



21  
00346

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS DEL GEN REGULADOR  
DE LA RESPUESTA A ESTRÉS POR CALOR, *rpoH*,  
EN CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE  
DIFERENTES HOSPEDEROS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (Biología Celular)

PRESENTA

María Gloria Solís Guzmán

298456

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA DEL CARMEN GOMEZ EICHELMANN

COORDIRECTORA DE TESIS

DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MA. DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR



## **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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. M. Carmen Gómez Eichelmann.

*A mi princesa, Gloria Noemí*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. M. Carmen Gómez Eichelmann por su gran apoyo en la elaboración de este trabajo, por sus enseñanzas y por su total disposición para conmigo, mil gracias.

A la Dra. Valeria Souza por sus aportaciones a este trabajo y quien nos proporcionó las cepas silvestres.

Al Dr. Jesús Ramírez por su asesoría para la elaboración de ésta tesis.

A los miembros del jurado, Dra. M. Carmen Gómez, Dra. Valeria Souza, Dr. Jesús Ramírez, Dra. Alicia González, Dra. Laura Camarena, Dr. Luis Felipe Jiménez y Dr. Luis Eguiarte, por la revisión y aportaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera me apoyaron en la realización de este trabajo, en especial al Dr. Armando Navarro y al Biol. Aldo Valera.

Así como a todos aquellos que con su amistad hicieron agradable mi estancia, especialmente a Zayil.

A la personita que le dio un toque especial a mi vida, Gloria Noemí.

También quiero agradecer a mi compañero Omar por sus comentarios y por su confianza depositada en mi.

Agradezco profundamente a mis padres: Ángel Solís y Gloria Guzmán, a mis hermanos: Lulú, Lala, Víctor, Sandy y a mis sobrinos, a todos ellos, gracias por su invaluable cariño.

---



---

**ÍNDICE**

ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Los sistemas globales de regulación genética.....	5
1.2 La respuesta celular al estrés calórico.....	7
1.3 Los inductores de las proteínas de estrés calórico.....	8
1.4 El sistema global de regulación de la respuesta a estrés calórico en <i>Escherichia coli</i> K-12.....	9
1.4.1 Organización de los genes de estrés calórico en el cromosoma de <i>E. coli</i> K-12.....	9
1.4.2 El gen de $\sigma^E$ , <i>rpoE</i> , de la respuesta periplásmica al estrés calórico en <i>E. coli</i> K-12.....	12
1.4.3 El gen de $\sigma^{32}$ , <i>rpoH</i> , de la respuesta citoplásmica al estrés calórico en <i>E. coli</i> K-12.....	14
1.5 La función celular de las principales proteínas de estrés calórico.....	22
1.6 Importancia del gen <i>rpoH</i> .....	25
1.7 Variación en la secuencia nucleotídica, número y actividad de los promotores del gen <i>rpoH</i> en cepas de <i>E. coli</i> K-12.....	26
1.8 Poblaciones naturales de <i>E. coli</i> .....	28
II. OBJETIVOS.....	30
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1 Obtención de las cepas.....	32
4.2 Caracterización del cepario.....	32
4.2.1 Análisis de la termosensibilidad de las cepas.....	32
4.2.2 Determinación de zimogramas y análisis de la variabilidad genética.....	35
4.3 Análisis de la región codificadora del gen <i>rpoH</i> de <i>E. coli</i> .....	37

4.3.1 Purificación del DNA cromosomal.....	37
4.3.2 Amplificación de la región codificadora del gen <i>rpoH</i> por PCR.....	38
4.3.3 Ensayos de restricción (RFLP's) de la región codificadora de <i>rpoH</i> .....	39
4.4 Análisis de la región reguladora del gen <i>rpoH</i> de <i>E. coli</i> .....	41
4.4.1 Amplificación de la región reguladora del gen <i>rpoH</i> por PCR.....	41
4.4.2 Clonación del producto de PCR.....	42
4.4.3 Obtención y purificación de plásmidos con la región reguladora de <i>rpoH</i> .....	43
4.4.4 Secuenciación nucleotídica de la región reguladora del gen <i>rpoH</i> .....	43
4.4.5 Secuenciación automatizada.....	44
4.4.6 Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas.....	45
V. RESULTADOS.....	46
5.1. Termosensibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de diferentes hospederos.....	46
5.2 Variabilidad genética de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de distintos hospederos.....	48
5.3 Análisis del patrón de restricción de la región codificadora del gen <i>rpoH</i> de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de diferentes hospederos.....	52
5.4 Variabilidad nucleotídica de la región reguladora del gen <i>rpoH</i> de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de distintos hospederos.....	56
VI. DISCUSIÓN.....	62
VII. CONCLUSIONES.....	71
VIII. LITERATURA CITADA.....	73
APÉNDICE I.....	81
APÉNDICE II.....	85

---

## RESUMEN

Durante un incremento súbito en la temperatura, las bacterias sintetizan un grupo particular de proteínas denominadas proteínas de estrés calórico. En *Escherichia coli*, la respuesta a estrés calórico esta regulada principalmente por el factor  $\sigma^{32}$ , codificado por el gen *rpoH*. Este factor regula, en condiciones normales y de estrés, la expresión de los genes para las principales chaperonas y proteasas celulares. La región reguladora de *rpoH* presenta 4 promotores, P1, P3, P4 y P5, dos cajas funcionales para DnaA (DnaA1, DnaA2), dos para CRP (CRP1, CRP2), una para CytR, una posible caja A y una secuencia invertida repetida. Las características de esta región sugieren una regulación compleja de la transcripción de *rpoH*. La regulación de este gen se ha estudiado en cepas de laboratorio de *E. coli* K-12. La región reguladora de *rpoH* posiblemente no es igual en todas las *E. coli* K-12, ya que al menos una cepa tiene un promotor extra y varias cepas presentan una actividad relativa diferente de P1 y P4.

En el presente trabajo se planteó como objetivo principal estimar la variabilidad del gen *rpoH* en 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos, regiones geográficas y tipos de dieta. Se trabajó con 13 cepas silvestres aisladas de aves y mamíferos de México, Australia, Antártida y una cepa de laboratorio, *E. coli* K-12 (W3110). Se realizó una caracterización del cepario con base a su patrón de termosensibilidad y se evaluó la diversidad genética (h) de las 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos por medio del análisis de electroforesis de isoenzimas. De la misma forma se establecieron las relaciones de similitud por medio de la construcción de un fenograma. Se analizó el patrón de restricción de la región codificadora del gen *rpoH* y se secuenció la región reguladora, obteniendo la variabilidad nucleotídica ( $\pi$ ) y las relaciones de similitud entre las cepas analizadas.

Los resultados mostraron que el crecimiento de las cepas silvestres de *E. coli* a 30°C y 42°C es similar al de la cepa de *E. coli* K-12. A 47°C mostraron un

---

comportamiento más heterogéneo; sin embargo, esta heterogeneidad es menor a la reportada para seis cepas diferentes de *E. coli* K-12.

La diversidad genética observada en las 14 cepas de *E. coli* es de  $h=0.48$ , valor que se encuentra dentro del rango establecido para otras colecciones. El patrón de restricción con *Bst*NI, *Hpa*II y *Hinf*I de la región codificadora del gen *rpoH* de las 13 cepas silvestres, es igual al de *E. coli* K-12. El análisis de las secuencias nucleotídicas de la región reguladora del gen *rpoH* de las 14 cepas de *E. coli* mostró una gran homología entre las cepas silvestres respecto a la cepa *E. coli* K-12, el mayor número de cambios se ubican en el brazo derecho de la caja CytR, la variabilidad nucleotídica es de  $\pi=0.012$ . La construcción de los fenogramas tanto con los resultados de la electroforesis de isoenzimas como con la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH*, no se agrupan de manera directa de acuerdo al hospedero, región geográfica y tipo de dieta.

Estos resultados sugieren que los diferentes hospederos no influyen de manera importante en determinar la regulación del gen *rpoH*. Estos resultados validan el uso de las cepas de *E. coli* K-12 como modelo para estudiar la regulación de este importante gen.

---

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los sistemas globales de regulación genética.

Los seres vivos poseen una serie de sistemas de regulación genética que les permiten responder a condiciones de estrés como es la limitación de nutrientes, los cambios de temperatura, de concentración de sales, de pH, etc. Las condiciones de estrés se perciben en la célula y se traducen en señales bioquímicas que se interpretan por la maquinaria celular. El sensor de un estímulo o cambio ambiental puede ser una estructura que sufre daño o distorsión por el estímulo, o bien, un proceso celular que se altera. Todos los genes que responden a un cambio ambiental constituyen un Sistema Global de Regulación (**SGR**) o "estimulón" (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

Los SGR responden a tales cambios al integrar los estímulos ambientales y después activar o reprimir la transcripción de un conjunto de genes, de forma que un cambio ambiental puede modificar la expresión de muchos genes. También un mismo conjunto de genes puede ser inducido por una o más condiciones ambientales. Algunos estímulos inducen a todo un conjunto de genes, mientras que otros inducen sólo a una parte de dicho conjunto (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

En las bacterias, los SGR se componen de un conjunto de genes, operones, y regulones, que se regulan de manera coordinada y que les permiten el crecimiento en condiciones favorables y desfavorables. Un operón es un conjunto de genes que generalmente se transcriben en un solo mRNA (policistrónico), pero en el cual cada gen se traduce independientemente y en forma coordinada, muy frecuentemente los genes de un operón codifican para proteínas que se relacionan funcionalmente en vías o procesos. Un regulón comprende a un conjunto de genes aislados y genes organizados en operones que codifican para funciones distintas, se localizan en sitios diferentes del genoma y tienen un regulador común, el regulador generalmente es una proteína que se

une a secuencias específicas de DNA que se localizan en la región reguladora de los genes para inducir o reprimir su transcripción (Blumenthal *et al.* 1996; Snyder y Champness 1997).

Las proteínas inductoras frecuentemente son factores sigma ( $\sigma$ ) alternativos que reconocen secuencias promotoras específicas diferentes a las de los promotores de la mayoría de los genes y que son reconocidos por el  $\sigma$  vegetativo. Los factores de transcripción tipo  $\sigma$  interactúan directamente con la RNA polimerasa dando lugar a la holoenzima que reconoce a los promotores que serán transcritos. Otras proteínas inductoras interactúan con secuencias diferentes a las de los promotores y su función es aumentar la eficiencia de transcripción de la RNA polimerasa. Las proteínas represoras reprimen la transcripción de los genes. Estas proteínas se unen a secuencias específicas que frecuentemente se sobrelapan con el promotor e interfieren con la unión de la RNA polimerasa a éste (Missiakas *et al.* 1996).

Los SGR les permiten a las bacterias mantener, en diferentes condiciones ambientales, una coordinación entre un metabolismo eficiente de nutrientes, la replicación del DNA, el crecimiento y la división celular (Krueger y Walker 1984; Nover 1991; VanBogelen *et al.* 1987).

Los SGR bacterianos más conocidos son:

- 1) El sistema de regulación de reparación de daño en el DNA (sistema SOS).
- 2) El de respuesta a un cambio de temperatura.
- 3) El de respuesta a la presencia en el medio de diferentes azúcares como fuente de carbono o represión catabólica.
- 4) El de respuesta a la presencia o ausencia de oxígeno.
- 5) Los de respuesta a la limitación de nitrógeno o fosfatos.

---

## 1.2 La respuesta celular al estrés calórico.

La respuesta celular al estrés calórico (EC) es conservada; se presenta en arqueas, bacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados incluyendo al humano (Morimoto *et al.* 1994). En las células, un estrés por calor causa un aumento rápido y transitorio en la síntesis de un grupo particular de proteínas llamadas proteínas de estrés calórico (PEC). Las principales PEC son chaperonas que catalizan el plegamiento correcto de las proteínas y proteasas que degradan a proteínas desplegadas. Las PEC son importantes para la célula, tanto en condiciones normales de crecimiento como en situaciones de estrés (Bukau, 1993).

La respuesta al EC puede dividirse en dos fases: inducción y adaptación. En la inducción se presenta un aumento en la síntesis de las PEC el cual, dependiendo de la proteína y de la intensidad del estrés puede ser de 25 a más de 100 veces. La inducción es rápida y se completa en menos de un ciclo celular. En la fase de adaptación la tasa de síntesis de las PEC disminuye y alcanza un nuevo nivel, superior al presente antes del estrés. El nuevo nivel de síntesis de las PEC depende de la diferencia entre la temperatura inicial y la del EC; mientras mayor es la diferencia, mayor es el nuevo nivel. En el caso de cambios a temperaturas sub-letales o letales, además del incremento en la síntesis de las PEC, se presenta una disminución en la síntesis de todas las demás proteínas (Craig y Gross, 1991).

El EC, además de inducir un incremento en la síntesis de las PEC, modifica de manera general la estructura y la fisiología celular. Por ejemplo, el EC modifica la fluidez membranal, la topología e integridad del DNA, la estructura de las proteínas, la organización del citoesqueleto y la de los ribosomas (Bukau, 1993; Camacho-Carranza *et al.* 1995; Mejia *et al.* 1995; Neumann y Nover, 1991).

El incremento en la síntesis de las PEC se debe a un aumento en la transcripción de los genes que las codifican. En las enterobacterias y en *Caulobacter crescentus* un aumento en la transcripción de los genes de las PEC

---

se debe a un incremento previo en la actividad del factor  $\sigma^{32}$  (Bukau, 1993; Wu y Newton 1996). En otros géneros de proteobacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio cholerae* y *Haemophilus influenzae*, las secuencias nucleotídicas para tales genes son similares al modelo reportado para *E. coli*, por lo que es posible que la expresión de las PEC sea regulada también por homólogos a  $\sigma^{32}$  (Nakahigashi *et al.* 1995; Sahu *et al.* 1997). En *Bacillus subtilis* este aumento está regulado por la presencia de sigmas alternativos y de secuencias pequeñas repetidas invertidas o "CIRCE". En los eucariontes, la transcripción de estos genes se induce al activarse un factor de transcripción denominado factor de estrés de calor (HSF, "heat shock factor") (Wu, 1995).

### 1.3 Los inductores de las proteínas de estrés calórico.

En las bacterias, además del calor, existen otros estímulos que pueden inducir un aumento en la síntesis de algunas de las PEC. Entre estos estímulos se encuentran: infecciones por virus, radiaciones ultravioleta, cambios en osmolaridad, oxigenación, pH y nutrientes, presencia de sustancias tóxicas como etanol, algunos antibióticos y metales pesados (Bukau, 1993; Jenkins *et al.* 1991; Krueger y Walker 1984; Nover, 1991). Cada estímulo determina una respuesta particular en cuanto a nivel de inducción, cinética y PEC que induce. El inductor más potente es el calor mismo, el cual induce la expresión de todo el repertorio de PEC, mientras que la mayoría de los otros estímulos inducen la expresión de sólo algunas de estas proteínas (Krueger y Walker, 1984; Nover, 1991; VanBogelen *et al.* 1987). El calor es además el único estímulo que induce el incremento de las PEC cuando las células se cambian de una condición subóptima de crecimiento a una óptima, como es el cambio de 28°C a 37°C (Neidhardt *et al.* 1984).

En eucariontes, la síntesis de las PEC también se induce en respuesta a varios estímulos, además del calor. Entre los estímulos se encuentran la mayoría de los que se mencionaron para las bacterias y además diferentes hormonas (glucocorticoides y dexametasona) y estados patológicos (infecciones bacterianas, virales, etc.) (Fisher *et al.* 1986; Hahn y Li, 1990).

---

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

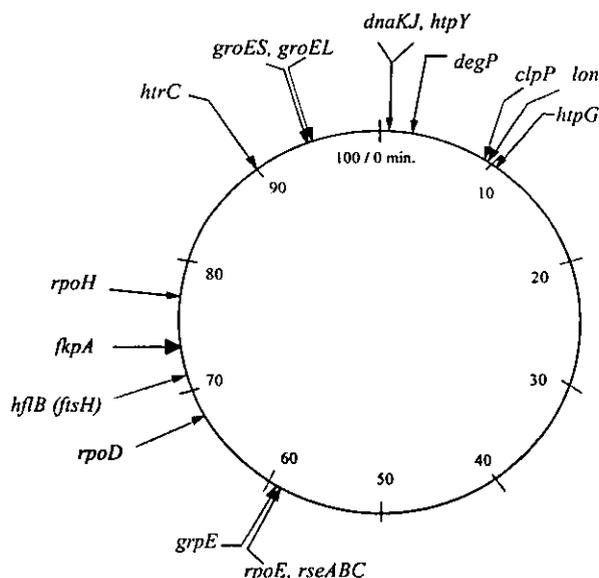
Debido a la gran cantidad de inductores de las PEC, es probable que éstos interactúen con varios blancos que originan señales separadas que finalmente activan a los factores de transcripción de los genes para estas proteínas. Los blancos pueden ser proteínas, DNA y membrana, los que generan señales como desnaturalización de proteínas, cortes de cadena sencilla y doble en el DNA y cambios de fluidez en la membrana. Puede ser también que haya un blanco celular común para todos los inductores, o que haya sólo una señal efectiva y otras que activen indirectamente dando lugar a una sola respuesta (Neidhardt y VanBogelen, 1987). Actualmente, aunque no se descarta la participación de varias señales, se considera que la señal principal es la desnaturalización de las proteínas.

#### **1.4 El sistema global de regulación de la respuesta a estrés calórico en *Escherichia coli* K-12.**

EL SGR del EC comprende a todos los genes que se inducen por un incremento de temperatura. En *E. coli* K-12, el SGR de la respuesta a estrés por calor está integrado por dos regulones definidos por los factores  $\sigma$  alternativos,  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ) y  $\sigma^{32}$ . Los regulones del EC coordinan la expresión de más de 40 genes dispersos en el cromosoma que codifican a las PEC. El regulón de  $\sigma^{32}$  se induce por señales que se generan en el citoplasma, y el de  $\sigma^E$  por señales periplásmicas. El primero regula aproximadamente 26 genes y el segundo alrededor de 10 (Chuang y Blattner, 1993; Erickson y Gross, 1989).

##### **1.4.1 Organización de los genes de estrés calórico en el cromosoma de *E. coli* K-12.**

En *E. coli*, los genes de los regulones de  $\sigma^E$  y  $\sigma^{32}$  se encuentran dispersos en el mapa cromosomal de esta bacteria (Figura 1).



**Figura 1.** Organización de los principales genes de estrés calórico en el mapa cromosomal de *E. coli* K-12.

El gen para  $\sigma^E$ , *rpoE*, se encuentra en el operón *rpoE rseABC* que se localiza en el minuto 58.2 en el mapa cromosomal de *E. coli*. El gen *rpoE*, como se expondrá más adelante, forma parte del propio regulón de  $\sigma^E$ . Otros dos genes conocidos de este regulón, *rpoH* y *degP*, se localizan en los minutos 77.5 y 3.9 respectivamente. El último gen conocido de  $\sigma^E$ , *fkpA*, que codifica para una peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa, es importante para el recambio y plegamiento de las proteínas del periplasma y se encuentra ubicado en el minuto 74.8 en el mapa cromosomal.

El regulón de  $\sigma^{32}$  contiene aproximadamente 26 genes dispersos en el mapa, de los cuales varios se encuentran organizados en operones. Siguiendo su posición en el mapa cromosomal, los principales genes y operones de este regulón son: *dnaKJ, htpY, clpP, lon, grpE, rpoD, ftsH* y *groESL*.

---

El operón *dnaKJ* se encuentra localizado en el minuto 0.3 del mapa de *E. coli*. Este operón tiene dos promotores para  $\sigma^{32}$  que se inducen por el calor y que se localizan en las posiciones -115 y -40 hacia el extremo 5' con relación al sitio de inicio de la traducción (Cowing *et al.* 1985; Saito y Uchida, 1978). Estos genes codifican para las proteínas DnaK y DnaJ, respectivamente. El operón posiblemente no tiene promotores para  $\sigma^{70}$ .

Otro gen que se localiza en esta región es *htpY*. Este gen se encuentra a 700 pb hacia el extremo 5' del operón *dnaKJ*, y se transcribe en la misma dirección que el operón *dnaKJ* (Missiakas *et al.* 1993).

Por otra parte, el gen *clpP* localizado en el minuto 9.8 codifica para la proteasa ClpP (ver más adelante).

El gen *lon* se encuentra en el minuto 9.9 y codifica para la proteasa Lon (Lindquist, 1986).

El gen *grpE* que se localiza en el minuto 59.1 del mapa cromosomal, codifica para la proteína GrpE que, junto con DnaJ, interacciona con DnaK para favorecer la actividad de chaperona de esta proteína (ver más adelante).

El gen de *rpoD* se encuentra en el minuto 69.2 y codifica para el factor  $\sigma^{70}$ . Este gen forma parte de un mRNA policistrónico que contiene a los siguientes genes: *rpsU-dnaG-rpoD*. Los dos primeros codifican para la proteína ribosomal S21 y DNA primasa, respectivamente (Burton *et al.* 1983). El factor  $\sigma^{70}$  reconoce a los promotores de los genes involucrados en la mayoría de las funciones celulares.

El gen *hflB* (*ftsH*) se localiza en el minuto 71.6 del mapa cromosomal y codifica para la proteasa HflB o FtsH.

El operón *groESL* localizado en el minuto 94.1 del mapa cromosomal codifica para las proteínas GroES y GroEL que participan en el plegamiento de

---

proteínas (ver más adelante). Este operón, además de un promotor para  $\sigma^{32}$  tiene uno para  $\sigma^{70}$ .

En *E. coli*, la mayoría de estos genes se encuentran en una sola copia; sin embargo, en otras bacterias pueden estar en más de una copia. En muchos eucariontes, al menos los genes homólogos de *dnaK* y *groE*, *hsp70* y *hsp60*, constituyen una familia de genes.

Existen otros genes que se requieren para crecer a temperaturas altas como son los genes *htr* (*h*igh *t*emperature *r*equirement). Esos genes se transcriben por  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{32}$  ó  $\sigma^E$ . Un ejemplo es el gen *htrC*, que se encuentra en el minuto 90.2. Las mutantes en este gen tienen una síntesis elevada de PEC, por lo que es probable que *htrC* module el control transcripcional de  $\sigma^{32}$  (Raina y Georgopoulos, 1990).

#### 1.4.2 El gen de $\sigma^E$ , *rpoE*, de la respuesta periplásmica al estrés calórico en *E. coli* K-12.

El factor de transcripción de 24 kDa nombrado  $\sigma^{24}$  por Wang y Kaguni, (1989) y  $\sigma^E$  por Erickson y Gross (1989), define a uno de los dos principales regulones de estrés calórico en *E. coli* (Missiakas *et al.* 1996). El regulón  $\sigma^E$  está formado por al menos 7 genes: *degP* (*htrA*), *fkpA*, *rpoE*, *rseA*, *rseB*, *rseC* y *rpoH*; aunque la sobreexpresión de  $\sigma^E$  induce la expresión de por lo menos 10 proteínas. El gen que codifica para este  $\sigma$ , es el gen *rpoE*. Este gen tiene un promotor dependiente de  $\sigma^E$ ; es decir, se encuentra bajo su propia regulación transcripcional. Además de esta autoregulación positiva a nivel de la transcripción, la actividad celular de  $\sigma^E$  se regula de manera negativa a nivel post-transcripcional.

##### A) AUTOREGULACION POSITIVA

El análisis de la región reguladora del gen *rpoE* muestra 2 sitios de inicio transcripcional: un sitio proximal al codón de iniciación y que corresponde al

---

promotor P2 y otro sitio distal o P1. El promotor P2 tiene una secuencia consenso -35 y una -10 homólogas a otros promotores dependientes de  $\sigma^E$ , como son el promotor P3 del gen *rpoH* y el promotor de *degP*.

La actividad transcripcional del P2 de *rpoE* es la única que se mantiene al incrementar la temperatura de 30 a 50°C, ya que a 50°C la transcripción de la mayoría de los genes que no son de EC y que dependen de  $\sigma^{70}$  disminuyen notablemente. El promotor distal P1 del gen *rpoE* no muestra homología con los promotores para  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{32}$ , ó  $\sigma^E$ . La cantidad del mRNA de P1, a diferencia del de P2, disminuye con el incremento de la temperatura, por lo que la regulación de *rpoE* a temperaturas altas depende exclusivamente de su propia autoregulación positiva a través del P2.

## B) REGULACIÓN NEGATIVA

Como otros factores  $\sigma$ ,  $\sigma^E$  esta sujeto a un control negativo, por un posible factor(es) anti-sigma (Huges y Mathee, 1998). El razonamiento para esta conclusión se basa en las siguientes observaciones: En las clonas en las cuales se expresa solamente el gen *rpoE* se observa una actividad transcripcional del P3 de *rpoH*, del P2 de *rpoE* y del promotor de *degP*, además de otros promotores para  $\sigma^E$  presentes en aproximadamente otros 7 genes. Sin embargo, cuando se co-expresa el gen *rpoE* con una secuencia adyacente de DNA localizada hacia el extremo 3' del mismo gen, se observa una disminución transcripcional hasta de 4 veces. El análisis de esa secuencia mostró la presencia de 3 genes contiguos: *rseA*, *rseB* y *rseC* (regulator of sigma E), los cuales se transcriben junto con el gen *rpoE* constituyendo el operón *rpoE rseABC* (Missiakas *et al.* 1996). El gen *rseA* es un regulador negativo fuerte y *rseB* uno débil. La proteína RseA es una proteína de membrana interna que interacciona directamente con  $\sigma^E$  actuando como un factor anti-sigma. RseB es una proteína del espacio periplásmico la cual posiblemente disminuye la actividad de  $\sigma^E$  a través de su interacción con RseA. RseC, una proteína posiblemente membranal, tiene un efecto menor y positivo sobre la actividad de  $\sigma^E$  únicamente en ausencia de RseB. El mecanismo por el

cual RseC ejerce este efecto positivo sobre  $\sigma^E$  aún se desconoce (De las Peñas *et al.* 1997; Missiakas *et al.* 1997).

### 1.4.3 El gen de $\sigma^{32}$ , *rpoH*, de la respuesta citoplásmica al estrés calórico en *E. coli* K-12.

El primer regulón de EC que se describió fue el de  $\sigma^{32}$ . El factor de transcripción  $\sigma^{32}$  de 32 kDa está codificado por el gen *rpoH* y reconoce promotores específicos. Los análisis genéticos, de síntesis diferencial de proteínas y de mapeo cromosómico y clonación molecular, han identificado a más de 26 genes de este regulón. Los genes que más se han estudiado son: *dnaKJ*, *clpP*, *clpA*, *clpB*, *lon*, *grpE*, *rpoD*, *ftsH*, *rpoH*, *groESL*, (Neidhardt y Van Bogelen, 1981; Neidhardt *et al.* 1983). La inducción de los genes de EC de este regulón ocurre por la activación de la transcripción a partir de los promotores que reconoce la RNA polimerasa que contiene a  $\sigma^{32}$  (Cowing *et al.* 1985; Grossman *et al.* 1984; Landick *et al.* 1984). La proteína  $\sigma^{32}$  también se requiere para la inducción y expresión de estos genes en células sin estrés (Zhou *et al.* 1988). La inducción de los genes de EC depende de la cantidad de  $\sigma^{32}$ , ya que al aumentar  $\sigma^{32}$ , sin elevarse la temperatura, se incrementa la síntesis de las PEC (Yamamori y Yura, 1982; Grossman *et al.* 1987).

En la inducción de la respuesta hay un incremento rápido en los niveles de  $\sigma^{32}$ , debido a que aumenta la transcripción y la traducción del mRNA de *rpoH*, así como la vida media de esta proteína. A 30°C *rpoH* se transcribe eficientemente, pero se traduce poco (Kamath-Loeb y Gross, 1991).

#### A) La región reguladora del gen *rpoH*.

La región reguladora del gen *rpoH* (*htpR*) de aproximadamente 250 pares de bases (pb) presenta al menos 4 promotores: P1, P3, P4 y P5 (Erickson *et al.* 1987; Nagai *et al.* 1990) (Figura 2). Los promotores P1, P4 y P5 son reconocidos por  $\sigma^{70}$  mientras que P3 sólo interacciona con  $\sigma^E$  y es muy activo a temperaturas altas (Erickson y Gross, 1989; Wang y Kaguni, 1989).

---

El P1 es el promotor más distal y más potente a temperatura fisiológica. El inicio de transcripción de este promotor se localiza a -221 pb hacia el extremo 5' respecto al sitio de inicio de la traducción de *rpoH* (codón ATG) y se encuentra sobrepuesto al terminador del operón de división celular *ftsYEX*. El P1 junto con el P4 se incrementan por un cambio de baja a alta temperatura. El inicio de transcripción del P4 se encuentra aproximadamente a -81 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio de la región codificadora. A 30°C aproximadamente el 90 % del mRNA corresponde a P1 y P4 (Erickson *et al.* 1987). El promotor P1 es más activo en DNA relajado, mientras que el P4 lo es en DNA superenrollado (López-Sánchez *et al.* 1997). Las secuencias para estos promotores se muestra en la Tabla 1.

El promotor P3 interacciona con  $\sigma^E$ , producto del gen *rpoE* (Wang y Kaguni, 1989). El inicio de transcripción de este promotor se localiza en la posición -88 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio de la traducción y su secuencia es diferente a la de los promotores de otros  $\sigma$  (Tabla 1). A 30°C menos del 2% de los transcritos de *rpoH* dependen de  $\sigma^E$ . Durante un cambio de temperatura de 30 a 42°C estos transcritos se incrementan más de diez veces. En una exposición a 50°C, temperatura letal, en el cual  $\sigma^{70}$  se inactiva, más del 90% del mRNA de *rpoH* proviene de P3 (Erickson *et al.* 1987). Esto puede explicar el hecho de que durante el EC de 50°C se sintetizan únicamente las proteínas de EC (Craig y Gross, 1991; Neidhardt *et al.* 1983).

P5 es un promotor débil, su sitio de transcripción se localiza a -61, -62 pb hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la traducción (Nagai *et al.* 1990). Este promotor es regulado principalmente por la fuente de carbono presente en el medio.

Si en el medio hay glucosa, o un producto de su degradación, se inhibe la utilización de otros azúcares como la lactosa, esto ocurre porque en *E. coli* la glucosa es la fuente preferencial de carbono. El P5 incrementa su expresión en ausencia de glucosa o por adición de etanol, requiere cAMP (adenosina 3', 5'-

monofosfato) y a la proteína receptora de cAMP, CRP (cyclic AMP receptor protein). La unión de CRP-cAMP al DNA induce la transcripción de P5, pero interfiere con la transcripción de P4. Esto sugiere una alternancia entre ambos promotores (Nagai *et al.* 1990). Sin embargo, algunos estudios muestran que P5 probablemente es un promotor secundario, ya que las células con o sin cAMP pueden responder a un estrés por calor (Lee-Rivera y Gómez-Eichelmann, 1994)

En ausencia de glucosa, las bacterias presentan un incremento en cAMP que parece ser una señal de alerta para un estrés metabólico. Cuando el cAMP se añade con glucosa y lactosa, la inducción de  $\beta$ -galactosidasa (la enzima que degrada a la lactosa a glucosa y galactosa) no se reprime tanto como cuando no se añade el cAMP. Esto indica que el cAMP es muy importante para superar la represión por glucosa (Busby y Kolb, 1996).

La actividad transcripcional del P5 de *rpoH* es de 2 a 3 veces mayor en células creciendo en un medio con una fuente de carbono diferente a la glucosa. En ausencia de glucosa, la concentración celular de cAMP es alta, por lo que aumenta la concentración de CRP-cAMP (Bukau, 1993; Nagai *et al.* 1990) y con ello la actividad de P5.

**Tabla 1.** Secuencias nucleotídicas de la región -35 y -10 de los promotores del gen *rpoH* en *E. coli* K-12.

	HOLOENZIMA	REGIÓN -35	ESPACIO	REGIÓN -10	REFERENCIA
P1	$E_{\sigma}^{70}$	TTTACG	20 nt	TATACT	Fujita y Ishihama, 1987.
P3	$E_{\sigma}^{24}$	GAACTT	16 nt	TCTGA	Raina <i>et al.</i> 1995.
P4	$E_{\sigma}^{70}$	TTGTGG	17 nt	TAAAAC	Fujita y Ishihama, 1987; Erickson <i>et al.</i> 1986.
P5	$E_{\sigma}^{70}$	ATCACG	21 nt	TAACCT	Nagai <i>et al.</i> 1990; Huerta <i>et al.</i> 1998.

---

Además de los 4 promotores, la región reguladora del gen *rpoH* presenta varios sitios de unión para proteínas reguladoras de la transcripción como son: dos cajas CRP (CRP1 y CRP2), una caja CytR, dos cajas DnaA (DnaA1 y DnaA2) y una caja A. Hacia el 3' de la caja A, se encuentra una secuencia invertida repetida (Figura 2).

La unión *in vitro* de CRP y la proteína CytR a la región reguladora de *rpoH* muestra que esta región contiene 2 sitios de unión CRP (CRP1 y CRP2) separados por 53 pb, región en la cual se sitúa CytR. Kallipolitis y Valentin-Hansen (1998), reportaron que la transcripción *in vivo* de *rpoH* esta regulada por el anti-activador CytR.

El regulón CytR se induce por la presencia de nucleósidos, principalmente citidina, en el medio de crecimiento. El complejo cAMP-CRP unido al anti-activador CytR reprimen la expresión de los promotores P3, P4 y P5 aproximadamente 3 veces, llegando a reprimir hasta 10 veces en cepas que sobreproducen CytR. Esta represión se neutraliza si se añade citidina al medio de cultivo (Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998). En el caso de *rpoH*, el complejo ternario CytR<sub>1</sub>-CRP<sub>2</sub>, se unen a los sitios CRP1, CRP2 y CytR. El regulón CytR ha mostrado ser un regulador transcripcional "fino" para los genes de utilización de nucleósidos, para *rpoH* y para *ppiA*, un gen relacionado con el plegamiento de las proteínas. Es posible que la inducción de la permeasa y de las enzimas necesarias para la utilización de nucleósidos requiera de un aumento de las chaperonas reguladas por *rpoH* y de la proteína PpiA (Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998).

El sitio CRP1 se ubica a -38/-39 pb del extremo 5' del inicio de transcripción de P5. Este sitio cubre la región -35 de P5, la caja DnaA2 y parte de las -35 de P4 y P3. La secuencia de CRP1, CRP2 y CytR de *rpoH* se muestra en la Tabla 2.

La unión *in vitro* de la proteína DnaA purificada, a las dos cajas DnaA de *rpoH*, inhibe la transcripción del promotor P3 y P4 (Wang y Kaguni, 1989). En células que sobreexpresan a la proteína DnaA se reportan resultados similares; es

decir, la unión DnaA-DNA reprime la actividad de P3 y P4. La secuencia de 9 pares de bases de las cajas DnaA de *rpoH* se muestra en la Tabla 2.

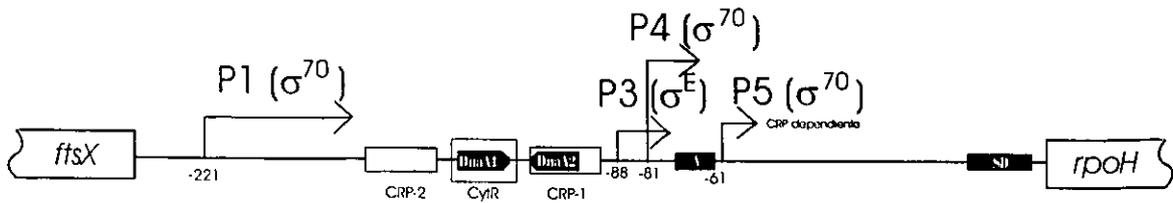
La proteína DnaA es muy importante para la replicación del DNA y para la regulación de la transcripción de varios genes, además de *rpoH*. En la región del origen de la replicación, la unión de DnaA a las cajas presentes en esta región es esencial para que se inicie la replicación. Entre los genes regulados por DnaA se encuentra el gen para esta proteína.

Landick *et al.* (1984) reportaron una posible caja A en la región reguladora de *rpoH* la cual se ubica entre los -70 y -63 nucleótidos hacia el extremo 5' del codón de iniciación. La secuencia de esta caja se muestra en la Tabla 2. Las cajas A han sido implicadas en la actividad de la proteína N que es un antiterminador de la transcripción codificado por el fago lambda (Friedman y Gottesman, 1983). Las cajas A son sitios de unión del producto del gen *nusA* que es necesario para que se lleve a cabo la antiterminación. Estas cajas usualmente preceden a una secuencia invertida repetida que se encuentra a 12 pares de bases del extremo 5' de la secuencia Shine-Dalgarno (SD). En el caso de la posible caja A y la secuencia invertida repetida hacia el 3' presentes en *rpoH*, aún no se conoce su función fisiológica.

**Tabla 2.** Secuencias nucleotídicas de las cajas reguladoras del gen *rpoH*

CAJAS REGULADORAS	SECUENCIA	REFERENCIA
CAJA CRP1	TGTGGATAAAATCACG	Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998 Nagai <i>et al.</i> 1990.
CAJA CRP2	TCATCTCTATGTCACA	
CAJA CytR	TGCGTAATTTATTCACAAGCTTGCATT	Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998.
CAJA DnaA1	TTATTCACA	Wang y Kaguni, 1989.
CAJA DnaA2	TTATCCACA	
CAJA A	TGCTCTTA	Landick <i>et al.</i> 1984.

La caja DnaA2 se encuentra orientada en sentido inverso a la DnaA1 por lo que la secuencia de esta caja en la misma hebra es TGTGGATAA.



**Figura 2.** Organización de la región reguladora del gen *rpoH* de *E. coli* K-12 (Modificado de Yura et al. 1993).

### B) La región codificadora del gen *rpoH*.

El aumento en la actividad de  $\sigma^{32}$  durante el EC se debe principalmente a la regulación de la traducción del mRNA de *rpoH* y a un incremento en la vida media de esta proteína. El incremento en la actividad del P3 de *rpoH* durante el EC, causa un aumento en la cantidad de mRNA para este gen de 3 a 5 veces; sin embargo, la cantidad de  $\sigma^{32}$  sube más de 15 veces a 42°C.

La región codificadora del gen *rpoH* de 855 pb presenta 3 sitios importantes de regulación post-transcripcional (Yura et al. 1993).

La primera región, denominada **A**, es un elemento positivo de traducción de 15 nucleótidos localizados de la posición 6 a la 20, en relación al codón de iniciación de la traducción (Figura 3). Esta región es complementaria a la subunidad 16S del RNA ribosomal. Las mutaciones en A inducen una disminución drástica de hasta 15 veces en la traducción del mRNA de *rpoH*.

La segunda región, denominada **B**, se localiza en la posición de la 110 al 210 de la región codificadora del gen *rpoH*, (Figura 3). Este sitio actúa como un elemento negativo esencial en la termoregulación, ya que las mutantes en el extremo 5' ó 3' de este sitio, incrementan notablemente la eficiencia de traducción. Existen evidencias que sugieren que algunas bases de la región B se aparean con bases de la región A y forman una estructura secundaria que secuestra a la región A y al sitio de inicio de la traducción. Esta estructura posiblemente está involucrada en la represión traduccional del mRNA de *rpoH* a bajas temperaturas

o bajo condiciones de no estrés, así como en su inducción al incrementar la temperatura (Yura *et al.*, 1993).

La tercera región, denominada **C** o caja RpoH, se localiza en la posición de la 364 a la 433 de la región codificadora de *rpoH* (McCarty *et al.* 1996) (Figura 3). Este sitio reprime la traducción del mRNA de *rpoH*. El uso de mutantes en C que alteran la secuencia de aminoácidos de  $\sigma^{32}$ , eliminan la represión traduccional. Esto se debe a que posiblemente DnaK y las proteínas que interaccionan con ella, DnaJ y GrpE se une a la región C de  $\sigma^{32}$  participando en el arresto directo o indirecto de la síntesis de  $\sigma^{32}$ . No se conoce bien si se requieren las tres proteínas y si se requiere un orden de unión específico de estas proteínas a  $\sigma^{32}$ .

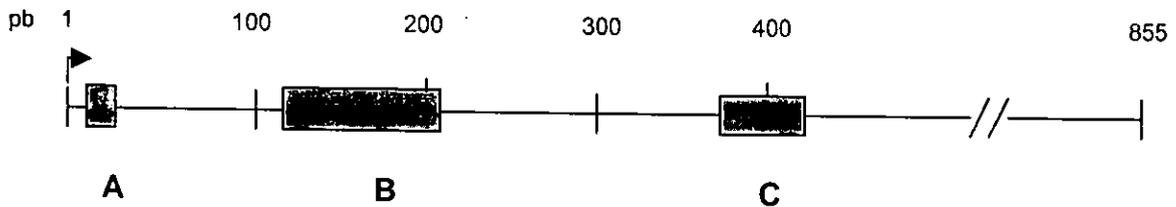


Figura 3. Sitios A, B y C de la región codificadora de *rpoH* (Modificado de Missiakas *et al.* 1996).

### C) El terminador del gen *rpoH*.

Con base a la secuencia nucleotídica del gen *rpoH*, Landick *et al.* (1984) y Yura *et al.* (1984) proponen la existencia de un terminador  $\rho$ -independiente para el gen *rpoH*, con una estructura de tallo-asa (Figura 4).

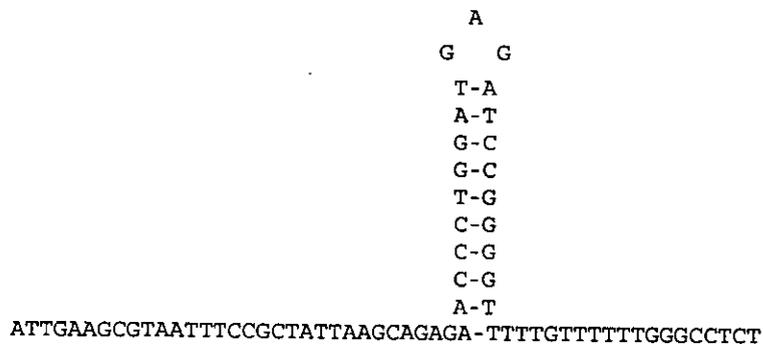
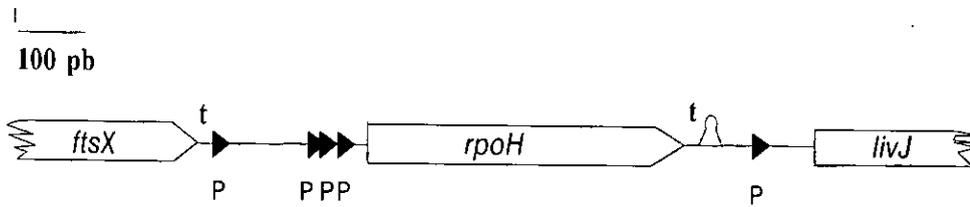


Figura 4. Terminador  $\rho$ -independiente en forma de tallo-asa de *rpoH*.

El gen *rpoH* es una unidad transcripcional y se encuentra ubicado entre el operón *ftsYEX* y el gen *livJ* en el minuto 77.5 del cromosoma de *E. coli* (Figura 5).



**Figura 5.** Localización del gen *rpoH* entre el operón *ftsYEX* y el gen *livJ* en el minuto 77.5 del mapa cromosomal de *E. coli*.

#### D) Regulación de la estabilidad de la proteína $\sigma^{32}$ .

El polipéptido  $\sigma^{32}$  es una de las proteínas más inestables de *E. coli*. Su vida media es de 45-50 segundos a 30°C, pero se incrementa transitoriamente a 8 min. a temperaturas elevadas. Este incremento no se presenta en las mutantes *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* y *ftsH*. Un modelo sugiere que a 30°C la chaperona DnaK interacciona directamente con la región C de  $\sigma^{32}$  para favorecer su degradación por la proteasa membranal FtsH: En este caso la chaperona DnaK funcionaría como un regulador anti- $\sigma$  (Hughes y Mathee, 1998). El mecanismo propuesto es que primero DnaJ se une a  $\sigma^{32}$  y lo presenta a DnaK-ATP. En presencia de ATP, DnaJ induce que DnaK compita con la RNA polimerasa por la unión de  $\sigma^{32}$ . La hidrólisis de ATP por la actividad de ATPasa de DnaK favorece la formación de un complejo terciario estable DnaK-ADP-DnaJ- $\sigma^{32}$ . Finalmente GrpE dirige a este complejo a la proteasa FtsH para su degradación (Blaszczak *et al.* 1999; Hughes y Mathee, 1998). La vida media de  $\sigma^{32}$  aumenta durante el EC ya que al incrementarse las proteínas desplegadas que son sustrato de la chaperona DnaK y de FtsH disminuye la formación de complejos terciarios y la degradación de  $\sigma^{32}$ .

## 1.5 La función celular de las principales proteínas de estrés calórico.

Las principales PEC son chaperonas, proteasas y proteínas reguladoras (Tabla 3).

Tabla 3. Principales proteínas de estrés calórico en *E. coli*

REGULADAS POR $\sigma^{32}$				
CHAPERONAS	PROTEASAS	REGULADORES	ENZIMAS METABOLICA	FUNCIONES DESCONOCIDAS
DnaK	Lon/La	$\sigma^{70}$	GAPDH	HslA
DnaJ	ClpPA	HtrC	HtrM (RfaD)	HslC
ClpX	ClpPX	HtpY		HslK
ClpA	HflB (FtsH)			HtpX
ClpB	HslV (HtpO)			FtsJ
HtpG	HslU (HtpI)			HslO
GrpE				HslP
IbpB (HtpE, HslS)				HslW
IbpA (HtpN, HslT)				HslX
GroEL				HslY
GroES				HslZ
REGULADAS POR $\sigma^{24}$				
PROTEASAS	REGULADORES	OTRAS		
HtrA (DegP)	$\sigma^{24}/\sigma^E$	FkpA		
	RseA			
	RseB			
	RseC			
	$\sigma^{32}$			

(Modificado de Missiakas *et al.* 1996).

La principal función de las chaperonas moleculares es unirse a proteínas parcialmente plegadas y promover su plegamiento correcto limitando las interacciones no productivas que dan lugar a la agregación o al plegamiento

incorrecto de los polipéptidos. Las proteasas, a su vez, funcionan degradando proteínas dobladas incorrectamente ó anormales.

Las chaperonas moleculares tienen la propiedad general de interactuar transitoria y no covalentemente con otras proteínas para cumplir las siguientes funciones:

- Estabilizar polipéptidos recién sintetizados durante su elongación en los ribosomas.
- Interaccionar con proteínas destinadas a la secreción o al transporte.
- Mediar el ensamble correcto de los polipéptidos.
- Prevenir la agregación y el plegamiento incorrecto de proteínas bajo condiciones de estrés.
- Presentar a las proteínas sustrato a las proteasas.

### a) Chaperonas

**HtpG** La proteína HtpG es homóloga a la proteína Hsp90 de eucariotes con la que presenta 40% de identidad. Es moderadamente abundante a temperatura normal y se induce fuertemente por el calor (Missiakas *et al.* 1996).

**DnaK** La proteína DnaK es una de las principales chaperonas encargadas de generar el plegamiento adecuado de las proteínas de la célula, para su actividad óptima requiere de las proteínas DnaJ y GrpE. La proteína DnaK de *E. coli* pertenece a la familia de chaperonas moleculares Hsp70. Su papel fundamental en el plegamiento y translocación a membrana de proteínas, es determinado por su propiedad de unirse a péptidos hidrofóbicos extendidos y de liberarlos después de sufrir cambios conformacionales inducidos por el ATP. Todos los miembros de la familia de Hsp70 consisten de tres dominios: 1) el dominio amino terminal, que contiene el sitio de unión a ATP, magnesio y a la co-chaperona GrpE; 2) el dominio carboxilo terminal proximal que lleva el sitio de unión al péptido y 3) el dominio carboxilo terminal distal que podría incluir el sitio de unión para la co-chaperona DnaJ (Hartl, 1994).

**DnaJ** La proteína DnaJ es un miembro de la familia de chaperonas Hsp40. Su masa molecular es de 41 kDa. Funciona como dímero y se ha determinado que la región amino terminal es necesaria y suficiente para interactuar con la proteína DnaK. DnaJ se une a DnaK alterando su actividad en dos aspectos: acelera la tasa de hidrólisis del ATP unido a DnaK y promueve cambios conformacionales en DnaK, que estabilizan el complejo entre el péptido sustrato y la proteína DnaK (Gross, 1996; Szyperski, 1994).

**GrpE** La proteína GrpE de 23 kDa funciona como un dímero. Esta proteína interactúa establemente con el dominio

amino terminal de DnaK, específicamente con el asa expuesta en la superficie del dominio de ATPasa de DnaK, cerca del sitio de unión al nucleótido unido a DnaK. Se ha propuesto que GrpE no sólo baja la afinidad de DnaK por el nucleótido, sino que al incrementar la afinidad de DnaK por magnesio debilita las interacciones de magnesio con el nucleótido antes de su liberación (Zylicz, 1987; Skowrya, 1995).

**GroEL** GroEL es una proteína de 58 kDa que forma una estructura oligomérica compuesta de dos anillos heptaméricos unidos espalda con espalda. GroEL es una proteína plegada con tres dominios distintos: 1) el dominio ecuatorial que contiene los sitios de unión a ATP y es responsable de las interacciones entre los monómeros y las regiones de contacto entre los dos anillos, 2) un pequeño dominio intermedio que conecta el dominio ecuatorial con el apical, y 3) el dominio apical que forma la abertura del cilindro y expone residuos hidrofóbicos hacia la cavidad que podrían interactuar con las superficies hidrofóbicas del polipéptido sustrato.

**GroES** La proteína GroES forma un anillo heptamérico con subunidades de masa molecular relativa de 10 kDa. GroES se coloca como una tapadera sobre la parte superior de uno de los dos anillos de GroEL para formar un complejo estable GroEL<sub>14</sub>-GroES<sub>7</sub>-ADP<sub>7</sub>. La unión de GroES a uno de los anillos de GroEL, induce un cambio conformacional que a su vez induce un crecimiento del doble en el volumen de la cavidad central.

## b) Proteasas

**Lon** La proteína Lon de 88 kDa funciona como un oligómero de cuatro subunidades. Lon es una serín-proteasa que funciona como una endopeptidasa, liberando péptidos entre 5 y 20 aminoácidos de longitud. Las células que carecen de Lon muestran una disminución del 50% en la degradación de proteínas anormales lo que indica que Lon juega un papel muy importante en este proceso.

**ClpAP** ClpP es la subunidad proteolítica y ClpA es la subunidad reguladora que une al sustrato y los dos a su vez unen e hidrolizan ATP. La proteasa ClpAP funciona como un complejo de 12 subunidades de ClpP y 6 subunidades de ClpA, sugiriendo una organización estructural similar a la del proteosoma 26S de eucariote. Existe una segunda subunidad reguladora para ClpP llamada ClpX. ClpXP forma una proteasa dependiente de ATP con una especificidad de sustrato diferente. Tanto ClpA como ClpX solas funcionan como chaperonas. ClpA convierte la proteína dimerica RepA del bacteriófago P1 a la forma del monómero activo. ClpX, por su parte puede desensamblar la proteína  $\lambda$ O y prevenir su agregación inducida por el calor de manera dependiente de ATP. Sin embargo, cuando ClpP esta presente, el sustrato de la chaperona ahora se convierte en el sustrato para la proteólisis; ClpAP degrada a RepA pero no a MuA y ClpXP degrada a la proteína  $\lambda$ O y a MuA pero no a RepA. Actualmente se han descrito varias subfamilias de Clp. La subfamilia ClpY esta cercanamente relacionada en secuencia a ClpX. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que ClpY se une a una peptidasa completamente diferente, ClpQ o HslU (Gottesman *et al.* 1997).

**DegP** La proteína DegP (HtrA) es una proteasa localizada en el espacio periplásmico de *E. coli*. es esencial para el crecimiento de *E. coli* a temperaturas superiores de 40°C (Lipinska *et al.* 1989).

**FtsH** La proteína FtsH o HflB, es una proteína de membrana interna, juega un papel muy importante en la proteólisis de  $\sigma^{32}$  y en el ensamble de proteínas a la membrana interna y exportación de proteínas (Tomoyasu *et al.* 1995). FtsH es una proteasa inducida por el calor que autoregula negativamente la respuesta de estrés por calor (Morimoto *et al.* 1994).

## c) Proteínas reguladoras

HtpY Esta proteína de 21 kD regula positivamente la expresión de las PEC modificando el nivel y/o actividad de  $\sigma^{32}$  (Missiakas *et al.* 1993).

#### d) Enzimas

GAPDH, Además de proteínas reguladoras, chaperonas y proteasas, se han identificado otras proteínas de EC con actividad enzimática metabólica como son GAPDH (Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa); RfaD (DL-glicerol-D-manoheptosa epimerasa) y topoisomerasa I codificada por *topA*. Esta enzima cataliza el relajamiento de moléculas de DNA superenrolladas (Gómez-Eichelmann y Camacho Carranza, 1995). La función de estas enzima en el EC no esta clara.

## 1.6 Importancia del gen *rpoH*.

El gen *rpoH* es uno de los genes más importantes para definir el rango de temperatura de crecimiento de *E. coli*, de aproximadamente 10 a 47°C en medios ricos, dándole la característica de mesófila. Como ya se mencionó, el producto de este gen, el factor de transcripción  $\sigma^{32}$ , es el principal regulador de los genes de EC que codifican para las chaperonas y proteasas celulares. Estas proteínas son esenciales para el crecimiento normal de las bacterias y para asegurar una respuesta celular adecuada ante un gran número de cambios ambientales adversos.

Las cepas que carecen del gen *rpoH* pierden la propiedad de ser mesófilas y únicamente son viables a temperaturas menores o iguales a 20°C (Zhou *et al.* 1988). A partir de estas cepas es posible aislar células que crecen hasta 40°C. Estas células tienen una mutación supresora en el gen *groEL* que causa que este gen se exprese de manera constitutiva e independiente de  $\sigma^{32}$ . Finalmente, de estas mutantes que crecen a 40°C es posible a su vez aislar células con otra mutación supresora que ahora le permite a la bacteria crecer a 42°C. Estas células expresan a la proteína DnaK en ausencia de  $\sigma^{32}$ . Esto significa que las proteínas GroEL y DnaK son muy importantes para definir el rango de crecimiento de *E. coli* y prueba, indirectamente, el papel fundamental de *rpoH* en definir este rango. Por otra parte, existe una co-relación entre el número de moléculas de  $\sigma^{32}$ , la concentración de las principales PEC y la capacidad de las células de crecer a temperaturas altas. Por ejemplo, la síntesis de GroEL en condiciones fisiológicas

basales a 30°C, donde existen pocas moléculas de  $\sigma^{32}$ , es menor al 1% de la proteína celular total, pero llega a ser más del 20% del total de la proteína celular a 46°C. A esta temperatura, como ya se mencionó, la actividad de  $\sigma^{32}$  es alta. Nuevamente esto prueba la importancia de *rpoH* para permitir la viabilidad de *E. coli* a diferentes temperaturas.

Además de la importancia de *rpoH* para el crecimiento bacteriano celular a diferentes temperaturas, este gen es esencial para permitir a las células sobrevivir a diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, las mutantes en este gen son más sensibles a etanol, luz UV, metales pesados y condiciones oxidativas, etc. Todas estas condiciones generan daños celulares que requieren de la inducción de chaperonas y proteasas para repararlos.

### **1.7 Variación en la secuencia nucleotídica, número y actividad de los promotores del gen *rpoH* en cepas de *E. coli* K-12.**

Las propiedades de la regulación del gen *rpoH* se conoce con cierto detalle únicamente para *E. coli* K-12, enterobacteria aislada de humano y cultivada por más de 60 años en condiciones de laboratorio. Sin embargo, no todas las cepas K-12 son reguladas de la misma manera, en la literatura existen variaciones que a continuación se describen.

Landick *et al.* (1984) clonaron y secuenciaron el gen *rpoH* de la cepa SC122 (Neidhardt *et al.* 1983). Para esto construyeron el plásmido pFN97 (Landick *et al.* 1984). Este plásmido contiene el fragmento C del plásmido pOX15 subclonado en el plásmido pOX13. El fragmento C comprende la secuencia nucleotídica de toda la región codificadora de *rpoH* y 192 pb de la región reguladora, a partir del extremo 5' del codón ATG de inicio de la proteína  $\sigma^{32}$ .

Por otro lado, el grupo de Yura *et al.* (1984) reportaron la secuencia nucleotídica del gen *rpoH* de la cepa MC4100. El gen *rpoH* fue subclonado en el vector M13 a partir del plásmido multicopia pKV3. Este grupo de investigación secuenció la región codificadora y 131 pb de la reguladora.

Gill *et al.* (1986) secuenciaron al operón *ftsYEX* y parte de la región reguladora de *rpoH*. La secuencia de Yura *et al.* (1984) va del sitio *HindIII* (-131 pb) al terminador de *rpoH*, mientras la del Gill *et al.* (1986) se inicia en *ftsYEX* y termina en ese sitio *HindIII* de *rpoH*

Finalmente, el grupo de Blattner *et al.* (1997) publicaron el genoma completo de la cepa *E. coli* K-12, (MG1655).

La comparación en 987 pb de las secuencias nucleotídicas del gen *rpoH* reportadas por Landick *et al.* (1984) y Yura *et al.* (1984), muestra cambios de 2 bases en la región reguladora y 14 bases en la codificadora, de los cuales 6 son mutaciones no sinónimas (Tabla 4).

Tabla 4. Variabilidad en la secuencia nucleotídica del gen *rpoH* en dos cepas de *E. coli* K-12.

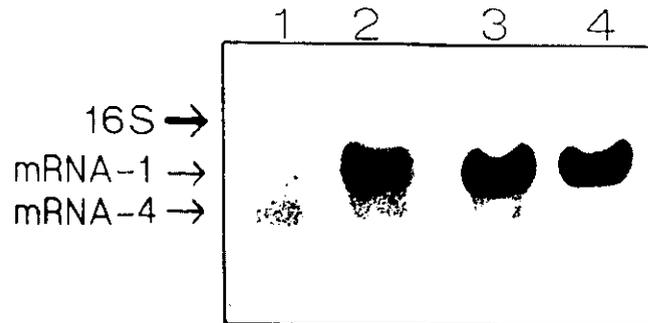
CEPA	POSICIÓN NUCLEOTÍDICA														REFERENCIA		
	-11	-1	+4	+24	+30	+42	+43	+44	+48	+315	+441	+486	+551	+552	+578	+579	
SC122	G	G	G*	G	G	A	G*	G*	A	G	A	C	G	T*	G*	C*	Landick <i>et al.</i> 1984
MC4100	A	A	A	A	A	C	A	A	G	C	C	G	T	G	C	G	Yura <i>et al.</i> 1984

\* mutaciones no sinónimas.

Por otro lado, Erickson *et al.* (1987) al identificar a los promotores de la región reguladora de *rpoH* mediante mapeo por S1, reportaron la presencia de un promotor extra. P2 es un promotor cepa específico, ya que únicamente se identificó en la cepa SC122, el sitio de inicio de la transcripción para P2 se localiza en -132, -133 pb hacia el extremo 5' del inicio de traducción de *rpoH*.

La variabilidad en el gen *rpoH* en cepas de laboratorio no solamente se observa en la secuencia nucleotídica y en el número de promotores, también se observa en la actividad relativa de los promotores. Erickson *et al.* (1987) reportaron en la cepa SC122 a 30°C una actividad mayor del P1 en relación al P4. Por otro lado, Tilly *et al.* (1986) reportaron una actividad de P1 similar al P4 en la cepa SC122 a 30°C. En nuestro laboratorio se observó que en 2 cepas de la línea K-12 presentan diferente actividad P1 y P4. En la cepa W3110, los promotores P1

y P4 tienen una actividad similar (López-Sánchez *et al.* 1997) mientras que en la cepa LE234 el P1 es más fuerte que P4 (Sebastián Poggio, resultados no publicados) (Figura 6).



**Figura 6.** RNA total de las cepas W3110 (carriles 1 y 2) y cepa LE234 (carriles 3 y 4) separados por electroforesis en geles de agarosa, transferidos a papel e hibridado con una sonda radioactiva de *rpoH*. En los carriles 1 y 3 se observa la diferente actividad en P1 y P4 en las cepas W3110 y LE234 respectivamente, crecidas en medio Luria-glucosa. En los carriles 2 y 4 se muestra la diferente actividad de P1 y P4 en las cepas crecidas en medio Luria-glucosa más 80  $\mu\text{g/ml}$  de novobiocina durante 10 min.

### 1.8 Poblaciones naturales de *E. coli*.

En la naturaleza *E. coli* se encuentra ocupando dos hábitats diferentes. Su hábitat primario es el intestino de mamíferos y aves principalmente, como hábitat secundario tiene al agua, suelo y sedimentos (Selander *et al.* 1987). En el primero alcanza densidades de  $10^6$  células por gr de colon, y en el segundo alcanza densidades de  $10^4$  células por ml de agua contaminada.

Dentro del grupo de las enterobacterias, *E. coli* ha sido utilizada como modelo para estudios de ecología y genética de poblaciones ya que es el organismo genética, bioquímica y fisiológicamente mejor conocido. Sorprendentemente, pocos son los estudios acerca de la estructura genética de cepas de *E. coli* aisladas de animales silvestres, debido a que se ha hecho mayor énfasis a estudios de cepas de laboratorio y cepas asociadas a humanos y en algunos casos a animales de zoológicos (Selander y Levin, 1980; Ochman *et al.* 1983 y Whittam *et al.* 1983), así como en cepas patógenas de humanos y

animales domésticos (Whittam *et al.* 1989). Actualmente se cuenta con colecciones de cepas que han sido recientemente aisladas de diferentes hospederos. Una de las colecciones más conocidas es la ECOR (Ochman y Selander, 1984; Selander y Levin, 1980). En México se cuenta con la colección de la Dra.V. Souza, (Instituto de Ecología, UNAM), que comprende 202 cepas provenientes de diferentes ordenes de mamíferos y aves, así como de diferentes regiones geográficas (Souza *et al.* 1999). Estos autores determinaron la diversidad genética de este cepario empleando electroforesis de isoenzimas, así como el patrón de resistencia a antibióticos. Sin embargo, no se ha profundizado en el conocimiento sobre la regulación de genes en cepas aisladas recientemente de hospederos no humanos, aisladas de diferentes regiones geográficas.

Una manera de abordar este problema es analizando la variabilidad del gen de la respuesta a estrés por calor, *rpoH*, en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos, de diferentes regiones geográficas y tipos de dietas.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Conocer la regulación de *rpoH*, gen regulador de la respuesta a estrés por calor, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes hospederos, regiones geográficas y tipos de dieta.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estimar la variabilidad de la región reguladora y codificadora del gen *rpoH* en cepas de *E. coli* aisladas recientemente de diferentes hospederos no humanos.
2. Estimar las relaciones genéticas de las diferentes cepas de *E. coli* a partir de su perfil de isoenzimas y del análisis de las secuencias nucleotídicas de la región reguladora de *rpoH*.

### III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se planteó un diseño experimental que consta de dos partes: La caracterización del cepario bacteriano y el análisis de las regiones codificadora y reguladora del gen *rpoH*.

El cepario consta de 13 cepas de *E. coli* que se aislaron de diferentes hospederos y regiones geográficas y una cepa de laboratorio W3110, *E. coli* K-12. Los hospederos corresponden a aves y mamíferos silvestres de México, Australia y Antártida.

#### 1º Caracterización del cepario.

A) Patrón de termosensibilidad: La termosensibilidad de las cepas silvestres con relación a la cepa de laboratorio *E. coli* K-12 se determinó a partir de las curvas de crecimiento de las cepas a 30°C, 42°C y 47°C. A partir de éstas, se calculó la velocidad de crecimiento para cada cepa y temperatura.

B) Electroforesis de isoenzimas: Se evaluó la diversidad genética (h) de las 14 cepas de *E. coli*, ensayándose 11 enzimas metabólicas. Los resultados se utilizaron para construir un fenograma y evaluar la relación de similitud entre estas cepas.

#### 2º Análisis de la región reguladora y codificadora del gen *rpoH*.

A) Región codificadora del gen *rpoH*: La región codificadora del gen *rpoH* de cada cepa se amplificó por PCR y se obtuvo su patrón de restricción o RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) para tres enzimas diferentes: *Bst*NI, *Hpa*II y *Hin*FI.

B) Región reguladora del gen *rpoH*: Esta región se amplificó por PCR, y se secuenció para analizar la variabilidad nucleotídica ( $\pi$ ) de las diferentes cepas. Con los resultados se construyó un fenograma evaluando relaciones de similitud entre las cepas.

---

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Obtención de las cepas.

Las cepas que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de la colección de la Dra. Valeria Souza, Laboratorio de Ecología Evolutiva Experimental del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Las cepas se aislaron de hospederos no humanos con dietas diferentes y localizados en distintas regiones geográficas. Los hospederos corresponden a dos aves y 11 mamíferos silvestres de México, Australia y Antártida. Además de las 13 cepas silvestres de *E. coli*, se utilizó una cepa de *Enterobacter cloacae* como grupo externo y una cepa *E. coli* K-12, W3110 F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> protótrofa Lac<sup>+</sup> como cepa de referencia (Tabla 5).

### 4.2 Caracterización del cepario.

#### 4.2.1 Análisis de la termosensibilidad de las cepas.

##### A) Obtención de las curvas de crecimiento.

Para determinar la termosensibilidad de las diferentes cepas de *E. coli* aisladas de distintos hospederos, se realizaron curvas de crecimiento a 30°C, 42°C y 47°C.

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

Para realizar las curvas de crecimiento, primero fue necesario ajustar la densidad celular de los precultivos a una D.O<sub>550nm</sub> de 0.6 en un espectrofotómetro (Espectronic 20D). De cada precultivo se tomaron 200 µl para inocular 10 ml de medio LB en matraces nefelométricos de 125 ml. Los matraces con las muestras bacterianas se incubaron en baños con agua y en agitación (New Brunswick

Scientific modelo G76) a 180 rpm a diferentes temperaturas, 30°C, 42°C y 47°C. La densidad óptica se midió cada 30 minutos.

Tabla 5. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

CEPAS No. REF.	HOSPEDEROS			
	ORDEN	ESPECIE	DIETA	REGIÓN GEOGRÁFICA
<i>E. coli</i> , 58	Rodentia	<i>Oryzomys sp.</i> (ratón)	Granívoro	México
<i>E. coli</i> , 65	Carnivora	<i>Panthera onca</i> (jaguar)	Carnívoro	
<i>E. coli</i> , 55	Falconiformes	<i>Aquila chrysaetos</i> (águila real)	Carnívoro	
<i>E. coli</i> , 1648	Carnivora	<i>Lynx rufus</i> (línce)	Carnívoro	
<i>E. coli</i> , 1735	Sirenia	<i>Trichechus manatus</i> (manatí)	Herbívoro	
<i>E. coli</i> , 2025	Cetacea	<i>Tursiops truncatus</i> (delfín)	Piscívoro	
<i>E. coli</i> , 2290	Monotremata	<i>Tachyglossus aculeatus</i> (equidna)	Insectívoro	Australia
<i>E. coli</i> , 3502	Monotremata	<i>Ornithorhynchus onatinus</i> (ornitorrinco)	Insectívoro	
<i>E. coli</i> , 2278	Marsupialia	<i>Phascolarctos cinereus</i> (koala)	Herbívoro	
<i>E. coli</i> , 2279	Marsupialia	<i>Cercartetus concinnus</i> (posum australiano)	Omnívoro	
<i>E. coli</i> , 3887	Sphensciformes	<i>Pygoscelis antarctica</i> (pingüino)	Piscívoro	Antártida
<i>E. coli</i> , 3909	Carnivora	<i>Arctocephalus gazella</i> (lobo marino)	Piscívoro	
<i>E. coli</i> , 4232	Cetacea	<i>Balaenoptera physalus</i> (ballena)	Invertebrados	
<i>E. coli</i> K-12 (W3110) Cepa de laboratorio	Primates	<i>Homo sapiens</i> (humano)	Omnívoro	-----
<i>Enterobacter cloacae</i> , 85 (grupo externo)	Chiroptera	<i>Myotis velifer</i> (murciélago)	Insectívoro	México

**B) Determinación de la velocidad de crecimiento de las cepas de *E. coli* a diferentes temperaturas.**

Se evaluó la velocidad de crecimiento a 30°C, 42°C y 47°C, de las diferentes cepas en la fase exponencial del cultivo que va del minuto 60 al 120.

La fase de inicio del crecimiento y la entrada a la fase estacionaria se eliminaron para realizar los cálculos. La velocidad de crecimiento se determinó con la ecuación [4].

El crecimiento bacteriano se representa por la siguiente ecuación:

$$N = N_0 e^{kt} \quad [1]$$

Aplicando logaritmo:

$$\log N = \log N_0 + kt \log e \quad [2]$$

Despejando:

$$k \log e = \frac{\log N - \log N_0}{t} \quad [3]$$

Si:

$k \log e = K$ , donde  $K$  representa la velocidad de crecimiento;  $N = DO_f$  Unidades de Densidad Óptica final a 550 nm (tiempo  $t_f$ );  $N_0 = DO_i$  Unidades de Densidad Óptica inicial a 550 nm (tiempo  $t_i$ ).

Sustituyendo en [3]

$$K = \frac{\log DO_f - \log DO_i}{t_f - t_i} \quad [4]$$

### C) Análisis estadístico.

Para verificar si existe diferencia significativa entre el crecimiento de las 14 cepas ensayadas, se realizó un análisis de varianza no paramétrico de comparación de medianas, Kruskal-Wallis. Este método fue utilizado debido a que los datos de crecimiento de las cepas no presentan una distribución normal. El análisis se realizó para las diferentes temperaturas de crecimiento 30°C, 42°C y 47°C.

#### **4.2.2 Determinación de zimogramas y análisis de la variabilidad genética.**

La técnica de electroforesis de isoenzimas (MLEE) ha sido ampliamente utilizada en poblaciones bacterianas, llegando a convertirse en una de las mejores herramientas para explorar la diversidad genética en procariontes. Esta técnica permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y el grado de similitud genética (Selander *et al.* 1986). El fundamento de la técnica de isoenzimas está basado en la movilidad relativa de las proteínas la cual depende de su carga electrostática neta y de su peso molecular.

##### **A) Obtención de lisados celulares.**

Las cepas silvestres se obtuvieron de cultivos celulares conservados a -80°C en glicerol al 20%. Las cepas se sembraron directamente en medio sólido MacConkey y se incubaron durante 24 hrs a 37°C. Del medio sólido se tomó una colonia, se resembró en 30 ml de medio de cultivo DM 1000 (medio mínimo) (ver Apéndice II) y se incubó a 37°C por 24 horas. El cultivo se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min. La pastilla celular se lavó con 1 ml de MgSO<sub>4</sub> (10 mM), se agregaron 70 µl de lisozima y 0.5 ml. de buffer Tris-HCl (pH 8.0). Las muestras se congelaron a -80°C por 10 min y se descongelaron, para lisar las células. El lisado se purificó centrifugando las muestras a 10,000 rpm por 5 min y se conservó en alícuotas de 100 µl a -80°C hasta el momento de ser utilizadas (Hebert y Beaton, 1993).

##### **B) Separación electroforética de las proteínas celulares y obtención de los zimogramas.**

Los lisados se colocaron en geles de acetato de celulosa que se incubaron previamente por 20 min en buffer Tris-Glicina (TG) según la técnica descrita por Hebert y Beaton (1993). El gel con las muestras se colocó en la cámara de electroforesis cerrando el circuito con dos tiras de papel filtro para unir el gel con el buffer. La cámara se conectó a una fuente de poder y las muestras se corrieron del cátodo al ánodo a corriente constante (200 Volts) durante 20 min.

Posteriormente los geles se tiñeron con los substratos específicos para las 11 enzimas ensayadas. Las enzimas empleadas fueron las siguientes: IDH (isocitrato deshidrogenasa), PGM (fosfoglucomutasa), PEP (peptidasa), XDH (xantina deshidrogenasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), G6H (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) MDH (malato deshidrogenasa), MPI (manosa-6-fosfato isomerasa), ME (enzima málica), AK (adenilato cinasa) y ARK (arginina cinasa). Para la tinción de las enzimas, el gel se colocó en un vidrio y se vació sobre el gel la mezcla de tinción (ver Apéndice II). Los geles se incubaron en ausencia de luz durante la tinción. Una vez teñidos se enjuagaron con agua corriente y se realizó su lectura.

A partir de los resultados de la electroforesis se obtuvieron los zimogramas correspondientes a cada enzima ensayada. Las diferentes bandas obtenidas se numeran en orden ascendente según su posición en relación a la dirección de migración de las proteínas de polo negativo a polo positivo. Cada banda o electromorfo se consideró como un alelo del gen estructural correspondiente a un locus.

Cada cepa se caracterizó finalmente por la combinación de los electromorfos de las 11 enzimas ensayadas. Así, los distintos perfiles de electromorfos en la muestra total corresponden a genotipos multiloci únicos comúnmente denominados electrotipos (ET's) (Selander *et al.* 1986; Harrison *et al.* 1989). A cada electrotipo se le asignó un número de registro, con el cual se le identificó en relación a los otros electrotipos de la muestra total.

### **C) Análisis de la variabilidad genética de las cepas.**

A partir de los electrotipos se obtuvieron las frecuencias alélicas y con ellas se calculó la diversidad genética de la población total. Para ello se utilizó el programa ETDIV y ETCLUS (Whittam, 1990). La diversidad genética (h) se considera como la heterosis promedio de varios loci en una población. La diversidad genética se calcula como:

$$h = 1 - \sum x_i^2 / (n-1) \quad [5]$$

Donde:

$h$  es la probabilidad de que dos cepas tomadas al azar de una población sean diferentes en un loci dado;  $x_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo de un locus y  $n$  es el número total de electrotipos (ET's).

Para estimar las relaciones fenéticas, se construyó una matriz de distancia genética basada en la proporción de loci diferentes entre pares de ET's, usando el programa ETDIV (Whittam, 1990). Los alelos nulos (no presentes en todas las cepas) fueron designados con valor cero y excluidos en el cálculo de matriz de distancia.

Sobre la matriz de distancia generada se usó el programa ETCLUS (Whittam, 1990), para la construcción del fenograma con el método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Además de los ET's de las muestras, en este análisis se incluyó una cepa de *E. cloacae* como grupo externo, para dar raíz al árbol generado.

### 4.3 Análisis de la región codificadora del gen *rpoH* de *E. coli*.

#### 4.3.1 Purificación del DNA cromosomal.

Los cultivos bacterianos se obtuvieron a partir de un precultivo fresco. Este cultivo se preparó por inoculación de la cepa en un frasco con 3 ml de medio LB, el cual se incubó sin agitación a 30°C durante 18 horas. En matraces nefelométricos de 125 ml se colocaron 50 ml de medio LB y se añadió 0.5 ml del precultivo. Los matraces se incubaron en un baño (New Brunswick Scientific modelo G76) con agua a 30°C y en agitación a 180 rpm por aproximadamente 4 hrs. Las células se cosecharon a una densidad óptica  $D.O_{550nm}$  de 0.8 a 1.0, que equivale a  $1 \times 10^9$  células/ml. El cultivo se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min. La pastilla celular se resuspendió en 10 ml de buffer TE (Tris-HCl 25 mM pH 8.0,

EDTA 1mM) con lisozima (10 mg/ml concentración final), se incubó a 30°C durante 15 min, y las células se lisaron con SDS al 2.0% concentración final. El lisado se mezcló suavemente con 1 volumen de fenol equilibrado a pH 8.0 y en presencia de NaCl 0.33 M concentración final, se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min y se colectó la fase acuosa superior. Posteriormente se adicionó un volumen de fenol-cloroformo (1:1), se agitó suavemente durante 10 min, se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min y se recuperó la fase superior. Finalmente se adicionó 1 volumen de cloroformo agitándose suavemente por 10 min, y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. El DNA genómico se precipitó con un volumen de isopropanol y el DNA se recuperó en forma de fibras con una varilla de vidrio de la zona de interfase. El DNA se lavó con etanol frío al 70% y se resuspendió en 1 ml de buffer TE. El DNA se incubó con RNAsa (20 µl/ml de una solución de RNAsa 10 mg/ml) en buffer TE a 50-55°C por 1 h, se añadió proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó a 37°C por 1 h. Esta solución se llevó a un volumen de 5 ml con buffer TE. Posteriormente se realizó una re-extracción en un volumen 1:1 de fenol-cloroformo y se recuperó el DNA como ya se mencionó.

#### 4.3.2 Amplificación de la región codificadora del gen *rpoH* por PCR.

Para la amplificación específica de la región codificadora del gen *rpoH* a partir de DNA genómico se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores con base a la secuencia reportada por Sofia *et al.* (1994), número de acceso U00039 del GenBank para *E. coli* K-12 (MG1655). Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Oligo Ver. 4.1 para PC. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GIBCO-BRL Life Technologies y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Los oligonucleótidos diseñados son los siguientes:

NOMBRE	SECUENCIA	Tm
COD1 (Sentido)	GGC ACA GTT GTT GCT ACC AC	62° C
COD2 (Antisentido)	AAA AAC CCC GGA CTC TCA TC	60° C

Las condiciones de amplificación fueron: 100 ng de DNA genómico; 20 mM Tris-HCl, (pH 8.4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 pmolas de cada oligonucleótido; 50 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP); 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa (GIBCO-BRL Life Technologies) y agua estéril (Pisa), para un volumen final de 100 µl de reacción. El programa de amplificación se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. El programa de amplificación fue el siguiente:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95° C	2 minutos
Desnaturalización	95° C	30 seg
Alineamiento	60° C	30 seg
Extensión	72° C	30 seg
Extensión final	72° C	10 minutos

Los 100 µl de reacción se dividieron en 4 tubos MicroAmp (Perkin-Elmer) dejando un tubo como testigo negativo (sin DNA). La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin-Elmer 9600).

De la reacción de amplificación se tomaron 3 µl y se adicionaron 2 µl de colorante guía para electroforesis (ver Apéndice II). La muestra se corrió en un gel de agarosa 1% en buffer TBE 1X y se verificó que el fragmento amplificado presentara el tamaño esperado de 956 pb (incluyendo los oligonucleótidos). Se utilizaron como marcadores de peso molecular fragmentos de DNA con incrementos de 100 pb, desde 100 hasta 2500 pb (Boehringer Mannheim). Posteriormente los productos de PCR se purificaron pasándolos por las columnas Centricon 100 (Amicon), siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 4.3.3 Ensayos de restricción (RFLP's) de la región codificadora de *rpoH*.

EL método RFLP's, permite identificar la variación del DNA entre poblaciones e individuos. Para esto se obtiene el patrón de digestión con varias endonucleasas de una región determinada del genoma. La inserción o delección de

una base en el sitio específico de corte de la enzima induce cambios en el patrón de restricción, los cuales se utilizan para evaluar la variabilidad en las secuencias.

La selección de las enzimas se hizo de acuerdo a los sitios de restricción presentes en la secuencia del gen *rpoH* de la cepa de *E. coli* K-12 (MG1655) reportada por Sofia *et al.* (1994). Para identificar los sitios de corte de las diferentes enzimas, se utilizó el programa PC/GENE Ver. 6.85 para PC. De una matriz de 181 enzimas se eligieron 3 por ser las enzimas que presentaban mayor número de sitios de corte y por generar fragmentos mayores a 50 pares de bases, ya que los fragmentos de menos de 50 pb no se visualizan fácilmente con protocolos ordinarios de tinción (bromuro de etidio). Las enzimas de restricción que se eligieron para digerir la región codificadora del gen *rpoH* son: *HinfI* (GIBCO-BRL), *BstNI* (Biolabs) y *HpaII*(GIBCO-BRL) (Figura 7). La digestión se realizó bajo las indicaciones del proveedor.

Las digestiones se corrieron en geles de acrilamida para DNA al 7%. Los geles de acrilamida se prepararon como sigue: 7.5 ml de una solución de acrilamida (29.2%) y bis-acrilamida (0.8%), 6.0 ml de buffer boratos (TBE 5X), agua desionizada 16.4 ml, 160  $\mu$ l de persulfato de amonio (10%) y 17  $\mu$ l de TEMED (todos los reactivos se obtuvieron de BIO-RAD), para un volumen final de 30.23 ml. A cada muestra de DNA se le agregó colorante guía para su electroforesis y como marcadores de peso molecular se utilizaron fragmentos de DNA con incrementos de 100 pb, desde 100 hasta 2500 pb (Boehringer Mannheim). Las muestras se corrieron a 80 Volts en un buffer TBE 1X durante 3 hrs. Posteriormente el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (1.25  $\mu$ g/ml) durante 5 min.

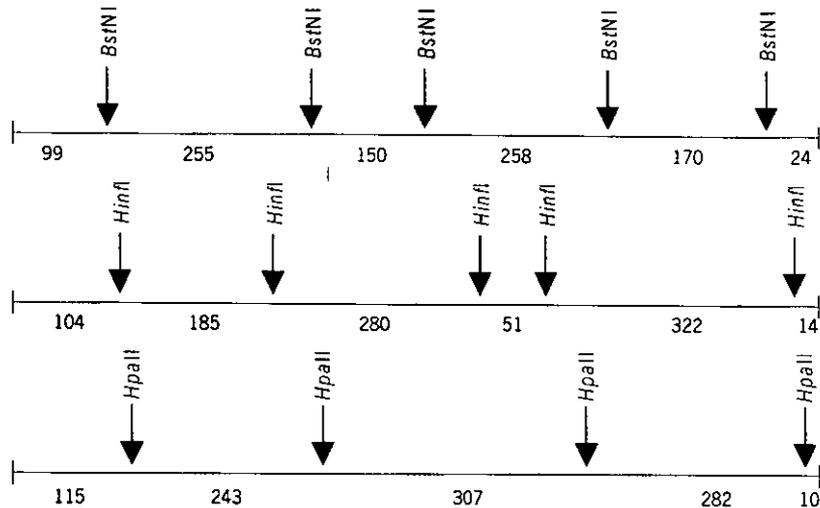


Figura 7. Enzimas de restricción ensayadas sobre la región codificadora del gen *rpoH* de *E. coli* tomadas a partir de la secuencia de la cepa MG1655 reportada por Sofia *et al.* (1994). Los números indican el tamaño en pb de cada fragmento.

#### 4.4 Análisis de la región reguladora del gen *rpoH* de *E. coli*.

##### 4.4.1 Amplificación de la región reguladora del gen *rpoH* por PCR.

Para la amplificación específica de la región reguladora del gen *rpoH* a partir de DNA genómico, se diseñaron los oligonucleótidos con base a la secuencia reportada por Sofia *et al.* (1994), número de acceso U00039 del GenBank para *E. coli* K-12. Los oligonucleótidos se diseñaron con ayuda del programa Oligo Ver. 4.1 para PC. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por GIBCO-BRL Life Technologies y se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Los Oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes:

NOMBRE	SECUENCIA	Tm
REG1 (Sentido)	CCT GCT ATT GCT GCT GGT AT	60°C
REG2 (Antisentido)	CAG TCA TTC AAA TCC TCT CA	56°C

Las condiciones de amplificación fueron: 100 ng de DNA genómico; 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 pmolas de cada oligonucleótido; 50 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa

(GIBCO-BRL, Life Technologies) y agua estéril (Pisa), en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  por reacción. El programa de amplificación se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** El programa de amplificación fue el siguiente:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95° C	2 minutos	
Desnaturalización	95° C	30 seg	30 ciclos
Alineamiento	58° C	30 seg	
Extensión	72° C	30 seg	
Extensión final	72° C	10 minutos	

Los 100  $\mu\text{l}$  de reacción se dividieron en 4 tubos MicroAmp (Perkin-Elmer) dejando un tubo como testigo negativo (sin DNA). La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin-Elmer 9600).

Para verificar la presencia del fragmento de DNA amplificado (342 pb incluyendo a los oligonucleótidos iniciadores) en la mezcla de reacción, se tomaron 3  $\mu\text{l}$  y se le adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de colorante guía para electroforesis. El DNA se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y se visualizó con bromuro de etidio como se describió anteriormente.

#### 4.4.2 Clonación del producto de PCR.

Los productos amplificados de la región reguladora del gen *rpoH* de las cepas 3502, 65, 55, 2278 y 2290 (Tabla 5), se purificaron para su posterior clonación con columnas Centri-Sep (Princeton), siguiendo las indicaciones del proveedor.

La clonación del producto de PCR se llevó a cabo en el vector de expresión pMOS*Blue* (Amersham Life Science) usando las condiciones descritas por el proveedor. El vector de expresión tiene una timina no apareada en sus

extremos 5', mientras que los productos de PCR presentan una adenina no apareada en sus extremos 3'.

Las células competentes MOS (Amersham Life Science) se transformaron con los plásmidos recombinantes siguiendo las indicaciones del proveedor. La mezcla de transformación se sembró en cajas con ampicilina (50 µg/ml), tetraciclina (15 µg/ml), IPTG (476 µg/ml) y X-Gal (1.7 mg/ml), seleccionando a las células con inserto como colonia blancas (colonias positivas). La presencia de la región reguladora de *rpoH* en los plásmidos presentes en estas colonias se verificó como se describe a continuación.

#### **4.4.3 Obtención y purificación de plásmidos con la región reguladora de *rpoH*.**

Los plásmidos se obtuvieron a partir de lisados alcalinos celulares siguiendo la técnica de Sambrook *et al.* (1989).

Para verificar que los plásmidos contenían a la región reguladora de *rpoH*, se realizaron dobles digestiones de los plásmidos con las enzimas *HindIII-EcoRI* y *PstI-EcoRI* (GIBCO-BRL). Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X se utilizaron como marcadores de peso molecular fragmentos de DNA con incrementos de 100 pb, desde 100 hasta 2500 pb (Boehringer Mannheim).

#### **4.4.4 Secuenciación nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH*.**

Las clonas obtenidas se secuenciaron en una sola cadena, usando el método de terminación con dideoxinucleótidos (Sanger, 1980). La secuencia se llevó a cabo usando la enzima Termosecuensasa (Amersham Life Science) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Los componentes de la reacción fueron las siguientes: 5 µl de agua estéril; 100 ng de DNA templado, 29.7 mM de amortiguador Tris-HCl, (pH9.5); 0.5 pmolas/µl de oligonucleótido universal (5'CAAAGGGTCAGTGCTGCAACAT3'); 0.17 µM

de 7-deaza-dGTP; 0.17 $\mu$ M de dCTP; 5  $\mu$ Ci/ $\mu$ l de [ $^{32}$ -P] dATP y 8 unidades/ $\mu$ l de DNA polimerasa termosecuensasa, en un volumen final de 17.5  $\mu$ l.

Las condiciones de marcaje del oligonucleótido universal fueron las siguientes: 45 ciclos de 95° C, 15 seg para desnaturalizar y 50°C, 30 seg para alineamiento y elongación. Para reacción de secuenciación se tomaron 4 alícuotas de 3.5  $\mu$ l de la reacción anterior, a cada tubo se adicionó 0.8  $\mu$ M de un solo ddNTP más 80  $\mu$ M de los dNTPs. La reacción se realizó en 30 ciclos de 95°C, 30 seg; 72°C 60 seg. Finalmente a cada tubo se adicionó 4  $\mu$ l de solución de bloqueo de la reacción (95% de formamida, 20 mM EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilencianol) está se guardó a -20°C, hasta su separación por electroforesis en geles de acrilamida.

El gel de secuencia contiene: urea (42%), acrilamida (5.7%), bis-acrilamida (0.3%), buffer TBE 1X, persulfato de amonio (1%) y 36  $\mu$ l de TEMED (todos los reactivos son BIO-RAD). Las muestras se corrieron a 30 Watts constantes a 50°C aproximadamente. Se realizaron 3 corridas de aproximadamente 1:30 hrs cada una. El gel se expuso a una placa de rayos X. Finalmente se realizó la lectura de la autoradiografía.

#### 4.4.5 Secuenciación automatizada.

Los productos amplificados por PCR (342 pb) de las cepas 4232, 3090, 2025, 2278, 3887, 2279, 1735, 1648 y 58 (Tabla 5) se purificaron empleando las columnas QIAquick PCR (QIAGEN), con la finalidad de eliminar sales, *Taq* polimerasa, DNA genómico, y fragmentos de amplificación menores a 100 pb. El DNA puro se cuantificó a partir de las unidades de D.O 260 nm utilizando el espectofotómetro UV160U (Shimadzu). También se obtuvo la relación de D.O 260nm 280nm para verificar la pureza del DNA.

Los productos purificados se enviaron para su secuenciación automatizada a la compañía DNA Sequencing Service Request. Biochemistry Dept., Rm 649, Bottereli Hall, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.

#### 4.4.6 Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas.

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa Clustal V. Ver. 7.0 para PC (Thompson *et al.* 1994). El alineamiento es un punto crucial en el análisis de secuencias, ya que es en este momento donde se postulan hipótesis de homologías entre las secuencias de las diferentes cepas. Para obtener la variabilidad nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH* las secuencias fueron analizadas con el Programa Arlequín Ver. 1.1 para PC (Schneider *et al.* 1997).

La estimación de la variabilidad nucleotídica ( $\pi$ ), se realizó sobre los 272 pb hacia el extremo 5' del primer codón de inicio de transcripción, hasta cubrir la región -35 del promotor distal P1 de *rpoH*. La diversidad nucleotídica se calcula como:

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} P_i P_j d_{ij}}{L} \quad [6]$$

Donde:

$\pi$ , es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes;  $d_{ij}$  es el estimado del número de mutaciones entre el haplotipo  $i$  y  $j$ ;  $k$ , es el número de haplotipos;  $P_i$ , es la frecuencia del haplotipo  $i$ ;  $P_j$ , es la frecuencia de haplotipo  $j$  y  $L$ , es el número de loci (nucleótidos) en los haplotipos analizados.

Se generó una matriz de distancia genética empleando el modelo de 2 parámetros de Kimura (1980), y posteriormente se construyó un fenograma que representa las similitudes de las secuencias nucleotídicas de la región reguladora del gen *rpoH* en las diferentes cepas de *E. coli*. La cepa de *Enterobacter cloacae* aislada de murciélago se utilizó como grupo externo. Para este análisis se utilizó el programa Phylip (Phylogeny Inference Package) Ver. 3.57c para PC (Felsenstein, 1993).

---

## V. RESULTADOS

### 5.1. Termosensibilidad de las cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos.

Para estudiar si las 14 cepas de *E. coli* seleccionadas en este trabajo presentan una termosensibilidad similar o diferente, se realizó un único estudio preliminar en el cual se realizaron curvas de crecimiento a diferentes temperaturas: 30°C, 42°C y 47°C. Posteriormente se calculó la velocidad de crecimiento de estas cepas. Este estudio permite conocer de manera general si existen diferencias importantes en la termosensibilidad de las cepas. Sin embargo, no permite predecir con exactitud el comportamiento de las cepas en experimentos de competencia a diferentes temperaturas o la capacidad de cada cepa para adaptarse a un cambio brusco de temperatura.

Las curvas de crecimiento a 30°C, 42°C y 47°C para todas las cepas y las velocidades de crecimiento para algunas de ellas se incluyen en el Apéndice I. En las condiciones experimentales utilizadas, a 30°C las cepas entraron a la fase estacionaria después de aproximadamente 6 hrs, a 42°C después de 4:30 hrs y a 47°C después de 5:30 hrs.

A 30°C y 42°C las cepas muestran curvas de crecimiento similares, mientras que a 47°C las curvas son más heterogéneas. En estas curvas, la cepa de laboratorio K-12 W3110 muestra un periodo lag más largo, sin embargo, su velocidad de crecimiento en la fase exponencial es similar a la de las otras cepas.

A 30°C, la cepa que mostró un crecimiento aparente más rápido y que presentó una densidad óptica (D.O) mayor en la fase estacionaria fue la *E. coli* aislada del equidna (hospedero insectívoro de Australia, del orden monotremata).

A 42°C las cepas con un crecimiento aparente más rápido y que mostraron la D.O mayor en esta fase fueron la cepa aislada del jaguar (hospedero carnívoro de México del orden carnívora).

---

A 47°C, como ya se mencionó, las curvas de crecimiento presentaron una diferencia mayor entre sí, con respecto a las temperaturas anteriores. La cepa con un crecimiento aparente más lento fue la aislada del lobo marino (hospedero piscívoro de la Antártida del orden carnívora), mientras que la cepa del jaguar (hospedero carnívoro de México del orden carnívora) aparentemente creció más rápido.

La velocidad de crecimiento se calculó como se describe en Materiales y Métodos. Para cada temperatura se seleccionaron aquellas cepas que mostraron el crecimiento aparente más rápido y más lento, ya que el resto de las cepas se encuentra entre este intervalo, analizando únicamente la fase exponencial de crecimiento que va de 60 a 120 min..

A 30°C la velocidad de crecimiento de la cepa de laboratorio W3110 (humano) fue de  $K=0.014/\text{min}$ , y la de equidna  $K=0.010/\text{min}$ . A 42°C la cepa de laboratorio mostró una  $K$  de  $0.021/\text{min}$  y la de jaguar  $K=0.012/\text{min}$ . Esto muestra que las diferencias que se observan en las curvas de crecimiento de la cepa de laboratorio y la de equidna y jaguar se debe principalmente a una fase lag más prolongada en la cepa de laboratorio y no a una diferencia en la velocidad de crecimiento de esta cepa.

A 47°C la velocidad de crecimiento de la cepa de lobo marino es de  $K=0.018/\text{min}$  y la de jaguar de  $K=0.016$ . Nuevamente en este caso las diferencias que se observan en las curvas de crecimiento correspondientes obedecen principalmente a diferencias en la fase lag y no en la velocidad de crecimiento de las cepas.

Estas diferencias en el periodo lag pueden obedecer a varios factores. El inóculo inicial se realizó a partir de cultivos de una noche con una D.O igual, de manera que en el caso de cepas con células de tamaño diferente, esta D.O puede corresponder a un número de células diferente. Por otra parte, es posible que existan diferencias entre las cepas en cuanto a su capacidad de adaptarse al

cambio de temperatura de 30°C, del cultivo de una noche utilizado para el inóculo a la temperatura a la que se realizó la curva de crecimiento: 30°C, 42°C y 47°C.

El análisis de varianza Kruskal-Wallis, arrojó los siguientes resultados:

	$\chi^2$	Grados de libertad	P
30°C	4.5263	13	0.9842
42°C	3.9941	13	0.9913
47°C	11.1125	13	0.6014

$\chi^2_{0.05, 13}=22.362$  por lo tanto valores  $\chi^2 < 22.362$  indican que se acepta  $H_0$ .

Los valores obtenidos con el análisis de varianza Kruskal-Wallis muestran valores altos de P, esto indican que no existe diferencia significativa en el crecimiento de las cepas a 30°C, 42°C y 47°C.

Los resultados de este estudio muestran que las cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos y regiones geográficas distintas y la cepa de laboratorio K-12 aislada de humanos, presentan bajo las condiciones experimentales utilizadas, una termosensibilidad relativamente similar.

## 5.2 Variabilidad genética de las cepas de *E. coli* aisladas de distintos hospederos.

Para determinar la variabilidad genética de las 14 cepas de *E. coli* aisladas de distintos hospederos, se obtuvieron los patrones de movilidad electroforética de 11 enzimas metabólicas. El análisis de la matriz (Tabla 10), en la que se representan los patrones o electrotipos (ETs) para cada cepa, permite calcular la variabilidad genética de las cepas. Este método se utiliza frecuentemente para estimar este parámetro entre cepas bacterianas del mismo género y especie.

Las 11 enzimas utilizadas en este trabajo presentaron un total de 13 loci polimórficos, con un promedio de 3.1 alelos por locus (Tabla 11).

Las enzimas MDH y ARK mostraron dos loci cada una, mientras que el resto de las enzimas mostraron uno. Ya que las bacterias son organismos haploides y presentan generalmente una copia de cada locus en su genoma, la presencia de dos bandas para una misma enzima, se toma como el equivalente de dos loci para esa enzima. Los dos loci para MDH se denominaron MH1 y MH2, y para ARK, AR1 y AR2. El locus MH2 fue el más polimórfico con 5 alelos, en tanto que G6H fue monomórfico (Tabla 11).

El análisis de los perfiles electroforéticos de las 11 enzimas (13 loci) en las 14 cepas de *E. coli*, mostró la presencia de 13 diferentes electrotipos (Ets), ya que únicamente dos cepas la 2279 y la 2278, mostraron el mismo perfil (Tabla 6).

**Tabla 10.** Matriz de perfiles electroforéticos de 14 cepas de *E. coli* y una cepa de *E. cloacae* (grupo externo) para 11 enzimas metabólicas (13 loci). Los diferentes números representan distintos alelos (la numeración es arbitraria)

CEPAS NO.REF.	IDH	PGM	PEP	XDH	ADH	G6H	MH1	MH2	MPI	ME	AK	AR1	AR2
58	4	3	2	3	3	1	3	2	3	3	1	1	3
65	2	3	3	3	3	1	2	2	2	2	1	2	2
1735	2	4	3	0	0	1	3	0	3	3	0	2	0
2025	2	3	5	5	5	1	3	4	4	3	2	2	4
55	2	3	3	3	3	1	1	3	2	1	1	2	2
1648	2	3	3	1	2	1	3	0	3	3	0	1	0
2290	2	3	2	3	3	1	3	2	1	3	1	2	2
3502	2	3	2	3	3	1	3	2	4	3	1	2	2
3887	2	3	3	3	3	1	3	2	3	3	1	1	2
3909	2	3	3	0	0	1	3	1	3	3	0	2	0
4232	4	3	2	0	0	1	3	0	2	3	0	2	0
2278*	2	3	3	3	3	1	3	2	3	3	1	2	2
2279*	2	3	3	3	3	1	3	2	3	3	1	2	2
W3110	4	4	2	0	0	1	3	0	3	3	0	2	0
<i>E. cloacae</i>													
85	5	5	1	1	2	2	3	1	5	0	0	3	1

\* Cepas con el mismo ET.

**Tabla 11.** Número de alelos y diversidad genética para cada uno de los 13 loci de 11 enzimas analizadas en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos.

Locus	Número de alelos	Diversidad genética (h)
IDH	2	0.385
PGM	2	0.282
PEP	3	0.603
XDH	4	0.654
ADH	4	0.654
G6H	1	0.000
MH1	3	0.295
MH2	5	0.731
MPI	4	0.679
ME	3	0.295
AK	3	0.603
AR1	2	0.385
AR2	4	0.679
<b>Promedio</b>	<b>3.1</b>	<b>0.480</b>

El índice de diversidad genética promedio se calculó con los datos representados en esta matriz como se describe en Materiales y Métodos. El valor promedio de  $h$ , para las 14 cepas de *E. coli* fue de  $h = 0.48$ .

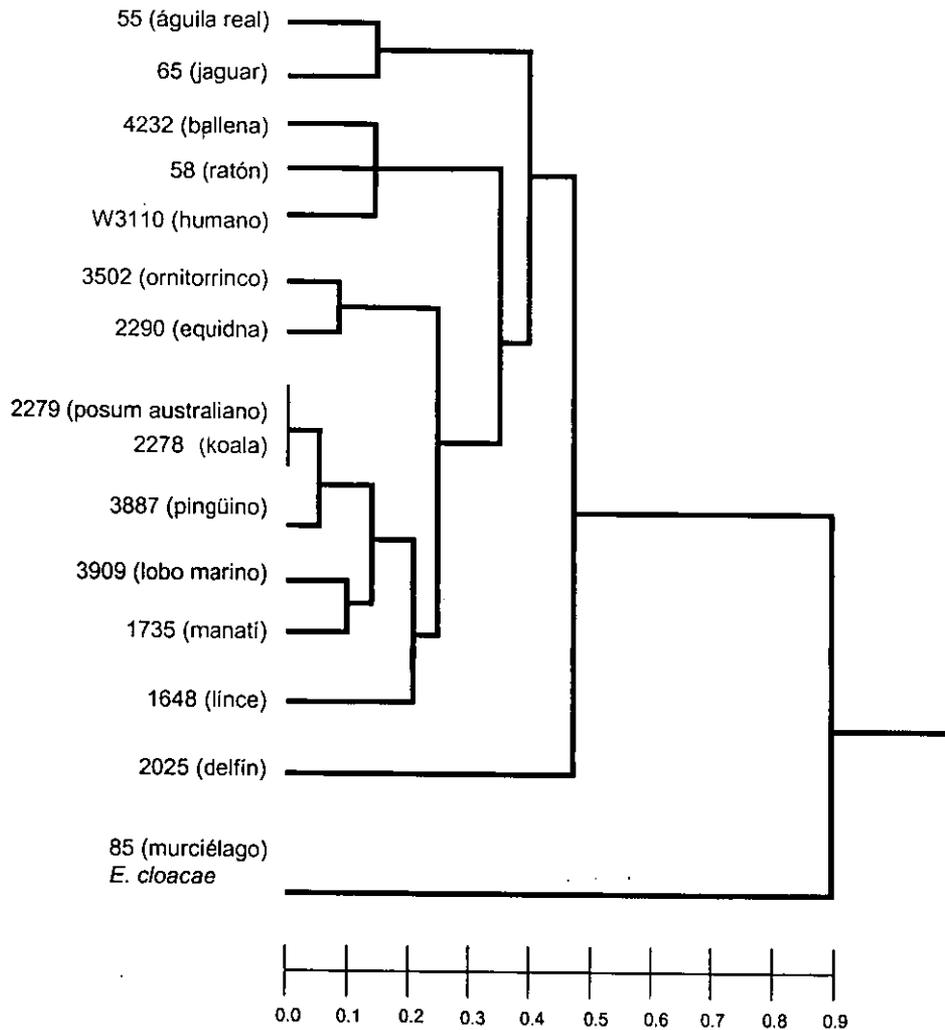
Los valores que puede tomar  $h$  son entre 0.0 a 1.0. Un valor de 0.0 implica variabilidad genética nula y una  $h$  de 1.0 representa variabilidad genética máxima, donde todas las cepas de una población presentan distintos alelos para todos los loci.

Con las frecuencias alélicas se generó una matriz de distancia y después un fenograma (Figura 8), en el cual se incluye a la cepa *E. cloacae* como grupo externo. En el fenograma obtenido con el método UPGMA se observa que la cepa de laboratorio aislada de humano *E. coli* K-12 (W3110) se encuentra en el mismo grupo que la cepa aislada del ratón de México y la cepa aislada de ballena de la Antártida, hospederos de orden y dieta diferente. Estas tres cepas provienen de

---

mamíferos. Las cepas aisladas del posum australiano y del koala, dos hospederos de la misma región geográfica (Australia), ambos del orden marsupialia, pero de diferente tipo de dieta, se localizan en el mismo grupo. Por otra parte, las cepas aisladas de ornitorrinco y de equidna, dos hospederos que pertenecen a los dos únicos géneros actuales del orden monotremata de Australia, forman otro grupo. Las cepas aisladas del águila real y del jaguar, dos hospederos carnívoros de la misma región geográfica (México), también forman un grupo. En otro grupo se encuentran las cepas aisladas del lobo marino y del manatí, dos hospederos mamíferos acuáticos de diferente región geográfica (Antártida y México), orden y tipo de dieta. Sin embargo, las cepas aisladas de dos mamíferos marinos, el delfín y la ballena, se encuentran en grupos diferentes, así como las 2 aves, águila real y pingüino comparten grupos diferentes. Finalmente en el último grupo se encuentra la cepa aislada del murciélago que corresponde a *E. cloacae*, cepa utilizada como grupo externo.

Los resultados del análisis de los perfiles electroforéticos o zimogramas de las 14 cepas de *E. coli* muestran una diversidad genética similar a la reportada para otros ceparios de *E. coli* (Ochman y Selander, 1984; Selander *et al.* 1987). Por otra parte, el fenograma no muestra un agrupamiento de cepas que correlacione de manera clara con el origen geográfico de los hospederos, orden y su tipo de dieta.



**Figura 8.** Fenograma de 14 cepas de *E. coli* y una cepa de *E. cloacae* (grupo externo) aisladas de diferentes hospederos. El fenograma se obtuvo a partir de las frecuencias alélicas para estas cepas (tabla 11) con el método UPGMA. La distancia genética se calculó a partir de la proporción de loci diferentes entre pares de ET's, usando el programa ETDIV (Whittam, 1990).

### 5.3 Análisis del patrón de restricción de la región codificadora del gen *rpoH* de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos

Para determinar el grado de polimorfismo de la región codificadora del gen *rpoH* de las 14 cepas de *E. coli*, se analizaron los patrones de restricción para 3 enzimas de esta región. El análisis del número de fragmentos de restricción y de su movilidad electroforética permite estimar el grado de polimorfismo de una región determinada de DNA. Este método se denomina RFLPs.

---

Para este estudio se utilizaron las enzimas *Bst*NI, *Hin*fl y *Hpa*II. Los sitios de corte para estas enzimas son:

*Bst*NI \*CC(A/T)GG

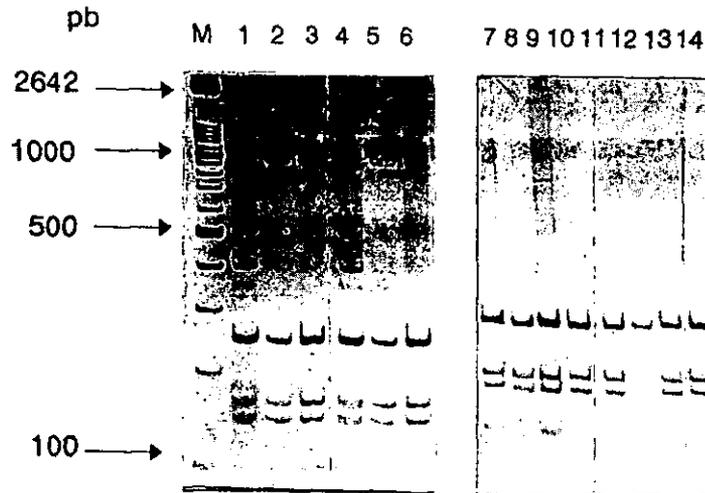
*Hin*fl G\*ANTC

*Hpa*II C\*CGG

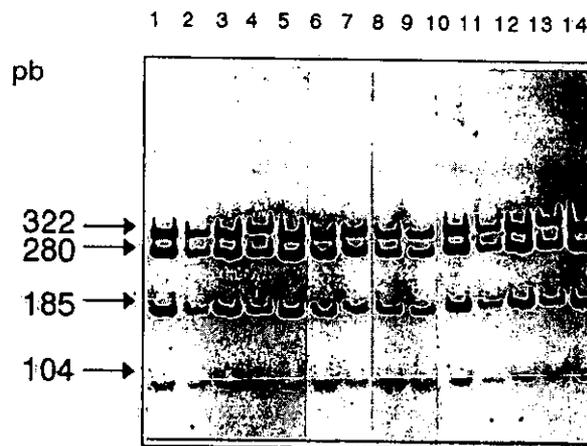
El asterisco representa el sitio de corte de la secuencia.

*Bst*NI, *Hin*fl y *Hpa*II permitieron identificar 4, 4 y 3 bandas respectivamente con la misma movilidad electroforética (Figura 9, 10, 11) En el caso de *Bst*NI y *Hpa*II la banda 1 presenta 2 fragmentos de peso molecular similar. El tamaño de cada fragmento se encuentra ilustrado en la Figura 7.

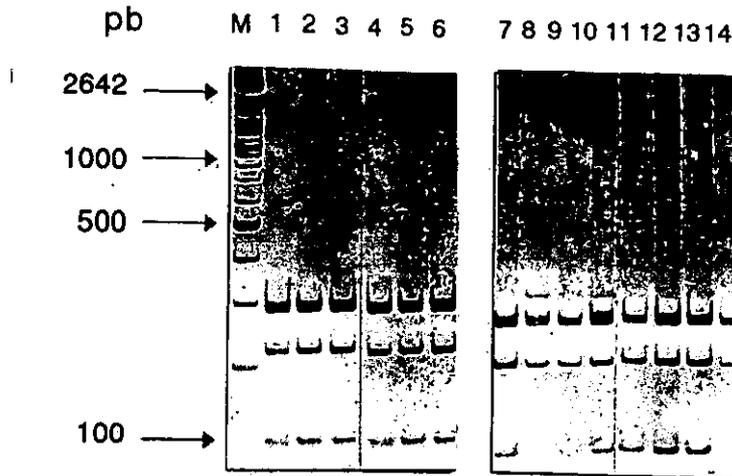
Estos resultados nos muestran que la región codificadora del gen *rpoH* no es polimórfica para los sitios de restricción evaluados. Las bases nucleotídicas directamente evaluadas con estas 3 enzimas son 66 de un total de 956 pb, lo que corresponde a un análisis de aproximadamente 7% del total de las bases de esta región. Sin embargo, el que los tamaños de los fragmentos sean los mismos en todas las cepas, agrega un factor adicional importante de similitud.



**Figura 9.** Patrón de restricción con la enzima *Bst*NI de la región codificadora del gen *rpoH*, de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, cepa 55 (águila real); 2, cepa 58 (ratón); 3, cepa 65 (jaguar); 4, cepa 1648 (lince); 5, cepa 1735 (manatí); 6, cepa 2025 (delfín); 7, cepa 2278 (koala); 8, cepa 2279 (posum australiano); 9, cepa 2290 (equidna); 10, cepa 3502 (ornitorrinco), 11, cepa 3887 (pingüino), 12, cepa 3909 (lobo marino), 13, cepa 4232 (ballena) y 14, cepa W3110 (humano).



**Figura 10.** Patrón de restricción con la enzima *Hinf*I de la región codificadora del gen *rpoH*, de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos. Carriles: 1, cepa 55 (águila real); 2, cepa 58 (ratón); 3, cepa 65 (jaguar); 4, cepa 1648 (lince); 5, cepa 1735 (manatí); 6, cepa 2025 (delfín); 7, cepa 2278 (koala); 8, cepa 2279 (posum australiano); 9, cepa 2290 (equidna); 10, cepa 3502 (ornitorrinco), 11, cepa 3887 (pingüino), 12, cepa 3909 (lobo marino), 13, cepa 4232 (ballena) y 14, cepa W3110 (humano).



**Figura 11.** Patrón de restricción con la enzima *Hpa*II de la región codificadora del gen *rpoH*, de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, cepa 55 (águila real); 2, cepa 58 (ratón); 3, cepa 65 (jaguar); 4, cepa 1648 (lince); 5, cepa 1735 (manatí); 6, cepa 2025 (delfín); 7, cepa 2278 (koala); 8, cepa 2279 (posum australiano); 9, cepa 2290 (equidna); 10, cepa 3502 (ornitorrinco), 11, cepa 3887 (pingüino), 12, cepa 3909 (lobo marino), 13, cepa 4232 (ballena) y 14, cepa W3110 (humano).

#### 5.4 Variabilidad nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH* de cepas de *E. coli* aisladas de distintos hospederos.

*E. coli* K-12 se utiliza de manera intensiva como modelo para profundizar en el conocimiento de la regulación genética en bacterias. Para conocer si la arquitectura de los elementos regulatorios identificados en la región reguladora del gen *rpoH* de *E. coli* K-12 se encuentra conservada en cepas aisladas recientemente de hospederos silvestres de diferentes regiones geográficas se decidió secuenciar esta región.

Las regiones reguladoras de *rpoH* de 13 cepas de hospederos silvestres y la cepa W3110 de *E. coli* K-12 se amplificaron por PCR y se secuenciaron, ya sea manual o automáticamente (ver Materiales y Métodos).

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las diferentes cepas muestra gran similitud en las secuencias -10 y -35 de los promotores. Se encontró un solo cambio en la -10 del P5 de la *E. coli* del ratón respecto al resto de las cepas, este cambio es de una timina por una citosina, lo que corresponde a una mutación de tipo transición (Figura 12).

Las secuencias para las diferentes cajas de regulación del gen *rpoH*, CRP1, CRP2, DnaA1, DnaA2, CytR y A, también son similares; sin embargo, es importante mencionar que en la región 3' vecina a la caja DnaA1 si se observan 5 sitios polimórficos que corresponden a la caja CytR, siendo esta la caja con mayor polimorfismo (Figura 13).



Término de *ftsYEX*

P1 ↓

I TTTAGCCACTTTACGCCTGAATAATAAAGCGTGTATATACTTTCCCTGCAATGGTTCCGTAGCAGGAAAGAGACCCCGTTGTCTCTTCCCGSTAT 100  
 II .....  
 III .....  
 IV .....  
 V .....  
 VI .....  
 VII .....  
 G.....T.....

CRP-2

CytR

DnaA1

DnaA2

P3 ↓

P4 ↓↓

I TTCATCTCTATGTCACATTTTGTGGGTAATTTATTTCACAAGCTTGCATTTGAACCTGTGGGATAAAATCACGGTCTGATAAAAACAGTGAATGATAAACCCTCGT 200  
 II .....  
 III .....  
 IV .....  
 V .....  
 VI .....  
 VII .....  
 T.....A.....ACA.....T.....

P5 ↓↓

+1

I TGCTCTTAAGCTCTGGCACAGTTGTTGCTACCACCTGAAGGCCGAGAAAGATATCGATTGAGAGGATTGAAATG 272  
 II .....  
 III .....  
 IV .....  
 V .....  
 VI .....  
 VII .....  
 A

Figura 13. Alineamiento de los haplotipos encontrados en la región reguladora del gen *rpoH* de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos. (Haplotipo I: humano, águila real y ballena; II, jaguar, manatí, ornitorinco y equidna; III, linco, lobo marino y posum australiano; IV, koala; V, delfín; VI, pingüino y VII, ratón). En los rectángulos se muestran las secuencias de las cajas reguladoras DnaA1, DnaA2, CytR y A. Las flechas horizontales señalan secuencias invertidas repetidas. Los codones subrayados TAA TAA corresponden a los codones de término del operon *ftsYEX*, y ATG, al codón de inicio de traducción de este gen. Las flechas verticales indican el sitio de inicio de la transcripción de los promotores P1, P3, P4 y P5.

Los resultados de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de la región reguladora del gen *rpoH* se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores obtenidos a partir de la secuencia nucleotídica de la región reguladora de *rpoH*.

Parámetro	Valor
Tamaño de la muestra	14
No. de haplotipos	7
No. de loci	272
No. de sitios polimórficos	13
Diversidad genética (h)	0.8681
Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	0.0123 +/- 0.00756
Composición nucleotídica	C:21.14% T: 31.38% A: 26.42% G: 21.06%

Para estimar las relaciones de similitud entre las secuencias nucleotídicas de las diferentes cepas se realizó un fenograma utilizando el método UPGMA. El fenograma nos muestra 7 grupos (Figura 14). El primer y sexto grupo tienen cada uno una sola cepa representativa, en el primero se encuentra la cepa aislada del koala, herbívoro de Australia y el sexto la de ratón granívoro de México. El segundo grupo con el mismo genotipo lo forman las cepas aisladas del lobo marino, posum australiano y lince. Estos hospederos son de la Antártida, Australia y México, respectivamente, este grupo guarda cierta relación con el primer grupo, la cepa del koala, donde se ubican los 2 hospederos del orden marsupialia (koala y posum australiano) El tercero contiene a las cepas aisladas de ornitorrinco, equidna, jaguar y manatí. En este grupo se encuentran cepas de 2 hospederos de Australia del orden de los monotrematas (ornitorrinco y equidna), así como de 2 hospederos de México, manatí y jaguar. El cuarto, esta formado por la cepa de laboratorio *E. coli* K-12 W3110, la cepa aislada de la ballena y la del águila real.

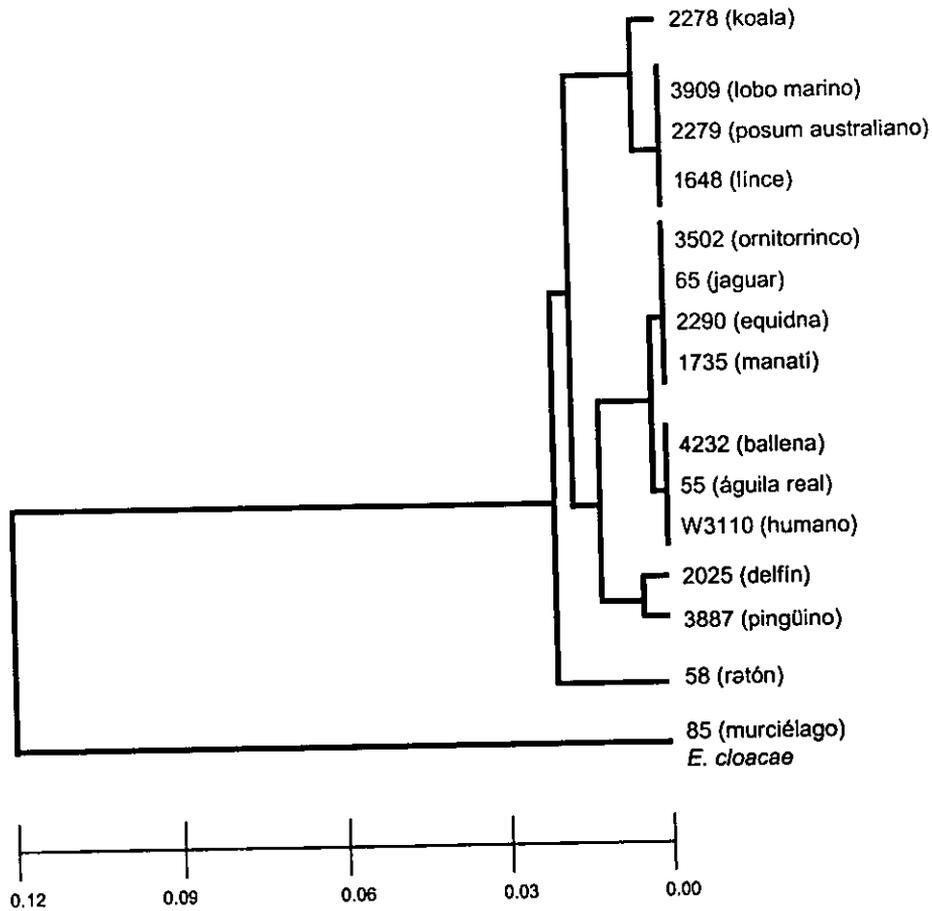
Los hospederos para las dos últimas cepas de este grupo, tienen tipo diferente de dieta y se localizan en diferentes regiones geográficas, Antártida y México. El quinto tiene dos cepas, una aislada del delfín y otra del pingüino, ambos hospederos acuáticos con el mismo tipo de dieta (piscívoros) pero de diferente región geográfica, México y Antártida. Finalmente, para dar raíz al fenograma, se utilizó la secuencia de la región reguladora de *rpoH* de una cepa de *E. cloacae* aislada de murciélago. Esta cepa presentó poca similitud en la secuencia en relación a las cepas de *E. coli*.

Es importante mencionar que las relaciones de similitud encontradas entre el árbol de isoenzimas (Figura 8) y el árbol de secuencias nucleotídicas (Figura 14) no son del todo diferentes entre sí, ya que ambos árboles agrupan a la cepa aisladas del jaguar con la cepa del águila real, hospederos de la misma región geográfica (México), y el mismo tipo de dieta (carnívoros). Los dos árboles también agrupan a la cepa de la ballena con la de humano, hospederos mamíferos de diferente región geográfica y tipo de dieta, por otro lado agrupan a la cepa del equidna con el ornitorrinco, hospederos que comparten la misma región geográfica (Australia) así como el orden (monotremata) y finalmente a la cepa del koala con la cepa del posum australiano, hospederos de la misma región geográfica (Australia) y que pertenecen al mismo orden marsupialia. Es importante esta comparación ya que estamos hablando de un 57% de correlación entre ambos árboles generados con diferentes marcadores moleculares.

En resumen, en las cepas de *E. coli* aisladas de hospederos silvestres, la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH* es prácticamente idéntica a la secuencia de la cepa de laboratorio *E. coli* K-12. Esto significa que la región reguladora del gen *rpoH* de todas las cepas de *E. coli* estudiadas se encuentra conservada.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de la región reguladora de *rpoH* de 14 cepas de *E. coli*, así como el resultado obtenido para la región codificadora con las 3 endonucleasas muestra un alto grado de similitud de este gen en estas

cepas. Sin embargo, es importante mencionar que la resolución obtenida con las enzimas de restricción, es menor que con las secuencias nucleotídicas.



**Figura 14.** Fenograma de 14 cepas de *E. coli* y una *E. cloacae* (grupo externo) aisladas de diferentes hospederos. El fenograma se obtuvo a partir del análisis de las secuencias nucleotídicas de la región reguladora del gen *rpoH* de estas cepas (figura 12 y 13) con el método UPGMA. La distancia genética se calculó utilizando el modelo de dos parámetros de Kimura (1980).

---

## VI. DISCUSIÓN

La respuesta celular al estrés calórico en las enterobacterias, así como en otras bacterias gram-negativas, se encuentra bajo control transcripcional de cuando menos dos genes reguladores: *rpoH* y *rpoE*. El primero codifica para el factor de transcripción  $\sigma^{32}$  y el segundo para  $\sigma^E$ . Entre los genes regulados por  $\sigma^{32}$  se encuentran los genes para las principales chaperonas y proteasas celulares, lo que muestra la importancia de este gen en condiciones normales de crecimiento, así como durante la respuesta celular al calor y a otras condiciones de estrés. El conocimiento actual sobre los mecanismos generales de regulación genética de la respuesta de las bacterias al estrés calórico y en particular de la regulación de la expresión del gen *rpoH* deriva principalmente de estudios en *E. coli* K-12 (Morimoto *et al.* 1994). Sin embargo, es importante puntualizar que esta enterobacteria se aisló hace más de 60 años del intestino humano y desde entonces se cultiva en condiciones de laboratorio: medios ricos o definidos, temperatura constante, etc. Además, la amplia colección actual de cepas de laboratorio de *E. coli* K-12 se generó a partir de tratamientos repetidos con diferentes agentes mutagénicos y de la selección de una gran diversidad de fenotipos.

En este trabajo se estudió principalmente si el gen *rpoH* de las cepas silvestres actuales, aisladas de hospederos no humanos de diferentes regiones geográficas y tipos de dieta, es similar al gen de *E. coli* K-12. El estudio se realizó en una colección de 13 cepas silvestres y una de laboratorio K-12, W3110.

Los estudios preliminares sobre el perfil de termosensibilidad de las cepas aisladas recientemente de hospederos no humanos mostraron que las curvas de crecimiento de estas cepas a 30°C y 42°C son similares y que a 47°C se observa un patrón más heterogéneo. El análisis de varianza no paramétrico de comparación de medianas, Kruskal-Wallis, reportó que no existe diferencia significativa en el crecimiento de las cepas a 30°C, 42°C y 47°C.

---

En un estudio previo realizado por Soid, (1995) con diferentes cepas de *E. coli* K-12 (W3110, C600 NAL<sup>s</sup>, C600 NAL<sup>r</sup>, W3110, AB1157, GM30, GM31) a 47°C se observaron curvas de crecimiento más heterogeneas. En esas curvas fue posible identificar dos grupos de cepas con un comportamiento de termosensibilidad diferente, uno termoresistente (C600 NAL<sup>s</sup>, C600 NAL<sup>r</sup> y W3110) y otro termosensible (AB1157, GM30 y GM31). Este comportamiento no se observó con las cepas silvestres.

Sin embargo, al analizar las velocidades de crecimiento, se observó una diferencia mayor entre las cepas con crecimiento aparentemente más rápido y más lento en las curvas de 30°C y 42°C respecto a las de 47°C. En cuanto al patrón observado a 47°C, éste es menos heterogéneo que el que se observó entre cepas de laboratorio. Una posible explicación es que como se mencionó, las cepas de laboratorio se han mantenido en condiciones diferentes y se han expuesto a tratamientos repetidos de mutagenesis y selección, lo que ha generado una gran diversidad de fenotipos.

En cuanto a las diferencias en las curvas de crecimiento éstas posiblemente obedecen a números de células diferentes en los inóculos iniciales y/o a una capacidad distinta de las cepas para iniciar el crecimiento a diferentes temperaturas.

Para un análisis más completo de la termosensibilidad de estas cepas es necesario diseñar experimentos enfocados específicamente a evaluar la capacidad de cada cepa para iniciar el crecimiento a diferentes temperaturas, así como a evaluar la capacidad de competencia entre las cepas al cultivar juntas a dos cepas diferentes a la misma temperatura.

Las cepas de *E. coli* aisladas de diversas fuentes como son humanos y animales (mamíferos principalmente), se pueden analizar y agrupar de acuerdo a su patrón de electroforesis de isoenzimas (Selander *et al.* 1987; Selander y Levin, 1980; Ochman *et al.* 1983; Whittam *et al.* 1983a; Whittam *et al.* 1989).

Para evaluar la diversidad genética de las cepas silvestres de *E. coli* que se utilizaron en este trabajo, se realizó un estudio de su patrón de electroforesis para 11 enzimas metabólicas. El resultado obtenido para las 13 cepas silvestres aisladas de aves y mamíferos de México, Australia y Antártida y una cepa de laboratorio aislada de humano, muestra una diversidad genética de  $h=0.48$ . Este valor se encuentra dentro del rango de valores de diversidad genética reportada para otras colecciones de cepas de *E. coli*, y es de 3 a 4 veces mayor que los reportados para organismos eucariontes. Sin embargo, presenta una diversidad genética menor a la colección de la cual provienen nuestras cepas (Souza *et al.* 1999), (Tabla 13). Esto probablemente se debe a que estos autores analizaron 202 cepas de mamíferos, aves y una de reptil de Australia y América, en donde además, se seleccionaron intencionalmente caracteres informativos basados en el análisis hecho por Selander *et al.* (1986); Selander *et al.* (1987).

A la fecha existen cuatro principales colecciones de cepas de *E. coli* caracterizadas genética y fenotípicamente. Estas colecciones han sido aisladas de diferentes hospederos: La colección ECOR esta formada de 72 cepas aisladas de humanos y 16 cepas aisladas de mamíferos de zoológicos (Ochman y Selander 1984). La colección Achtman (Achtman *et al.* 1983; Achtman, 1985) contiene cepas de humanos de Europa y del Norte de América con infecciones en vías urinarias y la colección Murray, cepas aisladas principalmente de humanos desde 1917. Este último cepario ha sido caracterizado principalmente por el patrón de resistencia a antibióticos de las cepas (Routman *et al.* 1985). Estas colecciones se han usado ampliamente en estudios relacionados con la estructura poblacional de *E. coli*. La diversidad genética ( $h$ ) reportada para estas colecciones de *E. coli* va de  $h=0.343$  a  $0.542$  (Selanders *et al.* 1987).

Actualmente se cuenta además con la colección de Souza *et al.* (1999). Esta colección esta formado por 202 cepas. Ochenta y un cepas se aislaron de especies de mamíferos de Australia y América, 10 cepas de diferentes familias de aves de México y una cepa de reptil. La diversidad genética reportada para esta colección es de  $h=0.682$ , siendo la diversidad genética más alta reportada entre

las colecciones de bacterias. Este cepario ha sido caracterizado también fenotípicamente por el patrón de resistencia a antibióticos.

**Tabla 13.** Diversidad genética en poblaciones naturales de *E. coli*

<i>E. coli</i> Hospederos	No. de loci	No. de alelos promedio	No. de aislados	No. Ets	Diversidad genética (h)	Referencia
Mamíferos y aves silvestres de México, Australia, Antártida y una cepa K-12.	13	3.1	14	13	0.48	Este trabajo
Mamíferos, aves y un reptil de Australia y América.	11	6.8	202	187	0.68	Souza <i>et al.</i> 1999
Mamíferos, aves y un reptil silvestres y de cautiverio; cepas de la colección ECOR y cepas K-12.	13	7.3	175	164	0.73	Rocha, 1996
Niños de Massachussets.	20	3.4	17	16	0.47	Selander <i>et al.</i> 1987
Humanos y animales de zoológicos y cepas de la colección ECOR.	35	4.2	72	62	0.34	Ochman y Selander, 1984
Humanos y animales de zoológico.	20	7.3	109	98	0.47	Selander y Levin, 1980

Además de la diversidad genética se realizó un análisis de relaciones de similitud entre las diferentes cepas, representadas en un árbol de distancia que se obtuvo a partir de los electrotipos de las 14 cepas que se analizaron. En este árbol no se muestra una correlación con sus hospederos, dietas y localidad geográfica, a diferencia de lo reportado por otros autores (Souza *et al.* 1999; Rocha, 1996), que observaron patrones de similitud entre los diferentes ordenes de los hospederos. Estos autores también observaron grupos de acuerdo al tipo de dieta (herbívoros y omnívoros), y de su localización geográfica. La poca resolución que

nosotros observamos puede deberse al número de cepas analizadas. Sin embargo Whittam *et al.* (1983b) analizó la diferenciación geográfica en 178 cepas de *E. coli* aisladas de humanos de Estados Unidos, Suecia y Tonga, reportando que la diferenciación geográfica es importante solamente para el 2% de la diversidad genética total. Mas del 10% de la diversidad se encontró presente en una sola localidad y la diferenciación entre localidades es considerada como el resultado de alelos únicos para cada localidad.

Para determinar la variabilidad genética del gen *rpoH* de las cepas silvestres en relación al gen de *E. coli* K-12, se realizó un análisis para todas cepas de RFLPs de la región codificadora y se obtuvo y analizó la secuencia nucleotídica de la región reguladora.

Los resultados obtenidos con el método de RFLP's con tres enzimas de restricción para la región codificadora de *rpoH* muestran que la región en las 13 cepas silvestres es similar a la de la cepa K-12 W3110. Estos resultados sugieren que la región codificadora de *rpoH* es conservada. Estos resultados apoyan lo reportado por Ramírez-Santos y Gómez-Eichelmann (1998), donde por medio de análisis de Western blot detectaron la presencia de una proteína homóloga a  $\sigma^{32}$  en varias bacterias entericas como son: *Escherichia coli* K-12 W3110, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia amylovora*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica* y *Proteus mirabilis*.

McCarty *et al.* (1996), realizan una comparación de proteínas homólogas a  $\sigma^{32}$  para 5 proteobacterias gram-negativas, encontrando la presencia de una caja C, conservada en *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Zymomonas mobilis*. La caja C muestra dos sitios altamente conservados, uno localizado en la parte central y otro localizado en la periferia, dichos sitios presentan alta afinidad de unión con la proteína DnaK, por lo que la caja C altamente conservada en las proteínas homólogas a  $\sigma^{32}$  no se observa en otros factores  $\sigma$

Los resultados obtenidos del análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones reguladoras del gen *rpoH* de las 13 cepas silvestres indican gran similitud con la secuencia de la cepa de *E. coli* K-12. Es decir, las cepas silvestres muestran secuencias prácticamente idénticas a las secuencias de las regiones -10 y -35 de los promotores P1, P3, P4 y P5, así como una gran similitud entre las secuencias regulatorias, cajas CRP1, CRP2; cajas DnaA1, DnaA2; caja A y la secuencia Shine-Delgarno reportadas para *E. coli* K-12. La diferencia más importante se localiza en el brazo derecho de la caja CytR (Figura 13). En las cepas de lince, lobo marino, koala y posum australiano, el triplete AGC es sustituido por GCG y en la cepa de ratón, el triplete CTT lo es por ACA. En la cepa del delfín hay un cambio de una guanina por una timina. La localización de estos cambios sugiere una alteración en la regulación de *rpoH* mediada por CytR. Sin embargo, para evaluar esta posibilidad es necesario determinar la actividad de los promotores P3, P4 y P5 de *rpoH* en presencia y ausencia de citidina.

La similitud en la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH* en las diferentes cepas de *E. coli*, sugiere que es una región sujeta a restricciones funcionales, debido a que presenta varias cajas de unión, para diferentes proteínas que reprimen o activan la expresión de los promotores. Una mutación en alguna de estas cajas puede generar la pérdida de reconocimiento de la maquinaria molecular involucrada en la expresión del mismo.

Los resultados aquí presentados apoyan lo reportado por Ramírez-Santos *et al.* (2001), donde obtienen y analizan la secuencia nucleotídica de la región reguladora del gen *rpoH* en diferentes bacterias entericas. En este trabajo se reporta que las diferentes cajas CRP2, CRP1, DnaA1, DnaA2, CytR y AraC, se encuentran presentes y conservadas en *E. coli* K-12, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*. De la misma manera, la caja -10 y -35 del promotor P1, así como la secuencia invertida repetida del terminador transcripcional del gen *ftsX*, fue comparado, observando una similitud en las diferentes cepas. La región proximal fue analizada de la misma manera, encontrando las cajas -10 y -35 de P3, P4 y P5 similar a la de *E. coli* K-

---

12, y *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Y. frederiksenni*, y *E. amylovora*.

Pocos son los estudios realizados sobre las regiones reguladoras o no codificadoras de un gen. Li y Graur (1991), reportan un análisis comparativo sobre el número de sustituciones nucleotídicas en las diferentes partes de un gen de eucariote. El mayor número de sustituciones lo presentan los sitios 4 veces degenerados y los pseudogenes; valores ligeramente inferiores se encuentra en los intrones y las regiones que flanquean al extremo 3', los valores intermedios se localizan en las regiones 3' y 5' no traducidas, así como en sitios 2 veces degenerados. La región con menor número de sustituciones se observa en sitios no degenerados. Sin embargo, ésta es una comparación realizada a partir de valores de únicamente 16 genes por lo tanto es posible que la tasa de mutación por región, varíe de gen a gen.

Nelson y Selander (1992), analizaron la secuencia nucleotídica del gen *putP* (gen que codifica para la proteína prolin-permeasa) y su región control, en 16 cepas de *Salmonella* y en 13 cepas silvestres de *E. coli*, reportando menor número de sustituciones en las cepas de *E. coli* respecto a *Salmonella*. Las diferencias encontradas en las 13 cepas de *E. coli* son de un 2.4% en la región codificadora y un 0.9% en la región control. La región reguladora (región control) es más conservada con respecto a la codificadora debido a que presenta múltiples sitios de unión al DNA de proteínas reguladoras, que son poco tolerantes a cambios, mientras que la tercera posición de cada triplete en las regiones codificadoras puede sufrir mutaciones sinónimas sin verse afectado el desempeño de la célula.

Por otro lado, Garriaga *et al.* (1992), analizaron la secuencia nucleotídica del gen *lexA*, en bacterias gram-negativas, encontrando una región reguladora muy conservada en *S. typhimurium*, *E. carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* y *E. coli*. La región reguladora presenta dos sitios de unión para la proteína LexA1 y LexA2. La caja LexA1 se encuentra fuertemente conservada en las 5 bacterias, la parte izquierda de la caja es muy importante en el proceso de unión

---

de la proteína represora LexA. Por lo que estos sitios de unión al DNA son altamente conservados en 2 distintas familias como son las Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae.

A pesar de que los resultados de trabajos anteriores (Li y Graur, 1991; Nelson y Selander, 1992), sugieren que la región codificadora de un gen contiene los sitios con mayor tasa de mutación, la diferencia de esta tasa con respecto a la reguladora es cercana a un orden de magnitud por lo que no se observa una diferencia substancial, por ejemplo: 2 substituciones por nucleotido por  $10^9$  años en las regiones reguladoras, contra 3 substituciones por nucleotido por  $10^9$  años en los sitios 4 veces degenerados, región codificadora (Li y Graur 1991).

Los resultados obtenidos con el análisis sobre las secuencias nucleotídicas de la región reguladora de *rpoH* mostró una variabilidad nucleotídica de  $\pi=0.012$ . La  $\pi$  reportada para otros genes como *gnd* (6-fosfogluconato-deshidrogenasa) y *gapA* (gliceridehido-3-fosfato deshidrogenasa), son de  $\pi=0.039$  y  $\pi=0.002$ , respectivamente. (Bisercic *et al.* 1991; Nelson *et al.* 1991).

Whittam, (1996) analizó la secuencia parcial o total de 15 genes de diferentes cepas de *E. coli* como son: *trpB*, *trpC*, *gnd*, *phoA*, *gapA*, *putP*, *mdh*, *pabB*, *sppA*, *zwf* y 2 ORF (ORF2 y ORF3), *celC*, *crr* y *gutB*, reportando una diversidad nucleotídica promedio para las 15 secuencias de  $\pi=0.018$ .

Es importante mencionar que los valores de  $\pi$  reportados en este trabajo son de las regiones reguladoras del gen *rpoH* y los valores anteriormente descritos por otros autores pertenecen a regiones codificadoras. Una comparación ideal debería de realizarse con secuencias de regiones reguladoras, sin embargo, no se encontraron trabajos similares. El análisis de secuencias sobre regiones reguladoras es un campo emergente, sin embargo, se comparan los valores de  $\pi$  de regiones codificadoras que como se discutió anteriormente presentan una tasa de mutación de aproximadamente un orden de magnitud mayor que las regiones reguladoras (Li y Graur 1991; Nelson y Selander, 1992).

---

El árbol de distancia genética obtenido con el análisis de las secuencias nucleotídicas relacionan a los dos cepas aisladas de ejemplares del orden marsupialia de Australia (koala y posum australiano), así como a los dos cepas de ejemplares del orden monotrematas de Australia<sup>1</sup> (ornitorrinco y equidna), y a los dos ejemplares piscívoros delfín y pingüino (Figura 14).

Comparando el árbol de isoenzimas contra el árbol de secuencias nucleotídicas podemos mencionar que a pesar de no mostrar la misma topología si muestran cierta similitud. Ambos árboles agrupan a los dos marsupiales de Australia (koala y posum australiano) y a los dos monotremas también de Australia (equidna y ornitorrinco), así como al águila real con el jaguar hospederos de México con la misma dieta (carnívoros). Finalmente los 2 árboles relacionan a la cepa de humano con la ballena, mamíferos de diferente región geográfica, dieta y orden. Esta similitud entre los árboles de distancia nos hablan de un 57% de relación utilizando 2 marcadores moleculares.

---

## VII. CONCLUSIONES

1. Las 13 cepas silvestres de *E. coli* y la *E. coli* K-12 (W3110) muestran un perfil de termosensibilidad similar a 30°C, 42°C y 47°C.
2. La variabilidad genética de las 14 cepas estudiadas es similar a la reportada para otros ceparios de *E. coli*.
3. La región codificadora del gen *rpoH* de 13 cepas silvestres de *E. coli* y la cepa *E. coli* K-12, muestran el mismo patrón de restricción.
4. El análisis de la región reguladora del gen *rpoH* muestra que las 13 cepas silvestres son similares a la de *E. coli* K-12.
5. Los principales cambios en la región reguladora se encuentran en el brazo derecho de la caja CytR.
6. Los árboles de similitud generados a partir de las frecuencias alélicas y de las secuencias nucleotídicas (haplotipos) de la región reguladora del gen *rpoH*, agrupan a las 14 cepas estudiadas de manera relativamente independiente a sus hospederos, regiones geográficas y tipos de dieta.

- ◆ Este análisis sugiere que la regulación de la transcripción del gen de la respuesta a estrés por calor, *rpoH*, es similar en las 13 cepas silvestres y la cepa de laboratorio *E. coli* K-12.
- ◆ Estos resultados validan el uso de las cepas de *E. coli* K-12 como modelo para estudiar la regulación de este importante gen.

---

**VIII. LITERATURA CITADA**

- Achtman, M. 1985. Clonal groups and virulence factors among *Escherichia coli* K1 strains, p. 65-74 *In*: Dawes, E. A., T. Korhonen, and P. Makela (ed). Enterobacterial surface antigens: methods for molecular characterization. Elsevier Science Publishers, Amsterdam USA.
- Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton, and R. P. Silver. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* **39**:315-335.
- Bisercic, M., J. Y. Feutrier and P. R. Reeves. 1991. Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolated of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J. Bacteriol.* **173**:3894-3900.
- Blaszczak, A., C. Georgopoulos and K. Liberek. 1999. On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the  $\sigma^{32}$  transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the DnaK chaperone machine. *Mol. Microbiol.* **31**:157-166.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Blumenthal, R. M., D. W. Borst and R. G. Matthews. 1996. Experimental analysis of global gene regulation in *Escherichia coli*. *Progress Nucleic. Acid. Res. and Mol. Biol.* **55**:1-86.
- Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**:671-680.
- Burton, Z. F., C. A. Gross, K. K. Watanabe and R. R. Burges. 1983. The operon that encoded the sigma subunit of RNA polymerase also encodes ribosomal protein S21 and DNA primase in *E. coli* K-12. *Cell.* **32**:335-349
- Busby, S. and A. Kolb. 1996. The CAP modulon. *In*: Lin E. C. C. and A. S. Lynch (ed). Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. Harvard Medical School Boston, Massachusetts, USA. p 255-279.
- Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernández, J. Ramírez-Santos, J. Castro-Dorantes, V. Chagoya de Sánchez, and M. C. Gómez-Eichelmann. 1995. Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **177**:3619-3622.
- Chuang, S. E. and F. R. Blattner. 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:5242-5252.
- Cowing, D. W., J. C. A. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix and C. A. Gross. 1985. Consensus sequence for *E. coli* heat shock gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:2679-2683.
- Craig, E. A. and C. A. Gross. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *TIBS* **16**:135-140.

- De las Peñas, A., L. Connolly and C. A. Gross. 1997. The  $\sigma^E$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is traduced by RseA and RseB, two negative regulators of  $\sigma^E$ . *Mol. Microbiol.* **24**:373-385.
- Erickson, J. W and C. A. Gross. 1989. Identification of the  $\sigma^E$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate  $\sigma$  factor involved in high-temperature expression. *Genes Dev.* **3**:1462-1471.
- Erickson, J. W., V. Vaughn, W. A. Walter, F. C. Neidhardt and C. A. Gross. 1987. Regulation of the promoters and transcription of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* **1**:419-432.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. USA.
- Fisher, G. A., R. L. Anderson and G. M. Hahn. 1986. Glucocorticoid-induced heat resistance in mammalian cell. *J. Cell. Physiol.* **128**:127-132.
- Friedman, P. I. and Gottesman, M. 1983. Lytic mode of lambda development, *In*: Hendrix, Roberts, Stahl y Weisberg. (ed). *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory. Press, N.Y. p 21-51.
- Fujita, N. and A. Ishihama. 1987. Heat-shock induction of RNA polimerasa sigma-32 synthesis in *E. coli*: transcriptional control and multiple promoter system. *Mol. Gen. Genet.* **210**:10-15.
- Garriga, X., S. Calero and J. Barbé. 1992 Nucleotide sequence analysis and comparation of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:125-134.
- Georgopoulos, C. D., D. Ang, A. Maddock, S. Raina, B. Lipinska and M. Zylicz. 1990. Heat shock response of *Escherichia coli*. *In*: Drlica, K. and M. Riley (ed). *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. EUA. p 405-419.
- Gill, D. R., G. F. Hatfull and G. P. C. Salmond. 1986. A new cell division operon in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **205**:134-145.
- Gómez-Eichelmann, M. C. and R. Camacho-Carranza. 1995. Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **37**:291-304.
- Gottesman, S., S. Wickner and M. Maurizi. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Rev. Genes Dev.* **11**:815-823.
- Gross, C. A. 1996. Function and regulation of the heat shock protein. *In*: Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2ª Ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. EUA. p 1382-1399.

- Gross, C. A., D. B. Straus, J. W. Erickson and T. Yura. 1990. The function and regulation of heat shock protein in *Escherichia coli*. In: Morimoto, T., A. Tissieres and C. Georgopoulos (ed). Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. p. 167-189.
- Grossman, A. D., D. B. Straus, W. A. Walter and C. A. Gross, 1987.  $\sigma^{32}$  synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *E. coli*. *Genes. Dev.* 1:179-184.
- Grossman, A. D., J. W. Erickson and C. A. Gross. 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat shock promoters. *Cell.* 38:383-390.
- Hahn, G. M and G. C. Li. 1990. Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization. In: Morimoto, R.I., A. Tissiers and C. Georgopoulos (ed). Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y. p 79-100.
- Harrison, S. P., D. G. Jones and J. P. W. Young. 1989. *Rhizobium* population genetics: Genetic variation within and between population from diverse locations. *J. Gen. Microbiol.* 135:1061-1069.
- Hartl, F. U. 1994. Secrets of double-doughnut. *Nature.* 371:557-559.
- Hebert, P. D. W and M. J. Beaton. 1993. Methodologies for Allozyme Analysis using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories, EUA. p. 31.
- Hendrick, J. P. and F. U. Hartl. 1993. Molecular chaperone function of heat shock protein. *Ann. Rev. Biochem.* 62:349-384.
- Huerta, A. M., H. Salgado, D. Thieffry and J. Collado-Vides. 1998. RegulonDB: a database on transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26:55-59.
- Hughes, K. T. and K. Mathee. 1998. The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:231-286.
- Jenkins, D. E., E. A. Auger and A. Martin. 1991. Role of RpoH a heat shock regulator protein in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. *J. Bacteriol.* 173:1992-1996.
- Kallipolitis, B. H. and P. Valentin-Hansen. 1998. Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator  $\sigma^{32}$ , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Mol. Microbiol.* 29:1091-1099.
- Kamath-Loeb, A. S. and C. A. Gross. 1991. Translational regulation of  $\sigma^{32}$  synthesis: requirement for an internal control element. *J. Bacteriol.* 173:3904-3906.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Krueger, J. H. and G. C. Walker. 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*<sup>+</sup>-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1499-1503.

## LITERATURA CITADA

---

- Landick, R., V. Vaughn, E. T. Lau, R. A. VanBogelen, J. W. Erickson and F. C. Neidhardt. 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell*. **38**:175-182.
- Lee-Rivera, I. and M. C. Gómez-Eichelmann. 1994. *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**:35-38.
- Li, W.-H. and D. Graur. 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. p 284.
- Lindquist, S. 1986. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:1151-1191.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird and C. Georgoloupos. 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.
- López- Sanchez, F., J. Ramírez-Santos and M. C. Gómez-Eichelmann. 1997. *In vivo* effect of DNA relaxation on the transcription of gene *rpoH* in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1353**:79-83.
- McCarty, J. S., S. Rudiger, H.-J. Schonfeld, J. Scheneider-Mergener, K. Nakahigashi, T. Yura and B. Bukau. 1996. Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor,  $\sigma^{32}$ , constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J. Mol. Biol.* **256**:829-836.
- Mejía, R. M., M. C. Gómez-Eichelmann and M. S. Fernández. 1995. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta.* **1239**:195-200.
- Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos and S. Raina. 1997. Modulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  (RpoE) heat-shock transcriptional-factor activity by the RseA, RseB and RseC protein. *Mol. Microbiol.* **24**:355-371.
- Missiakas, D., S. Raina and C. Georgopoulos. 1996. Heat shock regulation. In: Lin E. C. C. and A. S. Lynch (ed). Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Harvard Medical School Boston, Massachusetts, USA. p 481-501.
- Missiakas, D., C. Gergopoulos and S. Raina. 1993. The *Escherichia coli* heat shock gene *htpY*: mutational analysis, cloning, sequencing and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* **175**:2613-2624.
- Morimoto, R., A. Tissieres and C. Georgopoulos. 1994. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. In: Morimoto, R., A. Tissieres y C. Georgopoulos (ed). The biology of the heat shock protein and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. p 1-30.
- Morimoto, R., K. D. Sarge and K. Abravaya. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* **267**:21987-21990.

- Nagai, H., H. Yuzawa, M. Kanemori and T. Yura. 1994. A distinct segment of the sigma 32 polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:10282-10284.
- Nagai, H., R. Yano, J. W. Erickson and T. Yura. 1990. Transcription regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: Involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J. Bacteriol.* **172**:2710-2715.
- Nakahigashi, K., H. Yanagi and T. Yura. 1995. Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding  $\sigma^{32}$  homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. *Nucleic. Acid. Res.* **23**:4383-4390.
- Neidhardt, F. C. and R. A. VanBogelen. 1987. Heat shock response. In: Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Shaechter and H.E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology Washington, D.C. p 1326-1333.
- Neidhardt, F. C., VanBogelen and V. Vaughn. 1984. The genetic and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **18**:295-329.
- Neidhardt, F. C. and R. A. VanBogelen. 1983. Molecular cloning and expression of a gene that controls the high-temperature regulon of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **153**:597-603.
- Neidhardt, F. C. and R. A. VanBogelen. 1981. Positive regulatory gene for temperature controlled protein in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**:894-900.
- Nelson, K., R. K. Selander. 1992. Evolutionary genetics of the proline permease gene (*putP*) and the control region of the proline utilization operon in populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:6886-6895.
- Nelson, K., T. S. Whittam and R. K. Selander. 1991. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6667-6671.
- Neumann, D. and L. Nover. 1991. Heat shock-induced changes of cell ultrastructure. In: Nover, L. (ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton Florida. p. 346-371.
- Nover, L. 1991. Inducer of HSP synthesis: heat shock and chemical stressors. In: Nover, L. (ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton, Florida. p 5-40.
- Ochman, H and R. H. Selander. 1984. Standard Reference Strain of *Escherichia coli* from Natural Population. *J. Bacteriol.* **157**:690-693.
- Ochman, H., T. S. Whittam, D. A. Caugant and R. K. Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2715-2726.

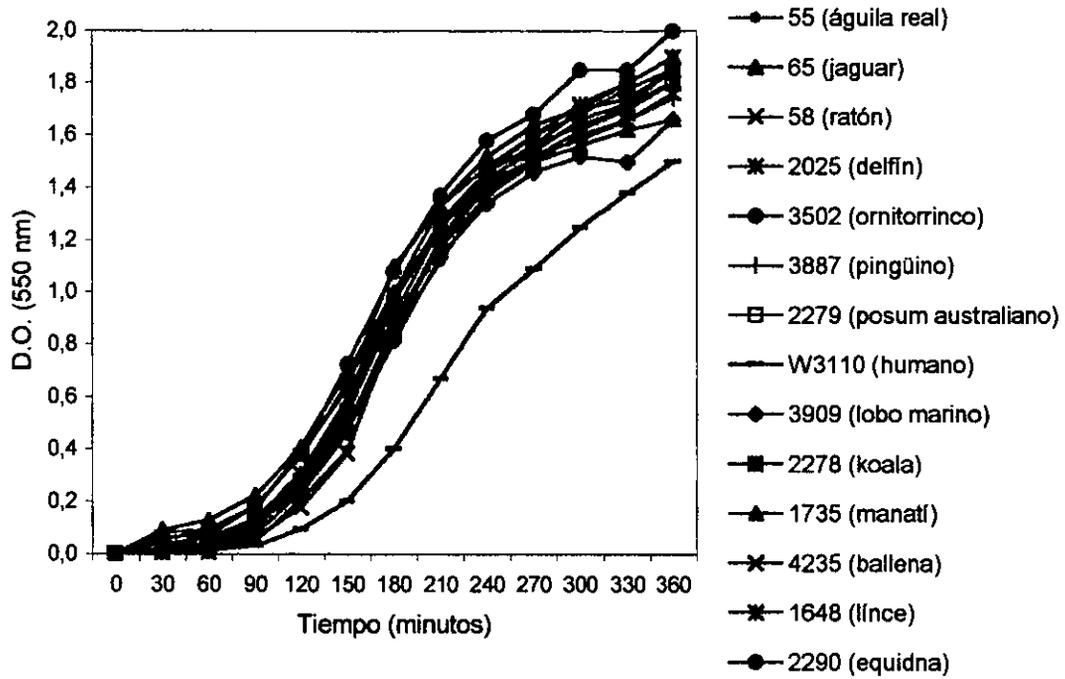
- Oligo version 4.1. Primer Análisis Software. National Biosciences, Inc. Copyright 1989-1992.
- PC/GENE version 6.85. IntelliGenetics, Inc. Mountain View, California 94040.
- Raina, S., D. Missiakas and C. Georgopoulos. 1995. The *rpoH* gene encoding the  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**:1043-1055.
- Raina, S. and C. Georgopoulos. 1990. A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only a high temperatures. *J. Bacteriol.* **172**:3417-3426.
- Ramírez-Santos, J., J. Collado-Vides, M. Garcia-Varela, and M. C. Gómez-Eichelmann. 2001. Conserved regulatory elements of the promoter sequence of the gene *rpoH* of enteric bacteria. *Nucleic Acids Research.* **29**:380-386.
- Ramírez-Santos, J. and M. C. Gómez-Eichelmann. 1998. Identification of the  $\sigma^{32}$ -like factors and *ftsX-rpoH* arrangements in enteric bacteria. *Can. J. Microbiol.* **44**:565-568.
- Rocha, M. G. 1996 Estructura genética de Poblaciones Naturales de *Escherichia coli* en mamíferos silvestres. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, p 75.
- Routman, E., R. D. Miller, J. Phillips-Conroy and D. L. Hartl. 1985: Antibiotic resistance and population structure in *Escherichia coli* from free-ranging African yellow baboons. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:749-754.
- Sahu G. K., R. Chowdhury and J. Das. 1997. The *rpoH* gene encoding  $\sigma^{32}$  homolog of *Vibrio cholerae*. *Gene* **189**: 203-207.
- Saito, H. and H. Uchida. 1978. Organization and expression of the *dnaJ* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **164**:1-8.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Publications. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 1997. Arlequin Ver 1.1: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Selander, R. K., D. A. Caugant and T. S. Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washintong, D.C. EUA. p 1625-1648
- Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Env. Microbiol.* **51**:873-884.
- Selander, R. K. and B. R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* **210**:545-547

- Skowrya, D. and S. Swickner . 1995. GrpE alters the affinity of DnaK for ATP and  $Mg^{+2}$ . *J. Biol. Chem.* **270**:26282-26285.
- Snyder, L. and W. Champness. 1997. Global regulatory mechanisms, *In: Molecular Genetics of Bacteria*. American Society for Microbiology. Washington D.C. EUA. p 298-334.
- Sofia, H. J., V. Burland, D. L. Daniels, G. Plunkett, III and F. R. Blattner. 1994. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes *Nucleic Acids Res.* **13**:2576-2586.
- Soid, L. G. 1995. Termosensibilidad y duración de la respuesta celular al estrés por calor en *Escherichia coli* K-12. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, p 113.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera and L. Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural population of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *App. Environ. Microbiol.* **65**:3373-3385
- Szyperski, T., M. Pellicchia, D. Wall, C. Georgopoulos and K. Wuthrich. 1994. NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:11343-11347.
- Thomson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL V: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tilly, K., J. Erickson, S. Sharma and C. Georgopoulos. 1986. Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increases after heat shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**:1155-1158.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Openheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, S. Hiraga and T. Ogura. 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor  $\sigma^{32}$ . *EMBO J.* **14**:2551-2560.
- VanBogelen, R. A., P. M. Philip and F. C. Neidhart. 1987. Differential induction of heat shock, SOS and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:26-32.
- VanBogelen, R. A., V. Vaughn and F. C. Neidhardt. 1983. Gene for heat-inducible lysil-tRNA synthetase (*lysU*) maps near *cadA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**:1066-1068.
- Wang, Q. and J. M. Kaguni. 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4248-4253.
- Wang, Q. and J. M. Kaguni. 1989. DnaA protein regulates transcription of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:7338-7344.

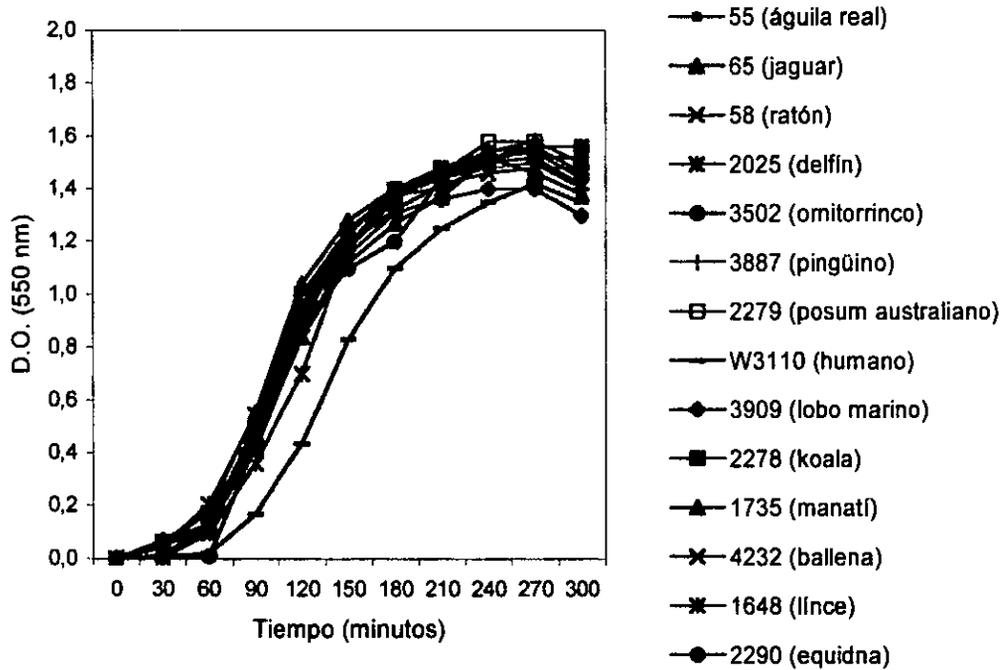
ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

- Whittam, T. S. 1996. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia coli*. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2<sup>a</sup> Ed. American Society for Microbiology, Washintong, D.C. EUA. p 2708-2720
- Whittam, T.S. 1990. Two programs (ETCLUS, ETDIV) to analyze genetic diversity and relationships among bacterial strains characterized by multilocus enzyme electrophoresis. Department of Biology. Pennsylvania State University.
- Whittam, T.S. 1989. Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitat. *Ant. V.Leeuw.* **55**:23-32.
- Whittam, T. S., M. L. Wolfe and R. A. Wilson. 1989. Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. *Epidem. Inf.* **102**:37-46.
- Whittam, T. S., H. Ochman and R. K. Selander. 1983a. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:1751-1755.
- Whittam, T. S., H. Ochman and R.K. Selander. 1983b. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **1**:67-83
- Wu, J. and A. Newton 1996. Isolation, identification, and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor sigma-32 from *Caulobacter crescentus*. *J. bacteriol.* **178**:2094-2101.
- Wu, C. 1995. Heat shock transcription factors: Structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**:441-469.
- Yamamori, T and T. Yura. 1982. Genetics control of heat shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *E. coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:860-864.
- Yura, T., T. Tobe, K.Ito and T. Osawa. 1984. Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:6803-6807.
- Yura, T., H. Nagai and H. Mori. 1993. Regulation of the heat shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:321-350.
- Zhou, Y. N., N. Kusukawa, J. W. Erickson, C. A. Gross and T. Yura. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor  $\sigma^{32}$ . *J. Bacteriol.* **179**:3640-3649.
- Zylic, M., D. Ang and C. Georgopoloulos. 1987. The *grpE* protein of *Escherichia coli*. **262**:17437-17442.

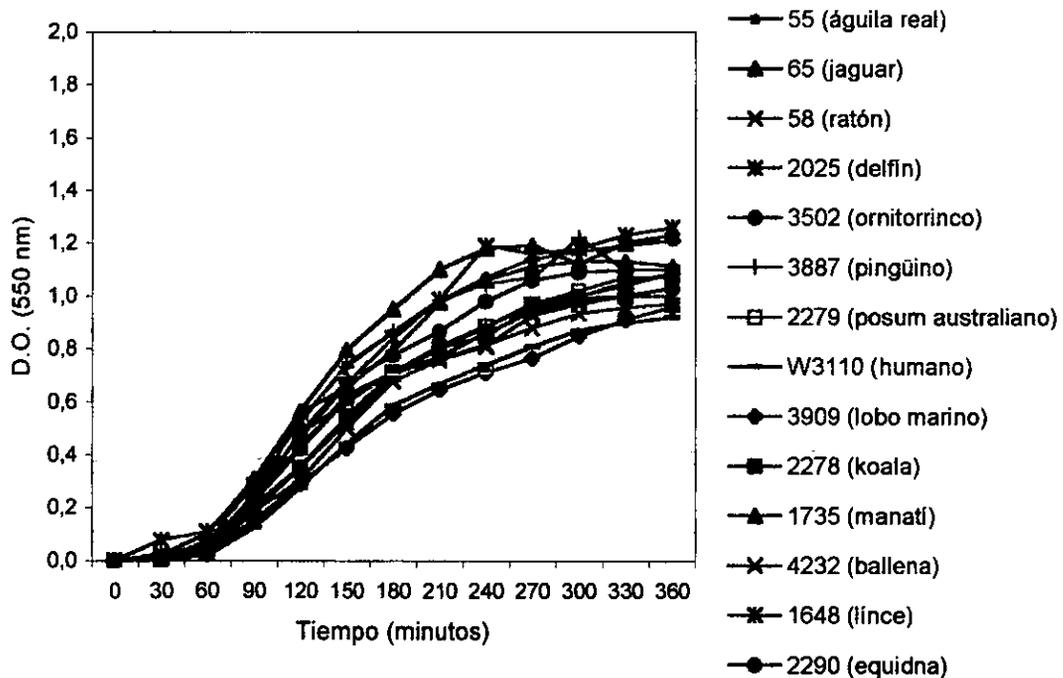
APÉNDICE I



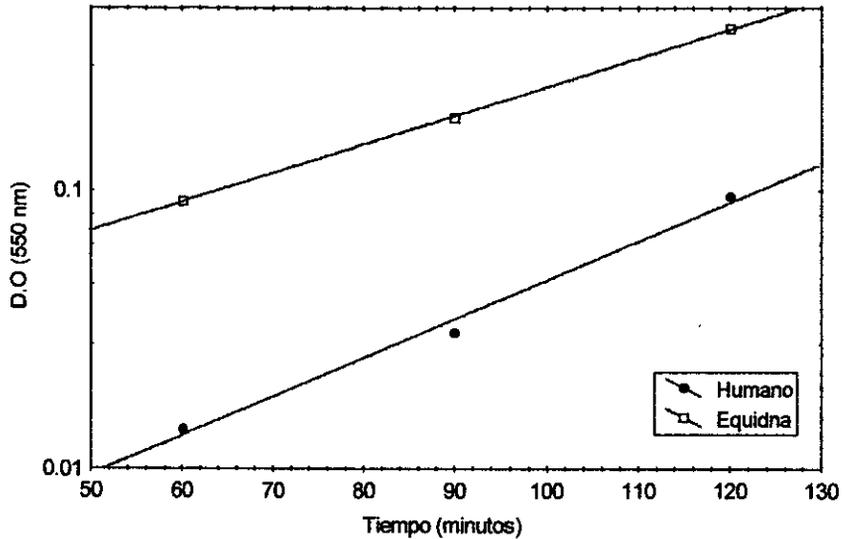
Curva de crecimiento a 30°C en medio LB de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos



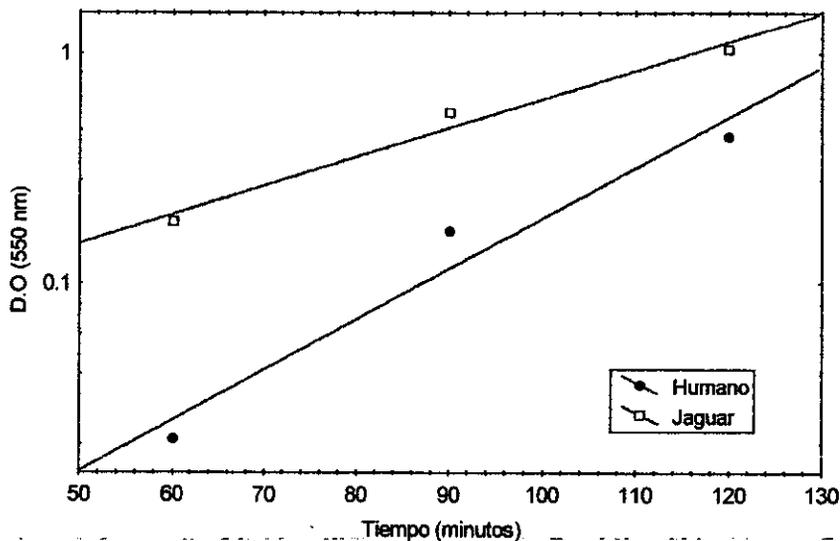
Curva de crecimiento a 42°C en medio LB de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos.



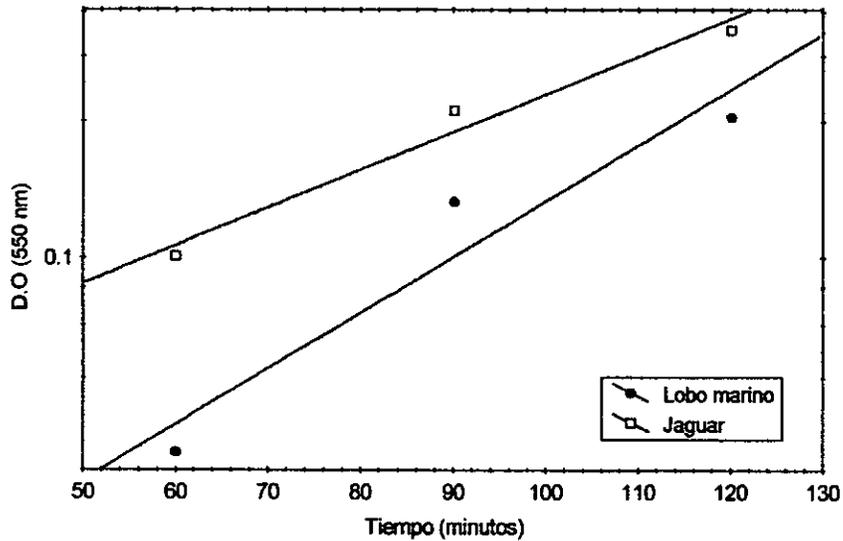
Curva de crecimiento a 47°C en medio LB de 14 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos.



Velocidad de crecimiento de las cepas de *E. coli* W3110 (hospedero, humano) y cepa 2290 (hospedero, equidna) a partir de la curva de crecimiento a 30°C en medio LB. Se seleccionó la cepa con crecimiento más rápido y más lento, para obtener su velocidad de crecimiento. En la gráfica se muestra únicamente los puntos de la curva donde el crecimiento es exponencial. La velocidad de crecimiento (K) de la cepa de humano es de 0.014/min y del equidna es de 0.010/min. K se calculó con la ecuación [4], descrita en Materiales y Métodos.



Velocidad de crecimiento de las cepas de *E. coli* W3110 (hospedero, humano) y cepa 65 (hospedero, jaguar) a partir de la curva de crecimiento a 42°C en medio LB. Se seleccionó la cepa con crecimiento más rápido y más lento, para obtener su velocidad de crecimiento. En la gráfica se muestra únicamente los puntos de la curva donde el crecimiento es exponencial. La velocidad de crecimiento (K) de la cepa de humano es de 0.021/min y del jaguar es de 0.012/min. K se calculó con la ecuación [4], descrita en Materiales y Métodos.



Velocidad de crecimiento de las cepas de *E. coli* 3909 (hospedero, lobo marino) y cepa 65 (hospedero, jaguar) a partir de la curva de crecimiento a 47°C en medio LB. Se seleccionó la cepa con crecimiento más rápido y más lento, para obtener su velocidad de crecimiento. En la gráfica se muestra únicamente los puntos de la curva donde el crecimiento es exponencial. La velocidad de crecimiento (K) de la cepa del lobo marino es de 0.018/min y del jaguar es de 0.016/min. K se calculó con la ecuación [4], descrita en Materiales y Métodos.

## APÉNDICE II

### MEDIOS DE CULTIVO:

MEDIO MacCONKEY

Medio MacConkey 50 g

Agua desionizada cbp 1000 ml

MEDIO DE CULTIVO DM 1000 (medio mínimo)

7 gr fosfato dibásico de potasio

2 gr fosfato monobásico de potasio

1 gr Sulfato de amonio

0.5 gr Citrato de Sodio

5 ml de Solución de Glucosa al 10%, (autoclaveada previamente)

0.5 ml de Sulfato de Magnesio al 10%

0.5 ml de Vitamina B1 al 10%

Agua desionizada cbp 1000 ml.

MEDIO LURIA (LB)

Bacto triptona 10.0 g

Extracto de levadura 5.0 g

Cloruro de Sodio 10.0 g

Timina 0.02 g

Hidroxido de sodio 2.5 N (1.0 ml)

Agua desionizada cbp 1000 ml

pH final 7.0

### SUSTRATOS EMPLEADOS EN LA TINCION DE ENZIMAS:

ADH (Alcohol deshidrogenasa)

0.6 ml Tris HCl, pH 7.0

1.5 ml NAD

270 µl de MTT

160 µl de etanol

270 µl de PMS

2 ml de agar

IDH (Isocitrato deshidrogenasa)

1 ml Tris HCl, pH 7.0

1.5 ml NADP

830 µl de DL-acido isocítrico

440 µl de MgCl<sub>2</sub>

270 µl de MTT

270 µl de PMS

2 ml de agar

PEP (Peptidasa)	MPI (Manosa-6-fosfato-isomerasa)
2.0 ml 0.02 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.5	1.0 ml Tris HCl, pH 8.0
220 µl de peroxidasa	1.5 ml de NAD
440 µl de o-Dianisidina (sal di-HCl)	270 µl de D-manosa-6-fosfato
110 µl de MgCl <sub>2</sub>	270 µl de MTT
440 µl de peptido (leu-ala)	270 µl de PMS
220 µl de L-amino ácido oxidasa	5 ml de PGI
2 ml de agar	20 ml G6PDH
	2 ml de agar
MDH (Malato deshidrogenasa)	XDH (Xantina deshidrogenasa)
1.0 ml Tris HCl, pH 8.0	1.0 ml Tris HCl, pH8.0
1.5 ml NAD	1.5 ml NAD
720 µl de substrato málico	1.1 ml de hipoxantina
270 µl de MTT	270 µl de MTT
270 µl de PMS	270 µl de PMS
2 ml de agar	2 ml de agar
G6H (Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa)	ARK (Arginina quinasa)
0.6 ml Tris HCl, pH 8.0	0.5 ml Tris HCl, pH8.0
1.5 ml NADP	1.5 ml NAD
660 µl de D-Glucosa-6-fosfato	270 µl de fosfo-L-arginina
330 µl de MgCl <sub>2</sub>	270 µl de solución de ADP
270 µl de MTT	270 µl de MTT
270 µl de PMS	270 µl de PMS
2 ml de agar	10 ml de Hexoquinasa
	10 ml G6PDH
	2 ml de agar
PGM (Fosfoglucomutasa)	ME (Enzima málica)

ajustar el pH.

BUFFER TBE 5X	BUFFER TBE 1X	BUFFER TE
450 mM Trizma base	90 mM Trizma base	25 mM Trizma base
50 mM EDTA	90 mM Ac. Bórico	1 mM EDTA
450 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mM EDTA	pH 8.0
pH 8.2		

### SOLUCION DE AGAR:

4 gr de agar bacteriológico

250 ml de agua, calentar la mezcla de 2 a 3 min.

### PREPARACION DE REACTIVOS:

SOLUCIÓN DE ADP	SUSTRATO MÁLICO	SOLUCIÓN DE GLUCOSA -1-FOSFATO
0.1 gr ADP	180 ml de agua	250 mg de glucosa -1-fosfato, Grado III
3.15 gr D-glucosa	20 ml. de Tris pH 9.0	250 mg de glucosa -1-fosfato, Grado IV
10 ml de agua	3.68 gr de ácido malico	5 ml de agua

ajustar a pH 8.0

### COLORANTE GUIA PARA DNA

Glicerol (30%)

Azul de bromofenol (0.25%)

EDTA 1Mm

Xilen cianol (0.25%).