un volumen total de 750 μL en PBS. Las perlas se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS tratando de recobrar todas las perlas después de cada lavado. Después de esto, las perlas se incubaron con una cantidad de extracto celular equivalente a 1.5×10^6 cpm y se añadió amortiguador AB frío para tener un volumen de incubación final de 750 μL . Las perlas con el extracto celular se incubaron 4 horas con agitación constante; al final las perlas se lavaron 6 veces con 1 mL de amortiguador AB tratando cada vez de recobrar todas las perlas. Todo el proceso se realizó en frío. Después del último lavado se retiró todo el amortiguador AB y se agregaron 10 μL del amortiguador de lisis Laemmli. La muestra se hirvió durante 5 minutos y se separó por electroforesis en un minigel al 7.5% de acrilamida.

c) Fluorografía del gel con PPO-DMSO y autoradiografía.

Para aumentar la eficiencia de la radiactividad para imprimir sobre las placas de rayos X, el gel se incubó con DMSO (Merck) durante una hora, con 1 cambio de DMSO a la media hora; el DMSO se retiró y se incubó en PPO-DMSO durante 3 horas. Posteriormente se incubó el gel durante dos horas en agua, cambiando el agua en 2 ó 3 ocasiones (Bonner y Laskey, 1974). El gel se colocó entre dos hojas de celofán y se secó con vacío y calor en un secador para geles

(Bio-Rad modelo 224). Las placas de rayos X (Kodak) se expusieron al gel tratado durante 2 días y finalmente se revelaron según recomendaciones del proveedor.

Medio Mínimo:		Amortiguador AB:	
NH ₄ Cl (Baker)	0.018M	Tritón X-100 (Merck)	2 %
KH ₂ PO ₄ (Baker)	0.022 M	Tris•HCl (Sigma) (pH 8)	50 mM
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O (Baker)	0.042 M	NaCl (Baker)	50 mM
NaCl (Baker)	8 mM	EDTA (Sigma) (pH 8)	1 mM
MgSO ₄ (Baker)	0.025%	PPO:	
Dextrosa (Baker)	0.2%	PPO (USBC)	22.2% disuelto en DMSO
Aminoácidos (Excepto Met)	20µg/ml		
PBS:		TES:	
NaH ₂ PO (anhidro)	7.25 mM	Tris•HCL (Sigma) (pH 8.0)	50 mM
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O (Baker)	2.8 mM	EDTA (Sigma) (pH 8)	1 mM
NaCl (Baker)	126.6 mM	SDS (Sigma)	1 %
pH	7.2		

Líquido de Centelleo:
 8 gr de PPO (2, 5- difeniloxazol)
 0.1 gr de POPOP (2, 2'-p- fenilenbis (5- feniloxazol))
 1 litro de tolueno

Inactivación de la Girasa por calor (46°C) en presencia o ausencia de ATP *in vitro*.

La actividad de la Girasa se determinó utilizando como sustrato moléculas relajadas del plásmido pHOT1.

Dos unidades (0.4 µL) de Girasa (16 mg mL⁻¹)(Lucent) y 0.6 µL de amortiguador de almacenamiento en ausencia o presencia de ATP (1µL de ATP a 20 mM) se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se incubó una muestra a 46°C y otra a 37°C durante 30 minutos. Después se les adicionó 6 µl del amortiguador de incubación, 0.4 µL del plásmido pHOT1 (0.25 µg µL⁻¹) relajado, 0.6 µL de rRNA (10 µg µL⁻¹) y 20 µL de agua desionizada y se incubaron

durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionó 30 µL de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló manualmente, se centrifugó 5 segundos en una picofuga, se tomó el sobrenadante, se le adicionaron 30 µL de etanol absoluto y 1.2 µL de NaCl 5 M y se incubó a -20°C toda la noche. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10 Krpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA. Se le adicionó 5 µL de agua desionizada estéril y 2 µL de colorante para DNA. Se realizó una electroforesis de las muestras en un gel de agarosa (Bio-Rad ultra pure DNA grade) al 1% sumergido en el amortiguador TAE a un voltaje de 4.4 V cm⁻¹ durante 3 horas. El gel se tiñó en bromuro de etidio a una concentración de 5 µg mL⁻¹ durante 10 minutos. Posteriormente se tomó una fotografía con películas Kodak TRI-X pan.

Amortiguador de Almacenamiento:

Tris HCl (pH 7.5)	50 mM
KCl (Baker)	100 mM
Ditiotreitol (Sigma)	2 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	50 %

Amortiguador de incubación:

Tris HCl (pH 7.5)	35mM
KCl	24 mM
MgCl ₂	4 mM
Espermidina	1.8 mM
ATP	1 mM
Glicerol	6.5 %
Albumina de suero bovino, BSA	100 µg ml ⁻¹
Ditiotreitol	2 mM

RESULTADOS

Obtención de las curvas de crecimiento de la cepa W3110.

Para determinar la fase del crecimiento en la que se tomarían las células para los experimentos, inicialmente se realizó una cinética del crecimiento de la cepa W3110 en dos medios de cultivo líquido. La cepa se creció a 30°C con agitación rotativa constante en medio Mínimo (M9) y Luria (LB). El crecimiento bacteriano se midió indirectamente mediante lecturas de densidades ópticas (D.O.), a 550_{nm} de longitud de onda y a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados obtenidos se graficaron (D.O. con respecto al tiempo) para obtener sus curvas de crecimiento. El comportamiento mostrado, en ambos medios, fue de un crecimiento de tipo sigmoide. En este comportamiento inicialmente el crecimiento es lento; después hay una fase donde el crecimiento es exponencial y por último, se alcanza una fase estacionaria donde el crecimiento es nulo. El cultivo bacteriano se tomó en su fase exponencial, a una D.O. de 0.35 cuando se creció la cepa en medio M9 y de 0.4 cuando se cultivó en el medio LB; además del comportamiento exponencial, esta es una fase donde no hay una limitación de nutrientes y aproximadamente hay 1×10^8 células por mililitro (Fig. 1).

Cuantificación de las subunidades GyrA y GyrB por Western Blot durante un estrés calórico.

En los primeros minutos de la respuesta a estrés calórico hay una relajación del SE negativo del DNA, después una recuperación o incremento del SE, por lo que posiblemente la DNA Girasa participe en este proceso (Mizushima *et al*, 1993; Ogata *et al*, 1994; Camacho-Carranza *et al*, 1995). Aunque la DNA Girasa no se ha clasificado como una proteína de estrés calórico; durante un

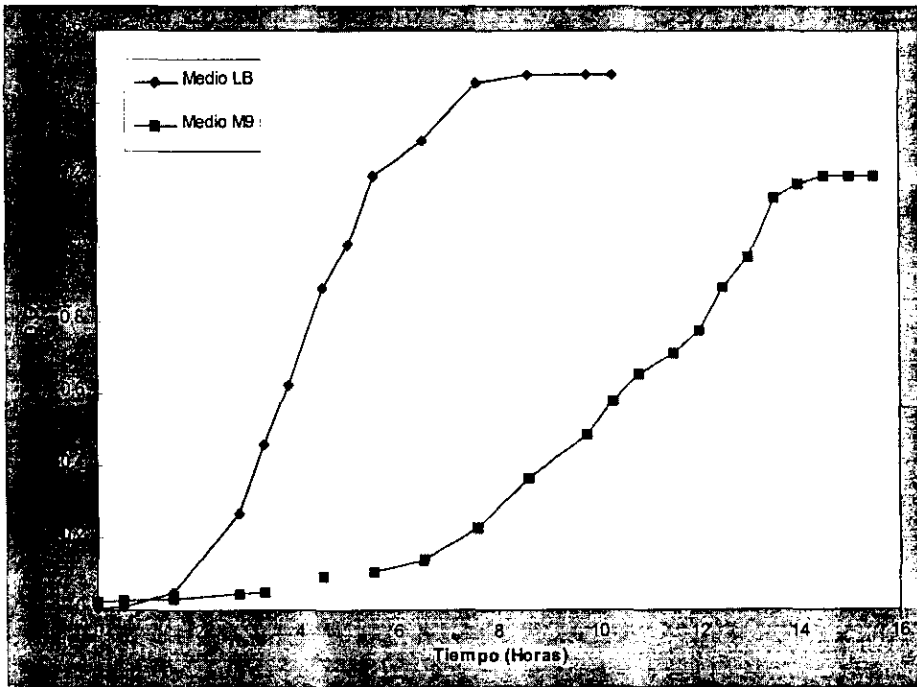


Figura 1. Crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* K12 W3110 a 30°C en dos diferentes medios de cultivo: Luria (LB) o Minimo (M9).

estrés de calor, probablemente se incremente la síntesis de las subunidades GyrA y GyrB de la DNA Girasa durante los primeros minutos de la respuesta, ya que los promotores de los genes de estas subunidades presentan una mayor actividad transcripcional en un DNA con un menor grado de superenrollamiento negativo (Menzel y Gellert, 1983). Para responder a esta pregunta se propuso el empleo de la técnica de Western Blot.

La detección de las subunidades GyrA y GyrB de la DNA Girasa de *E. coli* se realizó con el empleo de anticuerpos monoclonales producidos en ratón.

En la figura 2 se muestran los resultados de un Western Blot de la subunidad GyrA durante un estrés calórico a 47°C. Los tiempos analizados fueron 5, 10 y 15 minutos de la respuesta a estrés calórico, ya que después de ese tiempo se inicia la recuperación de la célula. Durante el estrés calórico no se observó un incremento detectable de la subunidad GyrA (Fig 2 B, C D y E).

El análisis de la síntesis de la otra subunidad de la DNA Girasa, GyrB, durante un estrés calórico a los mismos tiempos explorados que en GyrA, mostraron que no hay un incremento en la síntesis de la subunidad GyrB. Además de detectar a la subunidad GyrB, el anticuerpo reaccionó con proteínas de 120 y 40 KDa (Fig 3).

Durante la respuesta a estrés calórico no se detectó un incremento de las subunidades GyrA y GyrB de la DNA Girasa analizando las cantidades totales de estas proteínas.

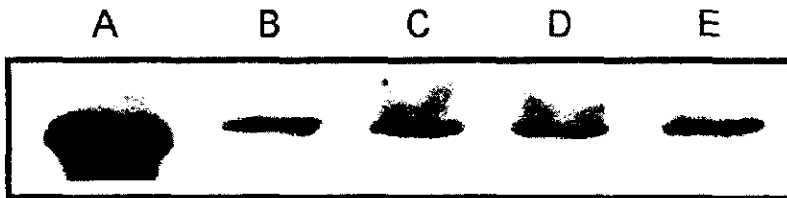


Figura 2. Detección de la subunidad GyrA por Western Blot durante un estrés por calor. Las células se cultivaron en medio LB a 30°C hasta una D.O. de 0.4; en este punto se expusieron a 47°C y se obtuvieron las proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida (7.5%) en presencia de SDS y se transfirieron a papel. La subunidad GyrA se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-GyrA. En el carril A, cepa JMTacA sobreproductora de GyrA; en los carriles B, C, D y E cepa W3110 de *E. coli*. En B, células control a 30°C; en C, D y E, células expuestas a 47°C durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente.

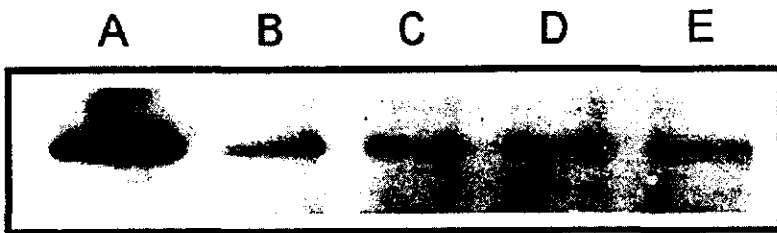


Figura 3. Detección de la subunidad GyrB por Western Blot durante un estrés por calor. Las células se cultivaron en medio LB a 30°C hasta una D.O. de 0.4; en este punto se expusieron a 47°C y se obtuvieron las proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida (7.5%) en presencia de SDS y se transfirieron a papel. La subunidad GyrB se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-GyrB. En el carril A, cepa JM103 sobreproductora de GyrB; en B, C, D y E cepa W3110 de *E. coli*. En B, células control a 30°C; en C, D y E, células expuestas a 47°C durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente.

Inmunoprecipitación de GyrA durante un estrés calórico.

Con el empleo del Western Blot se detectan las cantidades totales de las subunidades de la DNA Girasa, es decir la suma de las proteínas antes del estrés y las que se sintetizan durante éste. Si durante la respuesta hubo cambios muy pequeños, la técnica no es lo suficientemente sensible para detectarlos. Una manera más sensible, es marcar a las proteínas con un pulso de radioactividad durante la situación de estrés, inmunoprecipitar las subunidades con anticuerpos monoclonales y separar el inmunoprecipitado por electroforesis en gel.

Con este método, únicamente se pudo lograr inmunoprecipitar a una de las subunidades de la DNA Girasa, la subunidad GyrA, donde se observó que en las condiciones de inmunoprecipitación utilizadas, el anticuerpo fue específico. En el inmunoprecipitado se detectó una sola proteína de aproximadamente 97 KDa, que corresponde con la subunidad GyrA de la Girasa. La cantidad de extracto celular empleada para cada condición experimental fue de 1.5×10^6 cpm y esto equivale a 5×10^7 células; esta cantidad de extracto se utilizó para estandarizar la concentración de proteínas al momento de inmunoprecipitar a la subunidad. Además esta cantidad de extracto, en cpm, la empleo Menzel y Gellert (1983) para mostrar que la síntesis de las subunidades de la DNA Girasa son sensibles al grado de SE.

La cantidad empleada de anticuerpo anti-GyrA fue de aproximadamente 2.96 μg para cada condición experimental. Esta cantidad de anticuerpo equivale aproximadamente a 1.1885×10^{13} moléculas. La cantidad de subunidades GyrA en cada ensayo fue de aproximadamente 5×10^{10} moléculas. Para la obtención de datos confiables en una inmunoprecipitación, se debe tener entre 10 a 100 veces más cantidad de anticuerpo contra la molécula a estudiar. El número de moléculas de anticuerpo es 237 veces mayor en comparación con el de la subunidad GyrA.

En la figura 4 se muestra la inmunoprecipitación de la subunidad GyrA durante un estrés calórico a 47°C. Como control positivo se utilizó la inducción en la síntesis de la subunidad GyrA de la Girasa con el empleo de novobiocina (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$), un inhibidor en la actividad de esta enzima. La novobiocina induce la relajación del DNA y con esto un incremento en la expresión de *gyrA*, carril A. Comparando los carriles B y D, no se observó una inducción de la síntesis de GyrA, por el contrario hubo una ligera disminución durante los primeros 5 minutos de estrés; en el carril C se incubó el doble de extracto celular que en B. De los carriles E al G se dio un pulso de 10 minutos de marcaje; en los carriles E y F se puso un extracto de células a 30°C, en el carril F se puso el doble de extracto que en el carril E. En el carril G, extractos de células expuestas a 47°C durante 10 minutos. Al comparar los carriles E y G se observó una ligera inducción en la síntesis de la subunidad GyrA.

Se realizó un análisis densitométrico de esta inmunoprecipitación, con lo cual cuantitativamente se obtendría el nivel de síntesis de GyrA. Los valores se obtuvieron mediante el área de la imagen. En el carril B, al área se le dio el valor de 1; para el carril C se obtuvo un valor de 1.4 y para el carril D se obtuvo un valor de 0,8. Para el carril E se le dio un valor de 1, mientras que para el carril F se obtuvo un valor de 1.5 y para el estrés calórico, carril G, se obtuvo un valor de 1.2.

Durante los primeros 5 minutos del estrés se observa un ligero decremento en la síntesis, y a los 10 minutos un ligero aumento. El nivel de síntesis de la subunidad GyrA no disminuye como en la mayoría de las proteínas durante la respuesta a un estrés calórico de 47°C. El ligero incremento de la subunidad GyrA durante el estrés calórico no es significativo, porque este valor está dentro del error experimental (± 0.6).

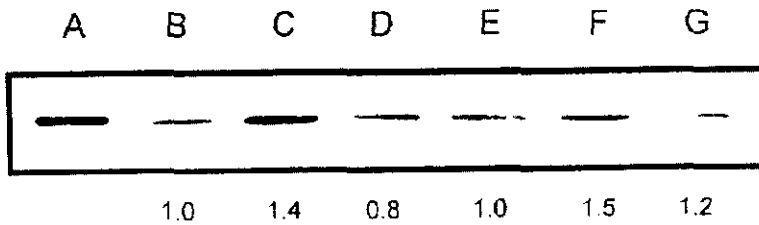


Figura 4. Síntesis de la subunidad GyrA durante un estrés calórico a 47°C. Las proteínas se marcaron con [³⁵S]-L-metionina, la subunidad GyrA se detectó mediante una inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal anti-GyrA de *E. coli*. En A, células tratadas con novobiocina 400 µg mL⁻¹ durante 10 minutos (1.5 X10⁶ cpm). En B, C y D células marcadas con un pulso de 5 minutos; en B, células a 30°C (1.5 X10⁶ cpm); en C, células a 30°C (3 X10⁶ cpm) y en D, estrés calórico a 47°C 5 minutos (1.5 X10⁶ cpm). En los carriles E, F y G células marcadas con un pulso de 10 minutos; en E, células a 30°C (1.5 X10⁶ cpm); en F, células a 30°C (3 X10⁶ cpm) y en G, estrés calórico a 47°C 10 minutos (1.5 X10⁶ cpm). Los números en la parte inferior representan la tasa de síntesis.

Durante la respuesta a estrés calórico a 47°C no se observó un aumento en la cantidad intracelular de las proteínas GyrA y GyrB. El nivel de síntesis de la subunidad GyrA es similar antes y durante la respuesta a estrés por calor.

Quantificación del ATP y ADP durante el estrés calórico.

La actividad de la DNA Girasa *in vitro* depende de la relación [ATP]/[ADP], además, *in vivo* durante el estrés osmótico y el anaerobico se incrementa el grado de SE y también la relación [ATP]/[ADP] (Westerhoff *et al*, 1988; Hsieh *et al*, 1991; Hsieh *et al*, 1991). Durante un estrés calórico a 47°C no hay un incremento de las subunidades de la DNA Girasa, pero sí un aumento en el grado de SE; por lo que posiblemente la DNA Girasa tiene una mayor actividad debido al incremento en la relación [ATP]/[ADP]. Para abordar esta hipótesis se decidió emplear la técnica de cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) para la cuantificación de estos nucleótidos.

La columna empleada fue de intercambio iónico, por lo que los nucleótidos con una menor carga negativa tendrán un menor tiempo de retención, mientras que los nucleótidos que contengan una mayor carga negativa tendrán un mayor tiempo de retención.

Al realizar la cuantificación de las pozas de ATP y ADP en la bacteria *E. coli*, durante la respuesta celular a estrés por temperatura a 47°C, el medio de cultivo empleado para el crecimiento bacteriano fue el medio Luria. Con el empleo del medio Luria no fue posible distinguir los picos de retención correspondientes al ATP y al ADP, ya que varios compuestos de este medio presentaron un tiempo de retención similar a éstos nucleótidos. El empleo del medio LB se descartó para la cuantificación del ATP y ADP durante la respuesta a estrés calórico a 47°C.

Para solucionar este problema, se probó un medio de cultivo que únicamente contiene sales y glucosa: el medio M9. El análisis por HPLC del medio M9 sin células mostró un perfil sin picos en la región de retención del ATP y ADP. Posteriormente se probaron extractos de células cultivadas en M9 previamente centrifugadas y resuspendidas en M9 fresco, medio de dilución o agua desionizada. Con este lavado celular se pretendía disminuir el posible ruido de metabolitos excretados por las células al medio de cultivo.

Para verificar si estos tratamientos modificaban la actividad de las topoisomerasas y con ello el grado de SE, se realizó una separación por electroforesis del plásmido pMS01 extraído de células crecidas en M9 a 30°C y en estrés calórico a 47°C durante 15 minutos. Se eligió dar el estrés a esta temperatura y a este tiempo porque se reportó en estas condiciones el máximo grado de SE del plásmido (Camacho-Carranza *et al*, 1995).

En la figura 5, se muestra una distribución de las diferentes formas isoméricas (topoisómeros) del plásmido pMS01 en presencia de cloroquina (10 µg mL⁻¹). A esta concentración de cloroquina, los plásmidos con mayor grado de SE negativo migran más rápidamente. En las células lavadas con medio M9 y expuestas a 47°C (carril B) se observó un incremento en el grado de SE del plásmido en comparación de células a 30°C (carril A). Las células lavadas con medio de dilución muestran un patrón muy similar al observado con células lavadas con medio M9, hay un incremento en el SE de los plásmidos durante el estrés calórico a 47°C (carril D) en comparación de las células a 30°C (carril C). Los topoisómeros de células lavadas con agua desionizada estéril muestran un patrón de SE totalmente diferente a lo observado con el medio M9 y medio de dilución; tanto a 30°C (carril E) como durante el estrés calórico a 47°C (carril F) se observó una relajación de los plásmidos.

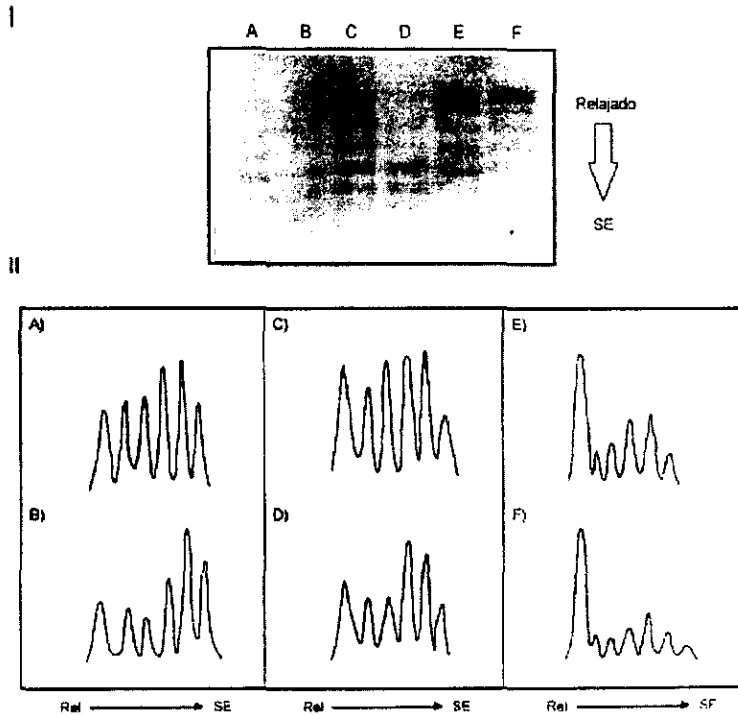


Figura 5. I) Distribución de las diferentes formas isoméricas (topoisómeros) del plásmido pMS01 de células a 30° y en estrés calórico a 47°C. El plásmido se extrajo y se separó por electroforesis en un gel de agarosa (1%) con cloroquina 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La cepa W3110 se cultivó en M9 a 30°C y al llegar a un D.O. de 0.35, se centrifugó y se lavó con M9 fresco (A y B), medio de dilución (C y D) o agua desionizada (E y F). Los carriles A, C y E muestran topoisómeros de células a 30°C; los carriles B, D y F son topoisómeros de células expuestas a 47°C durante 15 minutos. II) Análisis densitométrico de las diferentes formas isoméricas del plásmido pMS01 de I. Rel: DNA relajado; SE: DNA superenrollado.

En base a estas observaciones se descartó el lavado celular con agua para medir las pozas de ATP y ADP. Las alternativas para medir estas pozas eran el medio de dilución y M9, aunque con este procedimiento las células se tenían que centrifugar por aproximadamente 16 minutos y después se resuspendían. Esto causa un estrés mecánico a las células y con ello posiblemente cambios en las concentraciones celulares de ATP y ADP. Entonces se decidió emplear el mismo medio de cultivo en el cual crecieron las células para la obtención del extracto.

En *E. coli* la poza intracelular de ATP y ADP es pequeña, lo que hace difícil su cuantificación, aún por HPLC. Para obtener una cuantificación confiable, el cultivo celular se concentró dos veces antes de preparar los extractos para su análisis. Para ello, el cultivo se centrifugó a baja velocidad (6000 rpm) y por un tiempo corto (2.5 min.), se descartó la mitad superior del volumen y las células se resuspendieron en la otra mitad. Además de concentrar el cultivo, este procedimiento minimiza el estrés mecánico. Finalmente, para el análisis por HPLC se inyectó al aparato un volumen máximo de extracto, 100 μ L (el equivalente a 1.7 X 10⁷ células).

En la figura 6 se muestra el cromatograma de un extracto de células crecidas a 30°C. El tiempo de retención del ADP fue de 11.36 minutos y su concentración de 64.17 pmolas. El ATP tuvo un tiempo de retención de 24.25 minutos y su concentración fue de 109.09 pmolas.

En la figura 7 se muestra un cromatograma de un extracto de células expuestas a 47°C durante 5 minutos. En este cromatograma se cuantificó 162.112 pmolas de ADP y 486.34 pmolas de ATP. Estas cantidades representaron un incremento de 4.46 veces más de ATP y 2.53 veces de ADP con respecto a las células crecidas a 30°C.

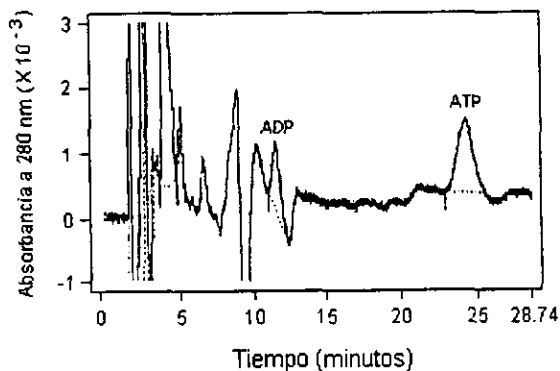


Figura 6. Detección del ADP y ATP por HPLC de un extracto celular a 30°C. La cepa W3110 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.35 se obtuvo el extracto. El extracto se inyectó a un aparato de cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) con una columna de intercambio iónico. Los nucleótidos se detectaron a 254 nm de longitud de onda.

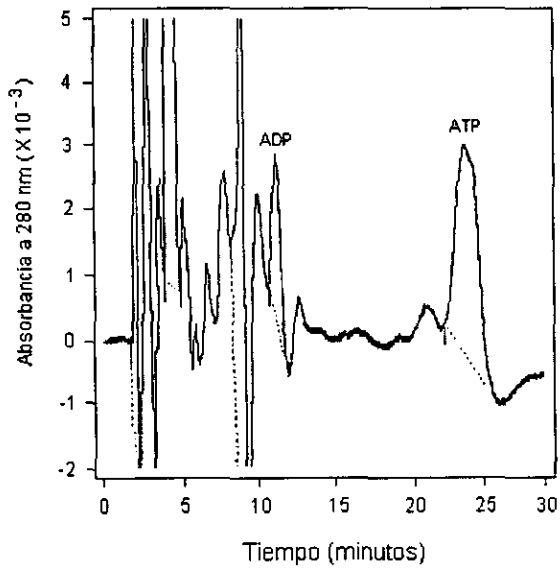


Figura 7. Detección del ADP y ATP por HPLC de un extracto celular durante un estrés calórico a 47°C durante 5 minutos. La cepa W3110 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.35 se expuso a 47°C. El extracto se inyectó a un aparato de cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) con una columna de intercambio iónico. Los nucleótidos se detectaron a 254 nm de longitud de onda.

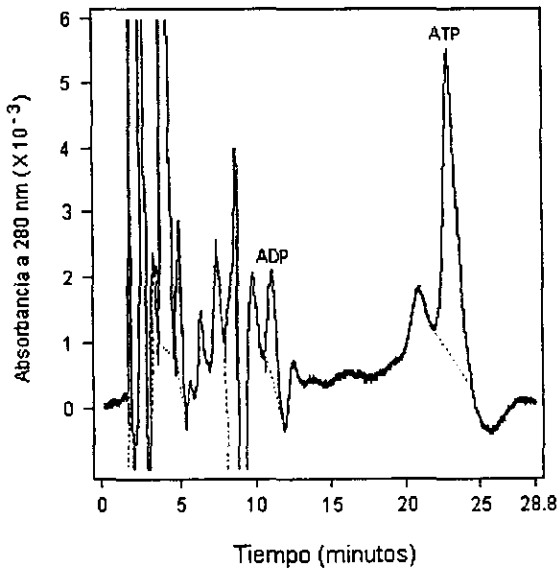


Figura 8. Detección del ADP y ATP por HPLC de un extracto celular durante un estrés calórico a 47°C durante 10 minutos. La cepa W3110 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0.35 se expuso a 47°C. El extracto se inyectó a un aparato de cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) con una columna de intercambio iónico. Los nucleótidos se detectaron a 254 nm de longitud de onda.

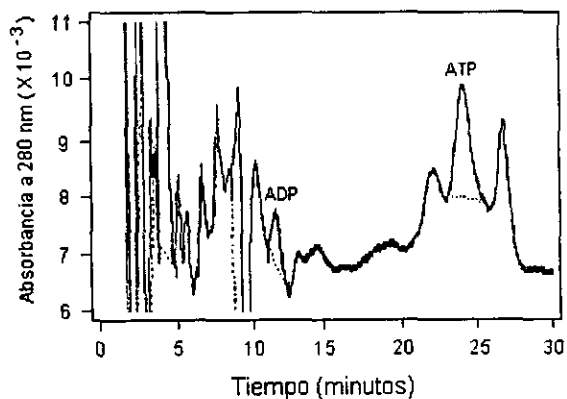


Figura 9. Detección del ADP y ATP por HPLC de un extracto celular durante un estrés calórico a 47°C durante 30 minutos. La cepa W3110 se cultivó a 30°C y al llegar a una D.O. de 0,35 se expuso a 47°C. El extracto se inyectó a un aparato de cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC) con una columna de intercambio iónico. Los nucleótidos se detectaron a 254 nm de longitud de onda.

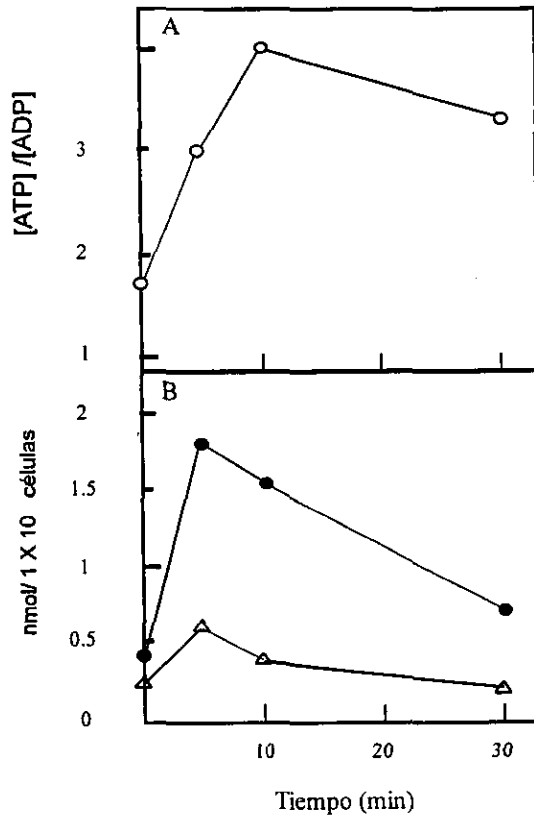


Figura 10. A) Cinética del cambio de la relación [ATP]/[ADP] durante un estrés calórico a 47°C. B) Cinética del cambio de las pozas intracelulares de ATP y ADP durante un estrés calórico a 47°C. ● ATP; △ ADP.

En la figura 8 se muestra otro cromatograma de células expuestas a 47°C durante 10 minutos. La cantidad de ADP fue de 101.51 pmolas y de ATP fue 404.01 pmolas, esto representó un incremento de 3.7 veces más de ATP y 1.58 veces de ADP en comparación de células a 30°C.

Después de un estrés calórico a 47°C de 30 minutos las cantidades de ATP y ADP fueron: 186.15 y 56.58 pmolas respectivamente. Estas concentraciones representan una disminución de 0.88 veces de ADP y un aumento de 1.7 veces de ATP a comparación de células a 30°C (Fig. 9).

En la figura 10 (A) se muestra la cinética del comportamiento de la relación $[ATP]/[ADP]$ intracelular durante un estrés calórico. Durante los primeros minutos se observó un aumento en la relación, alcanzando su máximo a los 10 minutos y después de este tiempo hay una disminución de la relación sin regresar a su estado basal. En la parte 10(B) se observa el cambio de la concentración intracelular del ATP y ADP. Los dos nucleótidos tienden a aumentar su concentración, pero este aumento es mayor en el caso del ATP lo que favorece que la relación $[ATP]/[ADP]$ se incremente.

Durante los primeros 5 minutos de la respuesta a estrés calórico aumentaron las concentraciones intracelulares de ATP y ADP, pero la más evidente fue la de ATP, por lo que contribuyó a un gran aumento en la relación $[ATP]/[ADP]$; que posteriormente disminuye pero sin regresar a su estado basal

Protección del ATP a la Girasa a altas temperaturas *in vitro*.

Como se muestra en la Figura 10, durante un estrés calórico de 47°C, se presenta un aumento en la concentración celular de ATP y en la relación $[ATP]/[ADP]$. Como ya se mencionó, aunque a 46°C la DNA Girasa *in vitro* es

poco activa, el nivel de SE de un plásmido reportero aumenta durante un estrés de 47°C. Una hipótesis probable es si este aumento en los cofactores de la DNA Girasa puede protegerla contra el efecto de inactivación por una temperatura elevada.

Existen varios ejemplos de enzimas que en presencia de sus cofactores presentan una mayor resistencia a agentes desnaturizantes. La Girasa tiene como cofactores tanto al ATP como al ADP. El ATP es el cofactor necesario para la introducción de supervueltas negativas en el DNA, mientras que el ADP es el cofactor que *inhibe esta actividad, sin embargo no se sabe que estos cofactores estén asociados a la termoresistencia de la DNA Girasa.*

La enzima Girasa se incubó a 46°C en presencia y ausencia de ATP. Para cada condición experimental se utilizaron 6.4 ng de enzima; esta cantidad equivale a 1.032×10^{10} moléculas de Girasa. La cantidad de ATP para observar la completa actividad de la Girasa a 37°C es de 6 nmol (en el amortiguador de reacción), esto equivale a 3.62×10^{15} moléculas de ATP. Para la reacción a 46°C, se emplearon 1.34×10^{16} moléculas de ATP lo que representa 3.7 veces más cantidad de ATP que en el amortiguador de reacción. La cantidad de ATP se calculó de los datos de la figura 10; para ello se tomó el incremento de ATP a los 10 minutos, cuando la relación [ATP]/[ADP] fue la máxima durante la respuesta a estrés calórico.

En la figura 11, se muestra un ensayo *in vitro* (técnica montada por la Biol. Ma. Teresa Lara Ortiz) con la Girasa a 46°C en presencia de ATP. La actividad de la Girasa se midió mediante su capacidad de superenrollar al plásmido pOHT1 relajado. En el carril A se muestra el plásmido pHOT1 relajado. En el carril B, actividad de la Girasa a 37°C, donde se observó un 100 % de actividad. Cuando la Girasa se incubó a 46°C en ausencia de ATP se observó la pérdida de

aproximadamente 90-95% de actividad (carril D) y en presencia de ATP se retuvo aproximadamente el 20% de actividad (carril C).

La enzima DNA Girasa retuvo aproximadamente el 20% de su actividad en presencia de ATP a 46°C en relación a su actividad en ausencia de este cofactor, lo que sugiere que la Girasa es ligeramente más termoestable en presencia de ATP.

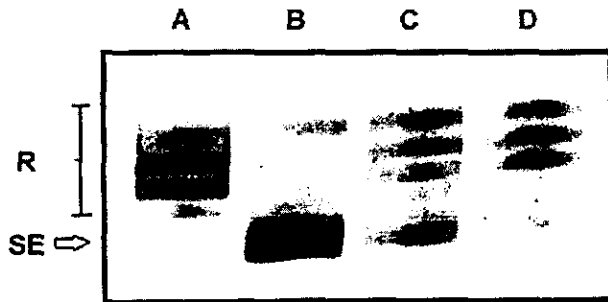


Figura 11. Actividad *in vitro* de la DNA Girasa en presencia o ausencia de ATP a 46°C. La enzima se incubó a 30°C en presencia de ATP después de la incubación a 46°C. El plásmido pHOT1 se corrió en un gel de agarosa al 1%. En A, plásmido pHOT1 relajado; B, DNA Girasa incubada a 37°C; C, DNA Girasa incubada a 46°C en presencia de ATP y D, DNA Girasa incubada a 46°C en ausencia de ATP. R, plásmido pHOT1 relajado; SE, plásmido pHOT1 superenrollado.

DISCUSION

La respuesta celular a estrés calórico es una respuesta muy conservada a lo largo de la escala evolutiva, ya que se presenta desde organismos procariontes hasta eucariontes. Durante esta respuesta se inducen cambios en el patrón de síntesis de proteínas, en la membrana celular y en la topología del DNA. Este cambio en la topología del DNA no solamente se observa durante un estrés calórico, sino que también en otras situaciones como son: estrés osmótico y oxidativo y en la fase estacionaria del crecimiento.

El efecto de la temperatura sobre la estructura del DNA es sobre el giro entre las bases del DNA, éste ángulo disminuye conforme aumenta la temperatura (-0.0012 grados/°C). Este cambio induce un aumento en el número de bases por vuelta del DNA por lo que L_0 disminuye. Intracelularmente, la mayoría de las moléculas de DNA tienen un SE negativo, donde $L < L_0$, y al disminuir el valor de L_0 las moléculas de DNA superenrolladas negativamente se relajan (Depew y Wang, 1975; Pulleyblank *et al*, 1975).

En estudios *in vivo* durante un estrés calórico (17 a 37°C) se observó un incremento en el grado de SE del DNA. Como ya se mencionó, las moléculas SE negativamente de DNA se relajan al aumentar la temperatura y la respuesta celular al calor induce un incremento en el SE del DNA. Esto causa que las células a temperaturas elevadas presenten un SE similar al de las células a 30°C. Este incremento en el SE se interpretó como que la Girasa se "vio temporalmente favorecida" en su actividad al relajarse el DNA (Goldtein y Drlica, 1984).

El relajamiento inicial del DNA SE negativamente, podría inducir un incremento en la cantidad de las subunidades de la DNA Girasa (GyrA y GyrB), ya que los genes *gyrA* y *gyrB* tienen promotores que se activan cuando el DNA esta

relajado. Sin embargo, el análisis con Western Blot que se presenta en este trabajo, muestra que las cantidades de las subunidades GyrA y GyrB no aumentan durante la respuesta a estrés calórico (Fig. 2 y 3). Con este método se detecta la cantidad total de cada subunidad, de manera que un incremento pequeño en el nivel de síntesis durante la respuesta a estrés calórico no se puede detectar.

Con una técnica más sensible (inmunoprecipitación) tampoco se observó un incremento claro (de 2 o más veces) en la síntesis de la subunidad GyrA (Fig. 4); el nivel de síntesis de esta proteína se mantuvo constante durante el estrés. El estudio de la subunidad GyrB se intentó también mediante una inmunoprecipitación, pero los resultados preliminares no fueron confiables, ya que junto con la subunidad GyrB se precipitaba otras proteínas, lo que hizo difícil el análisis de los resultados.

La síntesis de la gran mayoría de las proteínas se detiene durante un estrés calórico intenso y solamente algunas incrementan su síntesis (proteínas de estrés calórico). El patrón mostrado por la subunidad GyrA refleja que su síntesis no aumenta, pero tampoco disminuye como en la mayoría de las proteínas. Posiblemente el relajamiento inicial del DNA no produce un aumento en la cantidad total de las subunidades de la DNA Girasa, sino que su efecto es el mantener una cantidad constante de estas subunidades. Esto puede deberse al aumento en la actividad de los promotores para σ^{70} , ya que estos genes no tienen promotores para σ^{32} ; como es el caso de la topoisomerasa I que tiene dos promotores: uno para σ^{32} y otro para σ^{70} . La presencia del promotor para σ^{32} mantiene constante su concentración durante el estrés calórico. Sería interesante analizar el nivel de transcripción de los genes *gyr* y observar si se correlaciona con la síntesis de la Girasa, ya que durante la respuesta a estrés calórico puede cambiar la eficiencia de traducción del RNA mensajero.

Estos resultados sugieren que GyrA y GyrB no aumentan durante el estrés calórico. Sin embargo, en el caso de células eucariotas, la topoisomerasa II sí se induce durante este estrés (Matsuo *et al*, 1993).

La relajación de moléculas de DNA superenrolladas durante los primeros minutos del estrés, posiblemente se debe a una inactivación de la DNA Girasa o a una mayor actividad de la Top I o Top III, aunque la Top III *in vitro* presenta una gran actividad de relajar DNA superenrollado a 52°C, no se conoce el posible papel que tenga durante la respuesta a estrés calórico. Posteriormente se recupera o es mayor el grado de SE, lo que sugiere una actividad de la DNA Girasa, ya que esta enzima es la única en superenrollar negativamente al DNA. Sin embargo, y al menos *in vitro*, la DNA Girasa es termosensible.

En la recuperación en la actividad de la DNA Girasa probablemente están implicados tres procesos: 1) la protección y/o reactivación por proteínas de estrés calórico tipo chaperonas y 2) la acción directa del incremento en la relación [ATP]/[ADP] sobre la actividad de la enzima y 3) la protección por cofactores (ATP y ADP)

In vitro, se observó claramente que un incremento en la relación [ATP]/[ADP], aumenta la capacidad de SE al DNA por parte de la DNA Girasa y si esta relación disminuye, la capacidad de SE también disminuye.

En este trabajo mediante análisis de las pozas intracelulares de ATP y ADP mediante HPLC, durante el estrés calórico se observó un incremento máximo a los 10 minutos de 2.3 veces en la relación [ATP]/[ADP] que posteriormente disminuye, pero sin regresar a su nivel basal (Figs. 6, 7, 8, 9 y 10). Este incremento en la relación [ATP]/[ADP] correlaciona con un incremento en el grado de SE durante este estrés a esta temperatura (Camacho-Carranza *et al*, 1995)

Existen reportes en la literatura de cuantificación de diferentes nucleótidos, entre ellos ATP y ADP, durante un estrés por calor. Por ejemplo, en *Salmonella typhimurium* durante un estrés calórico de 30° a 50°C si se calcula la relación $[ATP]/[ADP]$ de los datos presentados se observa un incremento de aproximadamente 4 veces, sin embargo, no se analizaron los cambios en el grado de SE del DNA. Por otra parte, en una mutante de *E. coli* (RC^{ref}) en un estrés por temperatura de 30° a 42°C se observó un incremento del ATP de aproximadamente 4 veces, pero no se calculó la concentración de ADP ni se hizo un estudio del cambio en el grado de SE (Edlin y Stent, 1969; Lee *et al*, 1983).

Los datos preliminares obtenidos por la Biól. Judith Hernández, muestran que durante un estrés por etanol al 7% el grado de SE del DNA fue menor y se encontró que la relación $[ATP]/[ADP]$ disminuyó de 1.8 a 0.5. Además, en *S. typhimurium* en un estrés de etanol al 10%, si se calcula la relación $[ATP]/[ADP]$ esta disminuye, pero no hay una correlación con el cambio en el grado de SE del DNA (Tesis de Maestría; Lee *et al*, 1983).

Los datos presentados en este trabajo y los datos obtenidos por la Biól. Judith Hernández apoyan la hipótesis de Drica de que existe una correlación entre el grado de SE y la relación $[ATP]/[ADP]$ (Hsieh *et al*, 1991; Hsieh *et al*, 1991). Sin embargo, existe un reporte donde no se encontró esta correlación. En este caso los autores proponen que la disminución en el SE obedece a cambios en la actividad de la DNA Girasa durante el estrés y no a cambios en la relación $[ATP]/[ADP]$ (Cortassa y Aon, 1993).

Durante el estrés se incrementó considerablemente la concentración de ATP y muy ligeramente la de ADP (fig. 10B). El incremento en el ATP, posiblemente se debe a una aportación de NADH⁺ y FADH⁺ del ciclo de Krebs, ya que varias enzimas (como por ejemplo: isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y citrato sintasa) de este ciclo, son termoestables y en la mayoría

retienen un 75% de actividad a una temperatura de 50°C (Faloona y Srere, 1969; Murphey *et al*, 1967; Bennett y Holms, 1974). Aunque se tendrían que realizar la cuantificación de las cantidades de NADH⁺ y FADH⁺ durante la respuesta a estrés calórico para contestar si el incremento observado en el ATP se debe a la actividad de estas enzimas y no a una acumulación del ATP por la inactivación de ATPasas.

Este incremento en la cantidad intracelular de ATP y en la relación [ATP]/[ADP] durante el estrés calórico, probablemente es necesario para la sobrevivencia de la célula, ya que puede favorecer la actividad de la Girasa, de las chaperonas DnaK, DnaJ, GrpE y GroE, así como de las proteasas Lon y FtsH; ya que las chaperonas requieren el ATP para el correcto plegamiento de la proteínas desnaturalizadas por el efecto de la temperatura y las proteasas para poder degradar proteínas durante este estrés.

Diferentes cofactores, como el ATP, ADP, Mg⁺⁺, etc, al unirse a la proteína que lo requiere induce cambios conformacionales y en presencia de un agente desnaturalizante la hacen más termoestable. El estudio *in vitro* de la actividad de la DNA Girasa a temperaturas elevadas se realizó en ausencia de su cofactor (Peebles *et al*, 1979), pero en el presente trabajo se reporta que la DNA Girasa retiene el 20% de su actividad a 46°C en presencia de ATP (Fig. 11). Los cambios conformacionales inducidos por la unión del ATP a la subunidad GyrB posiblemente le confieran una mayor termoresistencia a la DNA Girasa (Orphanides y Maxwell, 1994). La recuperación del SE durante la respuesta celular a estrés calórico no puede explicarse completamente con nuestros resultados, por lo que para discernir el papel de la DNA Girasa sería importante realizar experimentos *in vitro* con chaperonas y DNA Girasa a 46°C; además, de experimentos *in vivo* con mutantes en estas chaperonas y mutantes en *rpoH* que no induce el grupo de proteínas durante la respuesta a estrés calórico, para

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

poder catalogar el papel de estas proteínas en la actividad de la DNA Girasa durante el estrés calórico.

CONCLUSIONES

Durante la respuesta a estrés calórico no se detectó un incremento en la síntesis de la subunidad GyrA ni en la cantidad de GyrA y GyrB de la DNA Girasa.

Durante la respuesta a estrés calórico se presenta a los 10 minutos un incremento máximo 2.2 veces en la relación $[ATP]/[ADP]$. Por otro lado, a los 15 minutos de estrés a esta misma temperatura el incremento en el SE es el máximo.

In vitro una concentración elevada de ATP protege parcialmente a la Girasa de ser inactivada por calor (46°C).

PERSPECTIVAS

Realizar un análisis de la síntesis de la subunidad GyrB durante un estrés calórico mediante una inmunoprecipitación.

Cuantificar el nivel de transcripción de los genes *gyrA* y *gyrB* durante un estrés calórico

Cuantificar la cantidad de NADH^+ y $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ durante la respuesta a estrés calórico.

Para discernir el papel del incremento en la relación $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ a 46°C , se puede utilizar un desacoplante de la cadena respiratoria durante la respuesta a estrés calórico y observar si presenta actividad la DNA Girasa.

Cuantificar *in vitro* la retención de la actividad de la DNA Girasa en presencia de ADP y variaciones en la relación $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ a 46°C .

Utilizar una cepa de *E. coli* GyrBts y observar como pueda afectarse en la actividad de la DNA Girasa durante la respuesta a estrés calórico

Realizar ensayos *in vitro* sobre la posible acción de protección y reactivación de las chaperonas sobre la actividad de la DNA Girasa a 46°C .

Realizar experimentos *in vivo* con mutantes en los genes de las chaperonas y con mutantes en *rhoH*.

REFERENCIAS

- Adams D.E., E.M. Shekhtman, E.L. Zechiedrich, M.B. Schmid y N.R. Cozzarelli (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*. **71**, 277-288.
- Bauer W.R., F.H.C. Crick y J.H. White (1980) Supercoiled DNA. *Sci. Am.* **243**, 118-133.
- Bennett P.M. y W.H. Holms (1975) Reversible inactivation of the Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML308 during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 37-51.
- Bonner, W. M. y R. A. Laskey (1974) A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**, 83-88.
- Brady G.W., M. Satkowski, D. Foos y C.J. Benham (1987) Environmental influences on DNA superhelicity. The effect of ionic strength on superhelix conformation in solution. *J. Mol. Biol.* **195**, 185-191.
- Bukau B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.* **9**, 671-680.
- Camacho-Carranza R., J. Membrillo-Hernandez, J. Ramírez-Santos, J. Castro-Dorantes, V. Chagoya de Sánchez y M. C. Gómez-Eichelmann (1995) Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **177**, 3619-3622.
- Cortassa S. y M.A. Aon (1993) Altered topoisomerase activities may be involved in the regulation of DNA supercoiling in aerobic transitions in *Escherichia coli*. *Molecular and cellular biochemistry.* **126**, 115-124.
- Cozzarelli N.R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science.* **207**, 953-960.
- Dean F. et al (1983) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* **47**, 769-777.
- Depew R. E. y J. C. Wang (1975) Conformational fluctuations of DNA helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 4275-4279.
- DiNardo S., K.A. Voelkel, R. Sternglanz, A.E. Reynolds y A. Wright (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA Gyrase genes. *Cell.* **31**, 43-51.
- Dorman C. J., G. C. Barr, N. Ni Bhriain y C. F. Higgins (1988) DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bact.* **170**, 2816-2826.
- Drlca K. (1984). Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol. Rev.* **48**, 273-289.
- Drlca K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**, 425-433.
- Edlin G Y G.S. Stent (1969) Nucleoside triphosphate pools and the regulation of RNA synthesis in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 475-482.
- Ellis R.J. y S.M. van der Vies (1991) Molecular chaperones. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.

- Faloona G.R. y P.A. Srere (1969) *Escherichia coli* citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry*. **8**: 4497-4503
- Gellert M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea y H. A. Nash (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **73**, 3872-3875.
- Gellert M. (1981) DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 879-910.
- Goldstein E., y K. Drlaca (1984) Regulation of bacterial DNA supercoiling: Plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**, 4046-4050.
- Günter E., M. Mikolajczyk y H. Schuster (1981) Stabilization by ATP and ADP of *Escherichia coli* DnaB protein activity. *J. Biol. Chem.* **256**, 11970-11973.
- Hallett P., A.J. Grimshaw, D. B. Wigley y A. Maxwell (1990) Cloning of the DNA gyrase genes under *tac* promoter control: overproduction of the gyrase A and B proteins. *Gene*. **93**, 139-142.
- Hendrick J. P. y F.-U. Hartl (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
- Herman C., Thévenet, R. D'Ari y P. Boulloc (1995) Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 5515-5520.
- Higgins C.F., F.L. Ames, W.M. Barnes, J.M. Clement y M. Hofnung (1982). A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature*. **298**, 760-762.
- Higgins C.F.; C.J. Dorman; D.A. Stirling; L. Waddel; I.R. Booth; M.G. May y E. Bremer (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**, 569-584.
- Hiratsu K., M. Amemura, H. Nashimoto, H. Shinagawa y K. Makino (1995) The *rpoE* gene of *Escherichia coli*, which encodes σ^E , is essential for bacterial growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **177**, 2918-2922.
- Hsieh L.-S., R.M. Burger y K. Drlaca (1991A) Bacterial DNA supercoiling and [ATP] / [ADP]. Changes associated with transitions to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* **219**, 443-450.
- Hsieh L.-S., J. Rouviere-Yaniv y K. Drlaca (1991B) Bacterial DNA supercoiling and [ATP] / [ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J. Bacteriol.* **173**, 3914-3817.
- Iglesias A.A., C.D. Spampinato y C.S. Andreo (1991) NADP⁺-malic enzyme from sugarcane leaves: structural properties studied by thermal inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**: 272-276.
- Jones P.G., R. Krah, S.R. Tafuri y A.P. Wolffe (1992) DNA Gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5798-5802.
- Kato J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga y H. Suzuki (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Cell*. **63**, 393-404.
- Katsui N., T. Tsuchido, R. Hiramatsu, S. Fujikawa, M. Takano y I. Shibasaki (1982) Heat induced blebbing and vasculature of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **151**, 1523-1531.

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

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

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

Lipinska B., O. Fayet, L. Baird y C. Georgopoulos (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli* *htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**, 1574-1584.

Lipinska B., M. Zylitz y C. Georgopoulos (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for the *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* **172**, 1791-1797.

Matsuo K., K. Kohno; S. Sato, T. Uchiumi, H. Tanimura, Y. Yamada y M. Kuwano (1993) Enhanced expression of the DNA topoisomerase II gene in response to heat shock stress in human epidermoid cancer KB cell. *Cancer Res.* **53**, 1085-1090.

McEachern F. y L.M. Fisher (1989) Regulation of DNA supercoiling in *Escherichia coli*: genetic basis of a compensatory mutation in DNA Gyrase. *FEBS Lett.* **253**, 67-70.

Mejía R, M.C. Gómez-Eichelmann y M.S. Fernández (1995) Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat shock. *Biochim. Biophys. Acta.* **1239**, 195-200.

Menzel R. Y M. Gellert (1983) Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell.* **34**, 105-113.

Mizushima T., S. Natori y K. Sekimizu (1993) Relaxation of supercoiled DNA associated with induction of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 1-5.

Morimoto R. I., A. Tissières y C. Georgopoulos (1990) The stress response, function of the proteins, and perspectives. En: Morimoto, T., A. Tissières y C. Georgopoulos (eds) *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor, NY. pp 1-36.

Murphey W.H., C. Barnaby, F.J. Lin y N.O. Kaplan (1967) Malate dehydrogenase. II. Purification and properties of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli* malate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **242**: 1548-1559.

Neidhardt F. C. y R. A. VanBogelen (1987) Heat shock response. En: Neidhart, F.C., J.L. Ingram, K.B. Low, B. Magasanik, M. Shaechter y H. E. Umbarger (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for microbiology. pp 1334-1345.

Neidhardt F.C. (1987) Multigene systems and regulons. En: Neidhart, F.C., J.L. Ingram, K.B. Low, B. Magasanik, M. Shaechter y H. E. Umbarger (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society for microbiology. pp 1313-1317.

Ni Bhrian N.; C. J. Dorman y C. F. Higgins (1989) An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **3**, 933-942.

Ogata Y., T. Mizushima, K. Kataoka, T. Miki y K. Sekimizu (1994) Identification of the DNA topoisomerase involved in immediate and transient DNA relaxation induced by heat shock in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 451-455.

Orphanides G y A. Maxwell (1994) Evidence for a conformational change in the DNA Gyrase-DNA complex from hydroxyl radical footprinting. *Nucleic Acid Res.* **22**: 1567-1575.

Pauling C. y L.A. Beck (1975) Role of DNA ligase in the repair of single strand breaks induced in DNA by mild heating of *Escherichia coli*. *J. General Microbiol.* **87**, 181-184.

Pellon J.R., K. Ulmer y R.F. Gomez (1980) Heat damage to the folded chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Applied Environmental Microbiol.* **40**, 358-364.

Peebles C. L., N.P. Higgins, K.N. Kreuzer, A. Morrison, P.O. Brown, A. Sugino y N.R. Cozzarelli (1979) Structure and activities of *Escherichia coli* DNA gyrase. En: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. 48 (DNA replication and recombination) (Parte 1) pp 41-52.

Pruss G.J., S.H. Manes y K. Drlica (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near Gyrase genes. *Cell.* **31**, 35-42.

Pulleyblank D. E., M. Shure, D. Tang, J. Vinograd y H.-P. Vosberg (1975) Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and nonsupercoiled closed circular DNA: Formation of a Boltzman distribution of topological isomers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **72**, 4280-4284.

Raina S., D. Missiakas y C. Georgopoulos (1995) The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**, 1043-1055.

Reece R. J. y A. Maxwell (1991) DNA gyrase: Structure and function. *Critical Reviews in biochemistry and molecular biology.* **26**, 335-375.

Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Strauch K.L., K. Johnson y J. Beckwith (1989) Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J. Bacteriol.* **171**, 2689-2696.

Tomoyasu T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, S. Hiraga y T. Ogura (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane bound, ATP dependent protease which degrades the heat shock transcription factor σ^{32} . *Embo J.* **14**, 2551-2560.

Tse-Dinh Y.-C. y R.K. Beran (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.

Tsuchido T., N. Katsui, A. Takeuchi, M. Takano y I. Shibasaki (1985) Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Applied and Environmental Microbiology.* **50**, 298-303.

Tsuchido T., R.A. VanBogelen y F.C. Neidhardt (1986) Heat shock response in *Escherichia coli* influences cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 6959-6963.

Vinograd J., J. Lebowitz, R. Radloff, R. Waton y P. Laipis (1965) The twisted circular form of poliovirus viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **53**, 1104-1111.

Wang J.C. (1971) Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein. *J. Mol. Biol.* **71**, 127-147.

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

Wang Y.-W. y M. Syvanen (1992) DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.* **6**, 1861-1866.

Weil R. y J. Vinograd (1963) The cyclic helix and cyclic coil forms of polyoma viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **50**, 730-738.

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

Yang Y. y G. F.-L. Ames (1988) DNA Gyrase binds to the family of prokariotic repetitive extragenic palindromic sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 8850-8854.

Yang Y. y G. F.-L. Ames (1992) The family of repetitive extragenic palindromic sequences: interaction with DNA Gyrase and histone like protein HU. En: Drlica K. y Riley M. (Eds) *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology. Washington DC. pp 211-225.

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