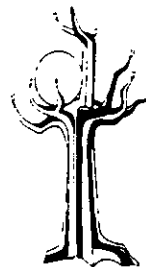




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE
MÉXICO



BIOMEDICAS

03062

13
29.

**EL SUPERENROLLAMIENTO DEL DNA Y LA GIRASA
EN LA RESPUESTA A ESTRÉS POR CALOR EN
*Escherichia coli.***

TESIS PRESENTADA POR
BIOL. MARIA TERESA LARA ORTIZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
(BIOLOGÍA MOLECULAR)

UACPyP DEL CCH DE LA UNAM

TESIS DIRIGIDA POR
DRA. MA. DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN

264320

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ma. del Carmen Gómez, a la Dra. Alicia González, al Dr. Luis Servín, al Dr. Roberto Coria y al Dr. Jorge Vázquez, quienes revisaron esta tesis, por sus comentarios y sugerencias que mejoraron mucho este trabajo.

Una mención muy especial a la Dra. Carmen Gómez quien es un ejemplo a seguir en este maravilloso mundo de la ciencia, un asesor incansable que siempre esta dispuesta a compartir sus conocimientos. Un sincero agradecimiento por su gran apoyo.

Al Dr. Jorge Suárez, a la Biol. Lourdes Sánchez, a la Dra. Victoria Chagoya y a la Biol. Susana Vidrio por su valiosa ayuda en el HPLC.

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

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos diariamente: Rafael, Gloria, Don Mike (mi mejor vecino), Irma y especialmente a Jesús por sus comentarios y criticas.

Por supuesto a mis amigos por su silencioso apoyo Paty, Rocío, Elizabeth, Agustín, Artemio y Poli.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | |
| El nucleoide bacteriano | 3 |
| El superenrollamiento | 4 |
| Proteínas del nucleoide | 6 |
| DNA topoisomerasas | 8 |
| El superenrollamiento del DNA cambia en respuesta a estímulos ambientales | 14 |
| Respuesta celular al estrés por calor | 18 |
| Principales sistemas de chaperonas en <i>E. coli</i> | |
| Sistema DnaK-DnaJ-GrpE | 24 |
| Sistema GroEL-GroES | 28 |
| OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 32 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 33 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| RESULTADOS | 48 |
| DISCUSIÓN | 61 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| APÉNDICE | 71 |
| BIBLIOGRAFÍA | 74 |

RESUMEN

El DNA en las bacterias esta organizado en asas superenrolladas negativamente. En *E. coli*, el nivel del superenrollamiento (SE) del DNA esta regulado principalmente por el balance entre las actividades opuestas de las topoisomerasas I y II. La topoisomerasa I disminuye el SE mientras que la topoisomerasa II o girasa lo incrementa. *In vitro* la actividad de la girasa disminuye a temperaturas elevadas (46°C) (Peebles, 1978). Sin embargo, *in vivo* un aumento repentino de temperatura (30° a 42°, 45°, 47° y 50°C), además de aumentar la expresión de los genes de estrés calórico (*dnaK*, *groE*, *lon*, etc.) incrementa el grado de SE de un plásmido reportero. La novobiocina, un inhibidor específico de la girasa y el cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas, bloquearon el incremento, inducido por calor, en el SE del plásmido (Camacho, 1976). Estos datos sugieren que la girasa y las proteínas sintetizadas durante el estrés por calor son responsables del cambio observado en el SE del plásmido. Por otra parte, girasa no se conoce como una proteína de estrés calórico (EC). Por lo tanto, en este trabajo nosotros planteamos como hipótesis que las proteínas de EC, DnaK y GroE, sintetizadas en los primeros minutos de la respuesta a EC mantienen a la girasa en una conformación activa a temperaturas altas (47° y 50°C).

Para corroborar el dato del cloranfenicol nosotros estudiamos el efecto del estrés calórico en el nivel del SE de un plásmido reportero en una mutante del gene *rpoH*, principal regulador de la respuesta a EC, en *E. coli*. En esta mutante *rpoH* el aumento de temperatura no indujo un incremento en el SE del plásmido. Este dato confirma que los genes que se inducen con el calor son importantes para el aumento del SE.

Para analizar de manera más directa el papel de la girasa en el SE del plásmido, se estudió una mutante temperatura-sensible en *gyrB* durante un estrés calórico. En la mutante *gyrB* el aumento de temperatura produjo un efecto tanto en la relajación como en el SE del DNA. Estos resultados muestran que la girasa participa tanto en la relajación inicial como en la recuperación del SE del plásmido durante la respuesta a EC.

Los resultados obtenidos con las mutantes *rpoH* y *gyrB* muestran que las proteínas de estrés calórico (PEC) y la girasa juegan un papel importante en el incremento del SE del plásmido durante la respuesta a estrés por calor. Para evaluar cuales PEC participan en este evento, se estudió el efecto de la temperatura en el nivel del SE en las mutantes: *dnaK*, *groE* y *dnaKgroE*, genes que codifican para las principales chaperonas en *E. coli*. Los resultados obtenidos con estas mutantes muestran que un aumento en la temperatura induce un incremento en el SE del plásmido. Estos datos sugieren que por lo menos las chaperonas DnaK y GroE no juegan un papel importante en el incremento del SE del plásmido.

Las proteínas DnaK y GroE además de su función como chaperonas tienen otras funciones celulares, por lo tanto, el uso de las mutantes en estos genes puede mostrar efectos pleiotrópicos no deseados. Por lo tanto, se montó un sistema *in vitro* en donde se evaluó de manera más precisa la actividad de la girasa a temperaturas altas en ausencia y presencia de las chaperonas DnaK y GroE. Los datos obtenidos con el sistema *in vitro*, bajo las condiciones experimentales utilizadas, sugieren que las proteínas DnaK y GroEL no están implicadas en la posible protección de la girasa a temperaturas altas. Es probable que estas proteínas son necesarias pero no suficientes para el recobre del nivel del SE del DNA.

INTRODUCCION

El DNA de los genomas bacterianos, como sucede con el DNA de todas las células, tiene una longitud muy grande en relación al volumen celular que ocupa. Esto hace que el DNA se encuentre en las células organizado de manera compleja para lograr un grado de compactación muy alto.

El DNA cromosomal de la bacteria *Escherichia coli* es una molécula circular cerrada de 4.7×10^6 pares de bases y una longitud de aproximadamente 1 mm. La longitud de este DNA es aproximadamente 1000 veces la longitud de una célula. Esta molécula se encuentra en una estructura compacta llamada nucleoide, que además del DNA, contiene moléculas de RNA, RNA polimerasa, topoisomerasas y proteínas principalmente básicas (Krawiec & Riley, 1990).

El nucleoide bacteriano.

El modelo actual más completo de nucleoide bacteriano es el de la bacteria *E. coli*. Este modelo propone que la molécula circular de DNA se encuentra organizada en topodominios. El número de topodominios varía según el medio de cultivo: en medio rico el DNA del nucleoide tiene aproximadamente 43 ± 10 topodominios, mientras que en medio mínimo tiene aproximadamente 25 (Sinden & Pettijohn, 1981). Originalmente a los topodominios se les denominó “asas”; sin embargo, no necesariamente estos dos términos son equivalentes, ya que una asa puede tener más de un topodominio. El término topodominio es más preciso y claro. Un topodominio es un segmento de DNA limitado por barreras que impiden que la tensión helicoidal de ese segmento afecte a segmentos vecinos.

El superenrollamiento

El DNA se encuentra en el nucleoide bajo tensión helicoidal negativa o superenrollamiento (Drlica, 1984). El superenrollamiento (SE) del DNA puede ser de dos tipos: plectonómico y toroidal. Si se toma un eje imaginario que pasa por el centro y corre a lo largo de la doble hélice del DNA, el SE plectonómico es aquel en el cual este eje describe una hélice en el espacio (Fig. 1a). En el SE toroidal, el eje se enrolla alrededor de un cilindro (Fig. 1b).

Los estudios realizados sobre la conformación del DNA son mejor comprendidos por conceptos delineados a partir de la topología, una rama de las matemáticas. Una propiedad topológica importante de una molécula de DNA circular es su 'linking number' (L_k).

El 'linking number' tiene dos componentes, el 'twist' (T_w) y el 'writhe number' (W_r):

$$L_k = T_w + W_r$$

W_r representa el número de veces que el DNA de dos hebras gira sobre sí mismo formando una 'super-hélice' (supervueltas). Para una molécula relajada, $W_r = 0$ y por lo tanto $L_k = T_w$.

T_w es una propiedad estructural de la doble hélice en sí misma. Representa la rotación de una hebra sobre la otra y es determinada por el número de pares de bases por vuelta de la hélice ('helical pitch'). En el caso de DNA-B, T_w es igual al número total de bases de la molécula entre 10. T_w y W_r son propiedades geométricas de una molécula de DNA circular cerrado.

La variable L_k representa el número de veces que una hebra del DNA pasa sobre la otra en la molécula de DNA superenrollado. Este parámetro no varía cuando el DNA de doble cadena se enrolla o deforma, ya que ambas hebras permanecen intactas. Para cambiar L_k se requiere que se corte la molécula y antes de ligarla nuevamente, se modifique la posición de las hebras en relación

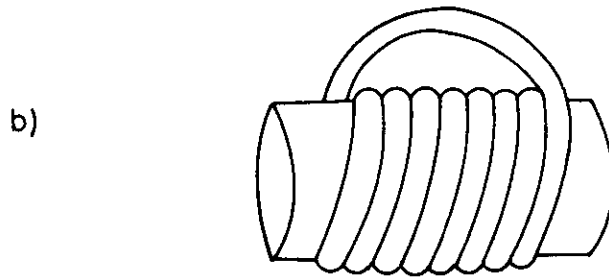
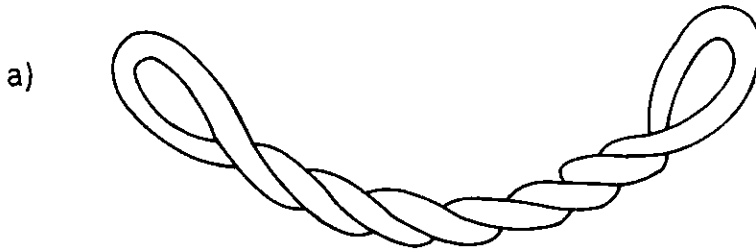


Figura 1.- Superenrollamiento del DNA
a) Plectonómico
b) Toroidal

a su posición original. Las enzimas que catalizan los cambios en L_k se denominan topoisomerasas (Bauer, 1980 y Crick, 1976).

El superenrollamiento además de tener un papel importante en el empaquetamiento del DNA, es esencial para el mantenimiento de la función celular normal, especialmente para procesos tales como replicación, transcripción y recombinación (Drlica, 1984).

Durante la replicación semiconservativa, los cambios topológicos del DNA son esenciales principalmente para el avance de la horquilla de replicación y para la separación de los dos cromosomas al final del ciclo de replicación. Para el inicio de un ciclo de replicación y para el avance de la horquilla se requiere que el DNA este superenrollado, posiblemente para que la tensión helicoidal contribuya energéticamente a la separación de las hebras. Al avanzar la horquilla de replicación se generan supervueltas positivas al frente de la misma. La separación de las hebras parentales atrás de la horquilla puede ser vista como un caso especial de SE negativo. En células procariontes la girasa remueve eficientemente las supervueltas positivas y permite el avance de la horquilla. En células eucariontes, esta función puede llevarse a cabo indistintamente por la topoisomerasa I o II, aunque la topoisomerasa I parece ser más eficiente debido a su alta procesividad en su actividad de relajación del DNA. Se sugiere que la topoisomerasa IV tiene el papel principal de separar a las dos moléculas hijas de DNA recién replicado (Drlica, 1992).

La transcripción también genera SE positivo en el templado de DNA al frente de la polimerasa y SE negativo hacia atrás de la enzima. La girasa y la topoisomerasa I son las enzimas que liberan a la molécula de esta tensión helicoidal y permiten que avance la RNA polimerasa (Steck, 1993).

Finalmente, con respecto a la recombinación, existen reportes de que la frecuencia de recombinación entre secuencias homólogas y la transposición de

elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, transposones) es mayor si el DNA esta superenrollado (Wang, 1985).

Proteínas del nucleóide

El nucleóide bacteriano contiene varias proteínas similares a las histonas de los eucariontes. Las proteínas identificadas como tipo histona en *E. coli* son: HU (HU-1 y HU-2); H1 o proteína H-NS; H y HLP1 (Gómez, C & Camacho, R. 1995). La proteína HU es pequeña, básica, abundante (60,000 copias por célula) y capaz de envolver al DNA en enrollamiento toroidal, similar al 'collar de perlas' de los nucleosomas de eucariontes. La proteína HU pura de *E. coli* se une al DNA como tetrámero, cubre aproximadamente 58 pb, cambia la altura de la hélice por vuelta de 10 pb a 8.5 pb y puede introducir supervueltas negativas en un DNA relajado. Estas proteínas forman parte de una familia de proteínas que se unen a DNA de dos hebras con baja especificidad en cuanto a la secuencias, forman complejos multiméricos que se extienden por segmentos largos y cambian importantemente la conformación del DNA en esa región (Schmid, M. 1988 y Schmid, M. 1990).

La proteína H1 o H-NS de 15.5 kDa es una proteína neutra que tiene aproximadamente 20,000 copias por célula. Esta proteína no esta relacionada con la histona H1 de eucariontes. La proteína H-NS pura se une fuertemente al DNA de dos hebras. Esta proteína es muy importante para la compactación del DNA y para la transcripción de varios genes (Owen, T. 1992 y Zuber, F. 1994).

La proteína H es el producto del gen *rpsC*, un gen que codifica para una proteína de la subunidad pequeña del ribosoma (Bruckner, R. 1989). Esta

proteína de 28 kDa, es una proteína básica con 20,000-120,000 copias por célula. Es posible que además de ser una proteína ribosomal esta proteína forme parte del nucleoide y contribuya a la compactación del DNA.

Además de HU, H-NS y H, en el nucleoide también se encuentra la proteína IHFb (10.6 kDa). La proteína IHF es similar a HU; sin embargo, a diferencia de ésta, se une a una secuencia específica. La especificidad de unión a esta secuencia depende en parte de las secuencias vecinas. La unión de IHF al DNA induce un doblamiento importante de la hélice. La proteína IHF también esta involucrada en la regulación de diferentes genes (Schmid, M. 1995).

La RNA polimerasa y las enzimas que determinan el grado de superenrollamiento del DNA en el nucleoide, las topoisomerasas I y II son también proteínas del nucleoide. Las topoisomerasas de DNA son enzimas que cortan y ligan al DNA cambiando su topología. La topoisomerasa I se localiza en la periferia del nucleoide y la girasa posiblemente se encuentra tanto en sitios dispersos del cromosoma como en los límites de los topodominios (Yang, Y. & Ferro-Luzzi Ames, G. 1992).

DNA Topoisomerasas

Las DNA topoisomerasas son esenciales en la célula para la regulación del nivel de superenrollamiento del DNA y para encadenar y desencadenar el cromosoma. El mecanismo mediante el cual estas enzimas cambian la topología del DNA es esencialmente el mismo: cortar una hebra, pasar la otra hebra a través del corte y ligar nuevamente el DNA. Esta reacción permite a una topoisomerasa afectar de manera distinta la conformación del DNA. Si el paso de la hebra ocurre entre dos moléculas de DNA diferentes (por ejemplo, dos plásmidos), estas dos moléculas quedan entrelazadas. Cuando una topoisomerasa actúa en dos segmentos diferentes de una misma molécula de DNA circular cerrado, entonces el nivel de superenrollamiento de la molécula se modifica, debido a que el número de veces que una hebra cruza a la otra cambia. Así, reacciones aparentemente similares pueden tener resultados diferentes. En general, las topoisomerasas requieren de iones magnesio, cortan reversiblemente y se unen covalentemente mediante una unión fosfodiéster al DNA en el sitio de corte. Esta unión se forma entre un grupo fosforilo del DNA en el sitio de corte y una tirosina de la topoisomerasa (Drlica, K. 1992).

Las topoisomerasas se clasifican en topoisomerasas tipo I y tipo II. Las topoisomerasas tipo I son endonucleasas que interaccionan preferentemente con DNA superenrollado, cortan una de las dos hebras, pasan la otra hebra a través del corte y ligan nuevamente el DNA. Estas enzimas no requieren ATP y causan el relajamiento progresivo del DNA superenrollado. Las topoisomerasas tipo II son endonucleasas que interaccionan preferentemente

con DNA relajado, requieren ATP, inducen un corte de doble hebra y cambian el valor de L_k en dos unidades por ciclo de reacción (Wang, J. 1996).

Topoisomerasas tipo I de E. coli

Topoisomerasa I

La topoisomerasa I (TopI) de *E. coli* es una proteína de 105 kDa codificada por el gen *topA*. Esta enzima cataliza *in vitro* las siguientes reacciones: 1) relaja moléculas de DNA superenrolladas negativamente, 2) encadena y desencadena círculos de DNA y 3) genera y resuelve nudos intramoleculares en DNA circular. Las reacciones 2) y 3) únicamente se realizan si existen cortes y regiones de hebra sencilla en las moléculas de DNA. En estas reacciones la enzima genera el equivalente a un corte doble al cortar la hebra frente al corte previo. Top I se une preferentemente a DNA de cadena sencilla. La Topoisomerasa I tiene una cierta especificidad por un pequeño heptámero y el corte ocurre cuatro nucleótidos a partir de la terminación 5' (Dean, F. B. & Cozzarelli, N. 1985; Wang, J. 1996).

Topoisomerasa III

La topoisomerasa III (TopIII) de *E. coli* es una proteína de 74 kDa codificada por el gen *topB*. Esta topoisomerasa presenta una actividad enzimática *in vitro* similar a Top I: corta una hebra del DNA, no requiere ATP, relaja moléculas superenrolladas negativas al disminuir el 'linking number' en una unidad por ciclo de reacción. Esta enzima también encadena, desencadena y genera y deshace nudos en moléculas circulares que presentan

cortes o regiones de hebra sencilla. A diferencia de TopI, TopIII requiere potasio, además de magnesio, reconoce también un heptámero de bases en el DNA pero el sitio de corte es seis nucleótidos a partir de la terminación 5'. Esta enzima funciona mejor a altas temperaturas, por ejemplo, TopIII relaja DNA superenrollado 15 a 20 veces más eficientemente a 52°C que a 30°C, mientras que TopI es sólo 2 veces más eficiente a 52°C que a 30°C (Digate, R. & Mariani, K. 1988; Digate, R. & Mariani, K. 1989).

En un sistema *in vitro* de replicación de plásmidos, se observó que TopIII puede desencadenar plásmidos durante la replicación, mientras que TopI no puede. Sin embargo, debido a que no es esencial para el crecimiento y la viabilidad de las células, parece ser que otras topoisomerasas pueden sustituir su función celular. Las mutaciones en el gene *topB* incrementan la frecuencia de mutaciones por pérdida del DNA; por lo que la topIII silvestre suprime la formación de estas deleciones (Shofield, M. *et al* 1992). Evidencias *in vitro*, basadas en substratos de preferencia y actividades enzimáticas relativas, sugieren que el papel celular de la topoisomerasa I es relajar DNA superenrollado, mientras que el de topoisomerasa III es desencadenar el DNA.

Topoisomerasas tipo II de E. coli

Topoisomerasa II ó Girasa

La enzima DNA girasa es un tetrámero compuesto de dos subunidades A y dos B. La subunidad A, codificada por el gene *gyrA*, tiene un peso molecular de 97 kDa, mientras que la subunidad B es codificada por el gene

gyrB y pesa 90 kDa. Ambas subunidades, A y B, contienen distintos dominios funcionales. La proteína A consiste de un dominio amino terminal (59-64 kDa) involucrado en el corte y reunión de las hebras de DNA y un dominio carboxilo (33 kDa) responsable de la unión con el DNA. La terminación 5' del DNA forma un enlace fosfodiéster con la tirosina 122 de la subunidad A. La proteína B consiste de un dominio amino terminal (43 kDa) el cual contiene el sitio de unión al nucleótido, y un dominio carboxilo terminal (47 kDa) que interacciona con la proteína A y con el DNA (Maxwell, A. 1995).

Todas las topoisomerasas son capaces de relajar el DNA superenrollado negativamente, pero sólo la girasa puede catalizar la introducción de supervueltas negativas en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP. En la ausencia de ATP, la girasa puede relajar DNA superenrollado negativamente; encadenar y desencadenar círculos de DNA y generar y resolver nudos intramoleculares en DNA circular. El mecanismo que se ha estudiado más a fondo es el de la introducción de supervueltas negativas. En la Fig. 2 se esquematiza un modelo de este mecanismo con los siguientes pasos: 1) la girasa se une a una región del DNA de aproximadamente 130 pb, lo que genera un superenrollamiento toroidal equivalente a la introducción de una supervuelta positiva (a). Esta tensión estructural se compensa con un giro negativo de la molécula; 2) la enzima realiza un corte de doble hebra (b) y las terminaciones 5' del DNA se unen covalentemente a un residuo de tirosina en cada una de las subunidades A; 3) una hebra de DNA se pasa a través de este corte de doble cadena y se religan las dos hebras de DNA cortadas (c y d). Al final, la girasa se separa del DNA y la topología de la molécula cambia (e). Este es el paso que probablemente está acoplado a la hidrólisis de ATP. No se conoce con precisión el mecanismo de translocación de la cadena de DNA a

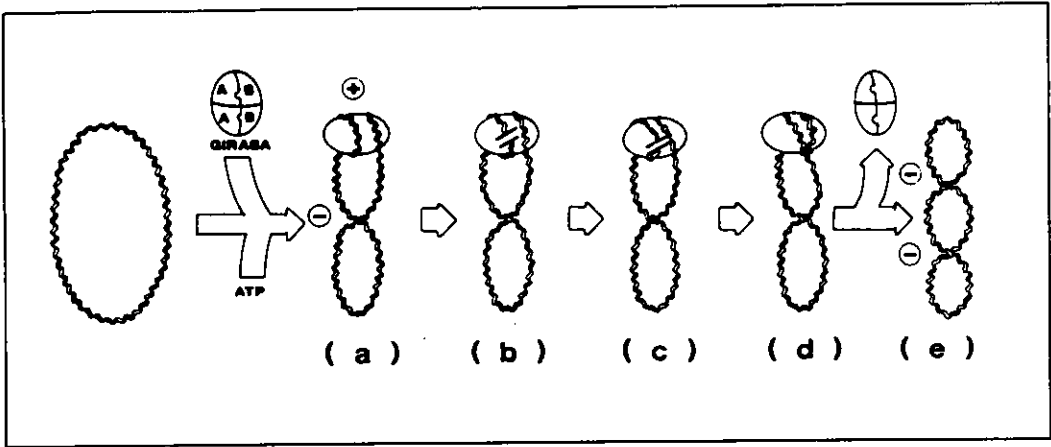


Figura 2. Actividad enzimática de la topoisomeras II o Girasa

Tomado de Gómez-Eichelmann, C. 1995.

través del corte, sin embargo, los últimos datos de difracción de rayos X del fragmento amino terminal de GyrB sugieren que las dos subunidades GyrB forman un especie de túnel por el cual se transloca el DNA. (Fig. 2, Maxwell, A. 1996).

Topoisomerasa IV

La topoisomerasa IV (Top IV) es una enzima tetramérica formada por dos proteínas ParE y dos ParC. La proteína ParE es de 70 kDa y la ParC de 75 kDa. La subunidad ParC es similar a GyrA; las proteínas son 46% idénticas en el extremo amino y 20% idénticas en el extremo carboxilo. Las proteínas ParE y GyrB son 40% idénticas (Luttinger, 1995). La TopIV es una enzima tipo II; requiere ATP y corta las dos hebras de DNA; sin embargo, no es tipo girasa. Las principales actividades *in vivo* de esta enzima son la de relajar DNA superenrollado y la de separar moléculas circulares encadenadas. *In vitro*, tanto topoisomerasa III como IV parecen tener una actividad más alta para desencadenar que la girasa (Jun-Ichi, K. 1992).

Las mutantes en *topA*, el gene para TopI, generalmente crecen lentamente y el DNA presenta un alto grado de superenrollamiento. Sin embargo, si en estas mutantes se sobreproducen ParE y ParC, las células crecen mejor y el DNA se encuentra menos superenrollado. Este dato sugiere que la actividad esencial de TopI, que es la de relajar al DNA, puede suplirse con un exceso de TopIV. Otra función importante de TopIV es la de desencadenar los cromosomas bacterianos durante la replicación. El desencadenamiento de estas moléculas requiere tanto TopII (girasa) como

TopIV. Ambas proteínas son necesarias para la segregación, aunque es probable que catalicen reacciones diferentes en este proceso. Se ha mostrado que la sobre-expresión de las dos subunidades de girasa puede suprimir una mutación temperatura-sensible (*ts*) en topoisomerasa IV, permitiendo un débil crecimiento. Esto sugiere que en estas condiciones experimentales, girasa es capaz de realizar la función de topoisomerasa IV, de desencadenar moléculas. Sin embargo, lo opuesto no es verdad: la sobre-expresión de TopIV no suprime una mutante girasa. Estos resultados indican que girasa tiene un papel único y esencial en la célula, probablemente su habilidad para introducir supervueltas en el DNA. Esta característica hace a TopIV más semejante a las topoisomerasas tipo II eucarióticas que a girasa. Una diferencia mas es que topoisomerasa IV esta asociada con la membrana interna. Esta asociación puede ser dependiente de DNA, debido a que se pierde después de un tratamiento con DNAasa. Se especula que TopIV se ancla a la membrana mediante una pequeña proteína de 26 KDa denominada ParF (Kato, 1988).

El superenrollamiento del DNA cambia en respuesta a estímulos ambientales.

El nivel del superenrollamiento (SE) del DNA *in vivo* es determinado principalmente por el balance entre las actividades opuestas de la topoisomerasa I y la DNA girasa (Fig. 3). Sin embargo, este delicado balance puede ser alterado por estímulos del medio ambiente. Varios estudios independientes han demostrado que los cambios ambientales parecen afectar la regulación del SE del DNA (Higgins & Dorman, 1988).

Por ejemplo, los cambios en la osmolaridad del medio de crecimiento alteran el 'linking number' del DNA intracelular. Un incremento *in vivo* en la osmolaridad extracelular incrementa el SE del DNA. A su vez, este cambio en la superhelicidad parece ser responsable de la inducción específica de por lo menos un gen (*proU*) el cual tiene un papel importante en la adaptación para el crecimiento a alta osmolaridad. Además, la selección para mutaciones que afecten la expresión de *proU* ha producido sólo mutaciones que alteran el SE del DNA, ya sea en *topA*, en *gyr* o en *osmZ* (actualmente *hns*). Este último gene codifica para la proteína H-NS que *in vivo* se une al DNA y modifica de manera importante el SE del DNA (Higgins, 1988).

Los cambios en la concentración de oxígeno en el medio de cultivo también modifican el SE del DNA. Por ejemplo, el DNA de las células en anaerobiosis presenta un nivel de SE mayor que el de las células en aerobiosis. Otro ejemplo es el gene *tonB* de *E. coli* y de *Salmonella typhimurium* que es altamente sensible a cambios en el SE del DNA. La expresión de *tonB* disminuye durante anaerobiosis pero se incrementa durante el crecimiento aeróbico cuando el fierro es oxidado a una forma soluble que

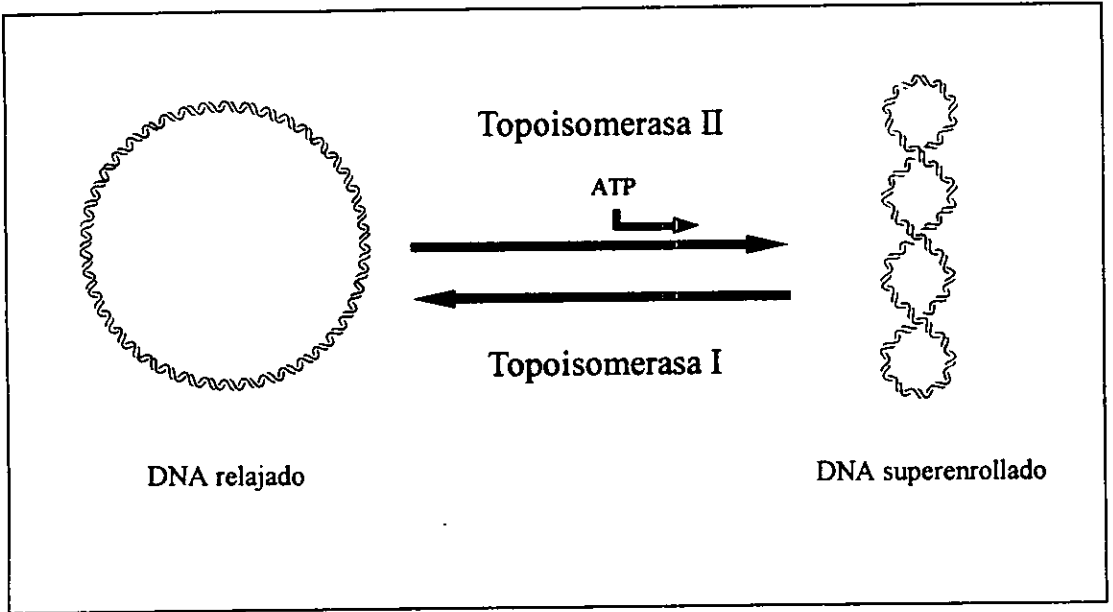


Figura 3. Modelo de la regulación homeostática del superenrollamiento

puede llegar a ser limitada. En este caso y a diferencia del gene *proU*, *tonB* incrementa su expresión al relajarse el DNA (Dorman, 1988).

In vitro, un cambio de temperatura altera el 'helical pitch' y así, altera el nivel de SE. Un incremento en la temperatura induce una disminución en la superhelicidad del DNA. Sin embargo, los experimentos fisiológicos con un plásmido reportero mostraron que los plásmidos aislados de células que crecían a 37°C estaban más superenrollados que los plásmidos de células que crecían a 17°C. La interpretación de estos resultados fue que un aumento de temperatura disminuye temporalmente el SE del DNA intracelular y que en respuesta a esta disminución la girasa se "favorece" hasta que se recobra el nivel de SE que se tenía antes del cambio (Drlica, 1984).

En nuestro laboratorio se realizaron experimentos similares para determinar si este fenómeno se presenta también en la respuesta celular a estrés calórico. Para esto, las bacterias se crecieron a 30°C y se expusieron a 42°, 45°, 47° y 50°C. Los plásmidos aislados de las células expuestas por 10 y 15 minutos a temperaturas altas, 45°, 47° y 50°C, mostraron un incremento en el nivel del SE del DNA. Este cambio en la superhelicidad del plásmido fue menos pronunciado cuando las células se expusieron a 42°C (Camacho, *et al* 1995).

Para determinar si este incremento era catalizado por girasa, se utilizó novobiocina, un inhibidor específico de girasa. La novobiocina inhibió el incremento en el SE del plásmido inducido por la exposición de las células a 47°C por 10 min. Este resultado sugiere que la girasa está directamente involucrada en el incremento del SE del plásmido inducido por calor. Adicionalmente se estudió el efecto del cloranfenicol sobre el incremento del

SE del plásmido durante el estrés por calor. El antibiótico inhibió este incremento; sin embargo, cuando el cloranfenicol se adicionó 5 minutos después del aumento de temperatura, sólo causó una inhibición parcial del incremento en el SE del plásmido. Estos resultados sugieren que el cloranfenicol inhibe la traducción de una o varias proteínas sintetizadas durante los primeros minutos del estrés calórico, necesarias para inducir este incremento del SE del DNA (Camacho, *et al* 1995).

Ya que girasa no es activa *in vitro* a temperaturas altas (46°C) (Peebles, C. 1978) y no está descrita como proteína de estrés calórico, Camacho y colaboradores sugieren que las proteínas de estrés calórico mantienen la actividad de girasa a temperaturas altas. En este trabajo se presentaron además resultados preliminares que sugieren, que las principales chaperonas GroE y DnaK no participan en proteger a la girasa durante el estrés calórico.

Los resultados de nuestro laboratorio, más los de Mizushima *et al*, (1993) muestran que el DNA de células expuestas a temperaturas altas (44°, 47°, 51° y 53°C) se relaja rápida y transitoriamente (2 min), pero la superhelicidad del DNA se recupera al nivel original en 10-15 minutos. Estos resultados sugieren que durante los primeros minutos de un aumento de temperatura el DNA se relaja pero la respuesta celular incluye mecanismos para recobrar el nivel del superenrollamiento que se tenía antes del cambio de temperatura. En la relajación inicial del DNA posiblemente están involucradas la topoisomerasa I y la girasa (Mizushima, *et al*, 1994).

Recientemente Ogata, Y. *et al*, 1996, sugirieron que en la recuperación posterior del nivel del SE, son requeridas las proteínas de estrés calórico (PEC). Evidencias bioquímicas y genéticas indican que DnaK (PEC) está

involucrada en la recuperación del SE del DNA. Sin embargo, en este trabajo se usó una cepa mutante que no tiene DnaK y extractos celulares para estudiar el papel de DnaK en el SE del DNA durante un estrés calórico. Una bacteria sin DnaK presenta alteraciones fisiológicas importantes y en los extractos celulares están presentes otras proteínas que pueden o no estar involucradas con el SE del DNA.

Es importante señalar que si bien existen diversos cambios ambientales que afectan el nivel de SE del DNA, nuestro interés está enfocado en estudiar el SE durante el estrés calórico. Por este motivo, en la segunda parte de la introducción se dará un panorama general de la respuesta celular al estrés por calor. Se dirigirá la atención a las proteínas de estrés calórico más que a la regulación del estrés en sí. Actualmente se conoce una variedad de familias de chaperonas (un tipo de PEC); sin embargo, sólo nos ocuparemos de los dos sistemas mejor conocidos en *E. coli*: GroE y DnaK. Además, se encuentra ampliamente documentado que estos dos sistemas son capaces de reactivar a proteínas desnaturalizadas por agentes químicos o por temperatura, lo cual es de gran interés para el presente trabajo.

Respuesta celular al estrés por calor.

La respuesta a estrés por calor es una respuesta conservada desde las bacterias hasta los humanos y se caracteriza por un aumento rápido y transitorio en la síntesis de un conjunto específico de proteínas, denominadas proteínas de estrés calórico (PEC) (Neidhardt, 1987). En *E. coli*, la expresión de los genes de las PEC se regula positivamente por al menos dos factores sigma: sigma 32 y sigma E (sigma 24) y negativamente por tres PEC, DnaK, DnaJ y GrpE (Yura, 1993).

Sigma 32, el producto del gene *rpoH*, le confiere a la RNA polimerasa la especificidad para transcribir los genes de estrés calórico. Los estudios sobre el regulón de σ^{32} muestran que conforme la temperatura se incrementa, se requiere una concentración más alta de PEC para la viabilidad de la célula. Por ejemplo, la tasa de síntesis de GroEL es menor al 1% de la proteína celular total a 30°C, pero llega a ser más del 20% del total de la proteína celular a 46°C. Esta correlación no es casual. Al variar la concentración de σ^{32} en la célula se observó que más σ^{32} resulta en más PEC y permite el crecimiento a temperaturas altas. Adicionalmente, estudios en cepas con inserciones o deleciones en el gene *rpoH*, indican que estas mutantes son extremadamente sensibles al calor, y son viables sólo a temperaturas menores o iguales a 20°C.

En general, la respuesta a estrés representa un mecanismo de defensa celular. Algunas de las proteínas de estrés sirven como chaperonas moleculares, cuya función es unirse a proteínas parcialmente plegadas y promover su plegamiento limitando las interacciones no productivas que dan lugar a la agregación o al plegamiento incorrecto de los polipéptidos. En *E.*

coli se han descrito varias familias de chaperonas: Hsp90 (HtpG), Hsp70 (DnaK), Hsp60 (GroEL) y SecB principalmente.

En *E. coli* HtpG es la proteína homóloga de Hsp90, muestra aproximadamente 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos con las proteínas eucarióticas. HtpG es una proteína moderadamente abundante a temperaturas normales y es fuertemente inducida por calor; sin embargo, la deleción del gene *htpG* no afecta el crecimiento a temperaturas normales y sólo produce una reducción muy sutil en el crecimiento a altas temperaturas. Además, las mutantes en *htpG* muestran una respuesta normal al ayuno de carbono (Gross, 1996).

Las familias de chaperonas Hsp70 (DnaK) y Hsp60 (GroEL) son las más importantes en generar el plegamiento adecuado de las proteínas en las células. Por lo tanto más adelante se hablará en extenso sobre estas proteínas.

SecB es una clase de chaperona que esta involucrada en transferir proteínas recién sintetizadas a través de la membrana a los compartimentos celulares a los cuales son destinados para funcionar. SecB forma parte de un conjunto de proteínas denominado el complejo translocasa, constituido por: SecA, SecY, SecE, SecD y SecF. Dentro de este complejo, las funciones principales de SecB son mantener a los polipéptidos unidos en un estado competente para translocarse a través de la membrana y entregarlos a SecA, la cual a su vez interactúa con las proteínas de membrana SecY y SecE. El paso del polipéptido a través de la membrana mediado por el complejo de la translocasa requiere la hidrólisis de ATP por SecA. En el lado periplásmico de la membrana la peptidasa líder remueve el péptido señal para generar la terminación amino madura. Las proteínas SecD y SecF tienen el papel final en este proceso, posiblemente relacionado con el plegamiento y la liberación de la proteína madura (Randall, 1994).

Un segundo grupo de las PEC son las proteasas, las cuales funcionan degradando proteínas dobladas incorrectamente o anormales. Todas las proteasas que son parte del regulón sigma 32 son dependientes de ATP. Estas proteasas reconocen y seleccionan a sus proteínas blanco en un ambiente donde se encuentran otras proteínas que no requieren ser degradadas (Gross, 1996).

El gene *lon* de *E. coli* codifica para una proteína de 88 kDa que funciona como un oligómero de cuatro subunidades. La proteína Lon es una serina 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 tiene un papel muy importante en este proceso.

El hecho de que las cepas que no tienen el gene *lon* exhiben una degradación significativa de proteínas anormales de manera dependiente de ATP dio lugar para investigar sobre más proteasas dependientes de ATP y esto resultó en el descubrimiento de una proteasa de dos componentes, 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 seis subunidades de ClpA, sugiriendo una organización estructural similar a la del proteosoma 26S. Existe una segunda subunidad regulatoria para ClpP llamada ClpX. ClpXP forma una proteasa dependiente de ATP diferente con una especificidad de sustrato única. Tanto ClpA como ClpX solas funcionan como chaperonas. ClpA convierte la proteína dimerica RepA del bacteriofago P1 a la forma del monómero activo. ClpX por su parte, puede desensamblar la proteína λ O y prevenir su agregación inducida por 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 λ 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 combina con una peptidasa completamente diferente, ClpQ, para formar una proteasa dependiente de ATP llamada ClpYQ o HslU (Gottesman, S. 1997).

Finalmente, es importante mencionar que recientemente se describió una proteína de estrés calórico, FtsH/HflB, como una proteasa que tiene un papel muy importante en la proteólisis de sigma 32. Así, por lo menos una proteasa inducida por calor autoregula negativamente la respuesta de estrés por calor (Morimoto, R. 1994).

Chaperona Molecular.

Las chaperonas moleculares tienen la propiedad general de interaccionar 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 ensamblaje correcto de otros polipéptidos, prevenir la agregación de proteínas bajo condiciones de estrés y, finalmente, degradar proteínas mediante la presentación de la proteína sustrato a proteasas (Craig, E. 1993).

Chaperonina.

Las chaperoninas comprenden un subgrupo de las chaperonas. Ellas son grandes complejos cilíndricos que consisten de dos anillos unidos de siete a nueve subunidades cada uno. La chaperonina de eubacteria GroEL y su homólogo en mitocondria Hsp60 son homo-oligoméricas, mientras que las proteínas homólogas en cloroplastos (proteína que se une a la subunidad de la RUBISCO) esta compuesta por números iguales de dos subunidades altamente relacionadas llamadas alfa y beta (Rassow, J. 1997).

Las chaperonas de las familias Hsp70 (DnaK) y Hsp60 (GroEL) tienen un papel importante en el plegamiento adecuado de las proteínas en la célula. Los miembros de la familia Hsp70 previenen la agregación de proteínas que se generan durante condiciones de estrés o disocian a las proteínas agregadas y median la reactivación de proteínas inactivadas por un aumento de temperatura (ver Tabla 1a). Los miembros de la familia Hsp60 promueven el plegamiento correcto de proteínas que se exportan a la membrana citoplásmica así como el ensamblaje de proteínas oligoméricas, y también se requieren para prevenir la inactivación por temperatura de varias proteínas (ver Tabla 1b).

TABLA 1a. Proteínas sustrato de las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE.

| Proteína | Peso Molecular | Método de desnaturalización | Estequiometría ^a | ATP |
|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| Luciferasa | 100 kDa | Temperatura | 1/5/2/5 | 1 mM |
| RNA polimerasa | 465 kDa | Temperatura | 1/19/1/17 | 4 mM |

^arelación μM enzima sustrato/DnaK/DnaJ/GrpE.

TABLA 1b. Proteínas sustrato de las chaperonas GroEL-GroES.

| Proteína | Peso Molecular | Método de desnaturalización | Estequiometría ^b | ATP |
|-------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|
| Dihidrofolato reductasa | 20 kDa | Temperatura | 1/3/4 | 10 mM |
| Malato deshidrogenasa | 70 kDa | Temperatura | 1/3.4/6.2 | 1.5 mM |
| Rodanasa | 33 kDa | Temperatura | 1/25/25 | 2 mM |
| Rubisco | 560 kDa | 6 M Guanidina-HCl | 1/37/46 | 2 mM |
| RNA polimerasa | 465 kDa | Temperatura | 1/7.2/7.8 | 4 mM |

^brelación μM enzima sustrato/GroEL/GroES.

Principales sistemas de chaperonas en *E. coli*:

I. Sistema DnaK, DnaJ y GrpE.

Proteína DnaK.

La proteína DnaK pertenece a la familia de chaperonas moleculares Hsp70, con una masa molecular aproximada de 70 KDa. DnaK es la Hsp70 de *Escherichia coli* y participa en una variedad de funciones celulares básicas: la sobrevivencia de la bacteria bajo condiciones de estrés; la iniciación de la replicación de los bacteriófagos λ y P1 y del DNA de *E. coli*; la regulación de la división celular; la síntesis de DNA y RNA; la secreción y plegamiento de proteínas y la modulación de la proteólisis (Georgopoulos, C. & Liberek, K. 1990; Gross, C. 1990).

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. Entre los aminoácidos que interactúan fuertemente con DnaK se encuentran: isoleucina, leucina, valina y fenilalanina (Gilbert, R. 1993). Estudios recientes demostraron que DnaK se une a las proteínas a nivel de ciertas secuencias de péptidos de aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos. Sin embargo, la interacción de DnaK con aminoácidos únicos sugiere que podría unirse a aminoácidos hidrofóbicos que no están contiguos en la cadena polipeptídica, lo cual podría ayudar en el control del colapso hidrofóbico durante el plegamiento de proteínas (Gragerov, A. & Gottesman, M. 1994).

Es claro que la actividad de ATPasa de las Hsp70 es crucial para su función biológica. La proteína DnaK posee una actividad débil de ATPasa dependiente del ión K^+ y es regulada por sus co-chaperonas DnaJ y GrpE así como por su polipéptido substrato (Zylicz, *et al.* 1983). Por ejemplo, DnaJ estimula su actividad de ATPasa en un orden de 2 a 3 veces, mientras que el efecto combinado de DnaJ y GrpE incrementa la hidrólisis de ATP hasta 50 veces; sin embargo, el efecto principal de GrpE es incrementar la tasa de liberación de ATP o ADP unido a DnaK. Por otra parte, la presencia del péptido substrato estimula esta actividad de 2 a 20 veces (Liberek, K. 1991).

Todos los miembros de la familia Hsp70 consisten de tres dominios: el dominio amino terminal de aproximadamente 40 kDa que contiene el sitio de unión a ATP, magnesio y a la co-chaperona GrpE (DnaK residuos 1 a 385); el dominio carboxilo terminal proximal de 25 kDa (386 a 538) que lleva el sitio de unión al péptido y un dominio carboxilo terminal distal (539 a 638) que podría incluir el sitio de unión para la co-chaperona DnaJ (Hartl, F. 1994).

En un trabajo realizado con Hsc70 de bovino se observó que el dominio de ATPasa consistía de dos subdominios separados por una hendidura central profunda. Dos alfa hélices conectan a los dos subdominios y dividen la hendidura en una hendidura superior en la cual el nucleótido y el magnesio se unen y una hendidura baja. La unión de estas moléculas es vía un glutamato altamente conservado (E171 para DnaK). Se ha demostrado que E171 es esencial para el acoplamiento de la actividad de ATPasa con la unión y liberación del substrato y que este acoplamiento se requiere para la función de chaperona de DnaK tanto *in vivo* como *in vitro*. Se propone que el cambio conformacional dependiente de ATP en el dominio de ATPasa induce

cambios conformacionales en el sitio de unión al sustrato en el dominio carboxilo terminal proximal que subsecuentemente causa la liberación del sustrato unido (Buchberger, A. 1994). DnaK en conjunto con las co-chaperonas DnaJ y GrpE forman una maquinaria que es esencial para llevar a cabo una variedad de procesos celulares.

Proteína DnaJ.

DnaJ es un miembro de la familia de chaperonas Hsp40. Su masa molecular aproximada es de 44 kDa, funciona como dímero y se ha determinado que la región amino terminal (residuos 2 a 108) 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 tales en DnaK que estabiliza el complejo entre el péptido sustrato y la proteína DnaK (Gross, C. 1996; Szyperski, T. 1994; Schröder, H. 1993).

Proteína GrpE.

GrpE es una proteína de aproximadamente 23 KDa que funciona como dímero. Se ha reportado que GrpE 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. GrpE actúa como un intercambiador del 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 Mg^{2+} , también debilita las interacciones de Mg^{2+} con el nucleótido antes de su liberación (Zylicz, M. 1987; Skowrya, D. 1995).

Ciclo de reacción de las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE.

DnaK, DnaJ y GrpE forman un equipo de chaperonas que tienen como función básica el plegamiento de proteínas, mediante la unión y liberación de las proteínas blanco. El mecanismo de acción de estas chaperonas es actualmente un tema de gran debate. Sin embargo, el conocimiento que ya se tiene sobre estas chaperonas permite proponer un modelo de acción (Fig. 4). En condiciones fisiológicas, DnaK está en su forma unida a ATP con una baja afinidad por los polipéptidos desdoblados. La proteína desdoblada se une primero a DnaJ (1). De esta manera el polipéptido sustrato es presentado a la forma de DnaK*ATP formándose así el complejo DnaJ-sustrato-DnaK*ATP (2). La interacción de DnaJ con DnaK estimula la hidrólisis del ATP unido a DnaK; como resultado, la forma DnaK*ADP se une más estrechamente al péptido sustrato. Probablemente el sustrato también estabilice esta interacción al acelerar la conversión de ATP a ADP. El papel de GrpE es entonces catalizar la disociación del ADP unido a DnaK y permitir la reunión de ATP (3), lo cual induce el estado de baja afinidad de DnaK y da como resultado la liberación del polipéptido sustrato(4). En este punto, el complejo DnaK-GrpE también se disocia. Después de su liberación, el sustrato tiene la opción de doblarse en su estado nativo, ser transferido a otro sistema de chaperonas (GroEL-GroES) o reunirse a DnaJ y DnaK para completar su plegamiento (Gross, C. 1996; Frydman, 1994).

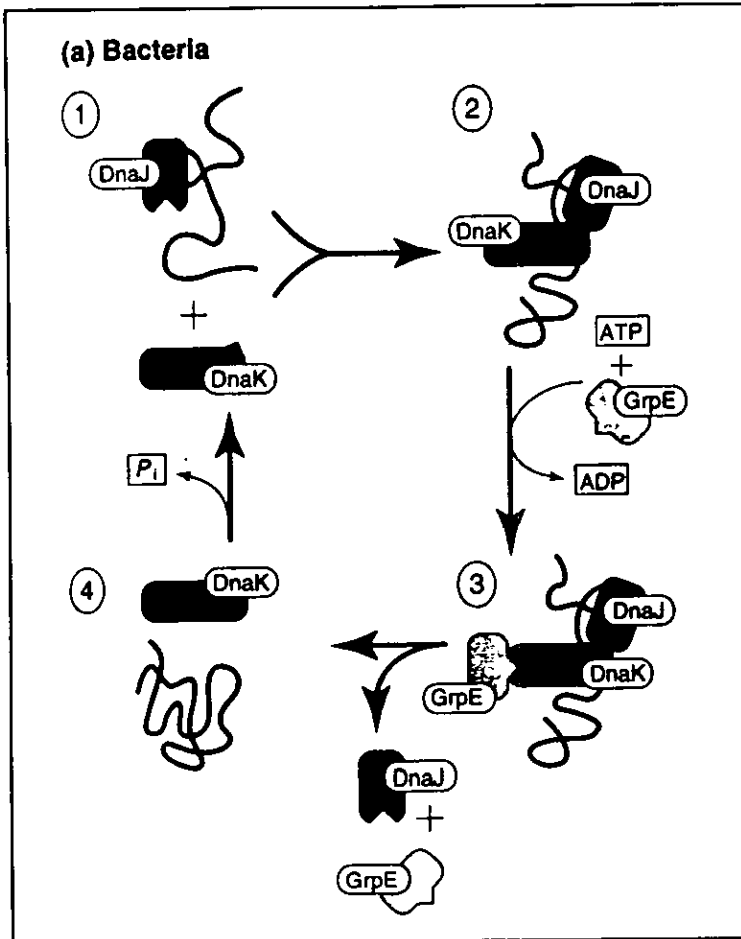


Figura 4. Modelo del ciclo de reacción de DnaK, DnaJ y GrpE en el plegamiento de proteínas.

II. Sistema de Chaperonas GroEL-GroES.

GroEL es un miembro de las chaperoninas, una familia de chaperonas moleculares con actividad de ATPasa que previenen las asociaciones incorrectas dentro y entre cadenas polipeptídicas durante el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y la protección de proteínas pre-existentes durante un estrés celular. GroEL coopera en estos procesos con la cochaperonina de un sólo anillo GroES.

Proteína GroEL.

GroEL es una proteína oligomérica compuesta de dos anillos heptaméricos unidos espalda con espalda de aproximadamente 58 kDa cada subunidad. Estas subunidades están plegadas en tres dominios distintos: 1) el dominio ecuatorial que comprende los residuos 6-133 y 409-523, este dominio 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 (residuos 134-190 y 377-408) que conecta el dominio ecuatorial con el apical y 3) el dominio apical (residuos 191-376) que forma la abertura del cilindro y expone residuos hidrofóbicos hacia la cavidad que podrían interactuar con las superficies hidrofóbicas del polipéptido sustrato. La cristalografía de la proteína GroEL de *E. coli* a 2.8 amstrongs (Å) de resolución, mostró un poro cilíndrico con las siguientes dimensiones: 137 Å de diámetro, 146 Å de altura y aproximadamente 47 Å de diámetro de la cavidad interna. Sin embargo, el nivel del dominio interno

puede expandirse hasta un máximo de aproximadamente 90 Å, ampliando así el diámetro del canal. Además de las aberturas de arriba y de abajo del cilindro, hay siete ventanas elípticas que conectan el exterior con el canal central. Estas ventanas podrían servir como rutas de entrada y salida para el ATP. Estas ventanas podrían también extender la superficie viable de unión al péptido y reducir la restricción estérica para el movimiento del dominio alostérico (Braig, K. 1994; Hartl, F. 1994; Schmidt, M. 1994).

Proteína GroES.

GroES es un anillo heptamérico único con subunidades de masa molecular relativa de 10 kDa. Esta proteína forma un domo de aproximadamente 75 Å de diámetro, 30 Å de altura y un orificio de 8 Å en el centro de su techo. Estudios de micrografía electrónica mostraron que GroES se coloca como una tapa sobre la parte superior de uno de los dos polipéptidos uniéndose a la cámara de GroEL en un complejo estable GroEL₁₄-GroES₇-ADP₇. La unión de GroES a GroEL es mediada por una 'asa móvil' de GroES, un segmento de 16 residuos en cada subunidad que es móvil en el heptámero libre pero que se inmoviliza cuando se une a GroEL (Frydman, 1996; Hunt, J. 1996).

Los estudios de microscopía electrónica indican que la unión de GroES a uno de los anillos de GroEL, induce un cambio conformacional que a su vez induce un incremento en el volumen de la cavidad central, de aproximadamente dos veces. Los análisis mutacionales sugieren que GroES y el polipéptido substrato muestran un sitio de unión hidrofóbico común en GroEL. GroES podría inicialmente hacer contacto con la superficie externa

del cilindro de GroEL, produciendo un movimiento en el dominio más alejado y así desplazar transitoriamente al polipéptido sustrato en la cavidad para su plegamiento.

Adicionalmente se ha observado que la unión del nucleótido a los dominios ecuatoriales de GroEL, causan rotaciones grandes en los dominios apicales, los cuales contienen los sitios de unión a la proteína sustrato y a GroES. Es claro que tanto la unión de GroES como la hidrólisis de ATP actúan para modular la función de GroEL (Hartl, F. 1994).

Mecanismo de acción de las chaperoninas GroEL-GroES.

Existe una amplia variedad de datos experimentales sobre el posible papel de GroES y ATP en modular la acción de GroEL en el plegamiento de proteínas, pero no hay un acuerdo común al respecto. Sin embargo, se puede proponer un posible modelo de acción de este sistema de chaperoninas (Fig. 5). En el primer paso el polipéptido desdoblado se une a un complejo asimétrico GroEL₁₄-GroES₇. Ya que el sitio de unión en uno de los anillos está ocupado por GroES, la asociación de la proteína no nativa sólo puede ocurrir en el anillo distal a GroES (*trans*). Este evento por sí mismo junto con la unión y la hidrólisis de ATP en el anillo *trans* causa la disociación de GroES (paso 2 y 3). GroES, junto con ATP, ahora puede unirse al otro anillo de GroEL, aparentemente con igual oportunidad. No obstante, sólo la unión al anillo que contiene el polipéptido permite el plegamiento de la proteína. En este punto, GroES encierra al polipéptido en la cavidad de GroEL donde lo

dobra a medida que la pared de la cavidad cambia de hidrofóbica a hidrofílica (pasos 4 y 5). Cuando el ATP es hidrolizado en el anillo *trans*, se libera el ADP y la tapa GroES unida al anillo *cis* que contiene al polipéptido (pasos 6 a 3). La proteína doblada sale rápidamente por difusión después de que se abre el doble anillo de GroEL, mientras que los polipéptidos que aún tienen un plegamiento incompleto pueden ser recapturados a medida que los sitios de unión hidrofóbicos de GroEL esten disponibles (paso 3). Generalmente se llega al estado nativo de una proteína después de varios ciclos como el que se acaba de describir (Lin, Z. 1996; Manajit, K. 1996; Martín, J. 1993; Mendoza, J. 1996; Murai, N. 1996; Roseman, A. 1996; Weissman, J. 1995; Weissman, J. 1996).

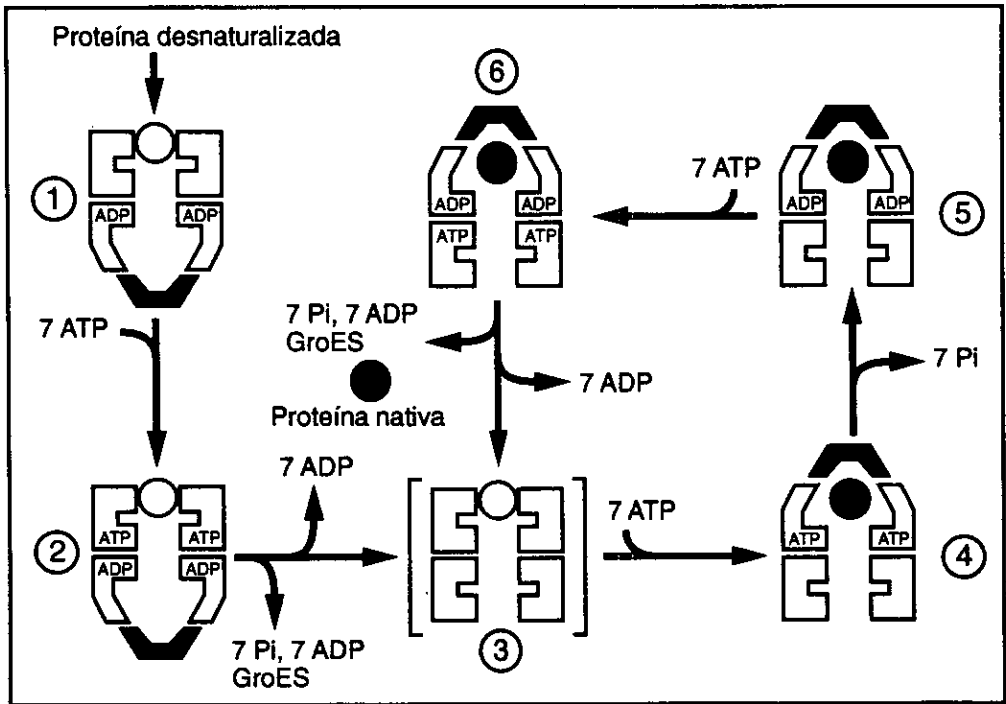


Figura 5. Modelo del ciclo de reacción de GroEL- GroES en el Plegamiento de proteínas.

ANTECEDENTES

In vitro la actividad de la girasa disminuye a temperaturas elevadas (46°C) (Peebles, 1978). Sin embargo, *in vivo*, un aumento repentino de temperatura (30° a 47°C) incrementa el grado de SE de un plásmido reportero (Camacho, 1995). Cloranfenicol y novobiocina bloquean el incremento, inducido por calor, en el superenrollamiento del plásmido. Estos resultados sugieren que girasa y proteínas sintetizadas durante el estrés por calor son responsables del cambio observado en el superenrollamiento del plásmido.

HIPOTESIS

A partir de estos antecedentes nosotros planteamos como hipótesis de trabajo que, la girasa disminuye su actividad por un incremento en la temperatura; sin embargo, proteínas como DnaK y GroE, sintetizadas en los primeros minutos de la respuesta a estrés por calor, en conjunto con la girasa, pudieran ser las responsables del superenrollamiento a altas temperaturas.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad de la girasa y el superenrollamiento del DNA en la respuesta a estrés por calor.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se planteó un diseño experimental que constara de una parte *in vivo* y una parte *in vitro*. En la sección correspondiente a experimentos *in vivo* se trabajó con un conjunto de cepas de *E. coli* mutadas en los genes *rpoH*, *dnaK*, *groE* ó en ambos *dnaK groE* y sus correspondientes cepas isogénicas. Estas cepas previamente transformadas con el plásmido pMS01, se sometieron a un estrés por calor por tiempos variables: 2 y 15 min a 47°C ó 2 y 10 min a 50°C; después, mediante una técnica de lisis alcalina se extrajo el DNA del plásmido de las bacterias. Posteriormente este DNA se analizó en geles de agarosa con cloroquina.

Por otra parte, se montó un sistema *in vitro* para estudiar la actividad de la enzima DNA girasa a 50°C en presencia y ausencia de las chaperonas DnaK y GroE. Dentro de este sistema *in vitro* se trabajó con dos protocolos: un protocolo llamado de protección y uno de reactivación. En el primero se trabajó con todas las proteínas (girasa, DnaK y/o GroE) desde el inicio del estrés calórico; mientras que en el segundo, primero se sometió a estrés a la girasa sola y después se adicionaron las chaperonas DnaK y/o GroE. Las relaciones estequiométricas que deben guardar estas proteínas en el ensayo fueron tomadas básicamente del siguiente trabajo: “Both the *Escherichia coli* chaperone systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase.” de Ziemienowicz, A. et al. 1993. En este trabajo se plantea una hipótesis muy similar a la nuestra: una proteína desnaturalizada por calor es reactivada por los dos principales sistemas de chaperonas en *E. coli*: DnaK y GroE. Además, esta proteína muestra cierta similitud con la Girasa, ambas son proteínas oligoméricas y tienen afinidad

por el DNA. Por lo que nos pareció un buen trabajo de referencia para montar nuestro sistema *in vitro*. Adicionalmente, también se analizó el DNA que funcionó como sustrato de la girasa; pero en esta ocasión se hizo mediante geles de agarosa en buffer TAE sin cloroquina.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas bacterianas que se usaron en este trabajo se enlistan en la Tabla 2. El plásmido pHOT1 se compró a TopoGEN, como moléculas de plásmido relajado. El plásmido pMS01 Ap^R Tc^S es un plásmido derivado de pBR322 al cual se le deletó el fragmento *EcoRI-PvuII* (León *et al*, 1988).

2. Enzimas.

La enzima **DNA girasa** de *Escherichia coli* se obtuvo de Lucent, Inglaterra. La enzima fue proporcionada en una concentración de 5U/μl en 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA y 50% (w/v) glicerol.

Las chaperonas fueron adquiridas de Stress Gen, Biotechnologies Corp. Todas las proteínas fueron purificadas de *Escherichia coli* y proporcionadas de la siguiente forma:

GroEL (3.6 mg/ml) en 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT y 0.05% azida de sodio.

GroES (1.77 mg/ml) en 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 80 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 4 mM DTE, 0.04% azida de sodio y 20 % glicerol.

DnaK (0.92 mg/ml) en 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT y 0.1 mM PMSF.

DnaJ (2.3 mg/ml) en 25 mM Hepes/KOH (pH 7.2), 100 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT y 10% v/v glicerol.

GrpE (10.2 mg/ml) en 25 mM Hepes/KOH (pH 7.2), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EGTA y 10 % v/w sacarosa.

TABLA 2. CEPAS BACTERIANAS DE *E. COLI*

| Cepa | Genotipo más importante | Referencia |
|-----------------------|--|-----------------------|
| MC4100 ^a | F ⁻ araD139Δ(argF-lac)U169 rpsL relA flbB deoC pstF rbsR | Casadaban, M. (1976) |
| KY1603 ^a | MC4100 ΔrpoH30 :: kan zhf50 :: Tn10 (λpF13-PrpoD _{hs} -lacZ) | Kusukawa, N. (1988) |
| NKR117 ^b | MC4100 zje: :Tn10 groEL44 | Yura, T. (1989) |
| KI470 ^b | MC4100 zje: :Tn10 groES619 | Yura, T. (1989) |
| MC1061 ^c | ΔlacX74 galK galU Δ(ara-leu)7697 araD139 hsdR | Casadaban, M. (1976) |
| CAG13093 ^c | MC1061 thr: :Tn10 dnaK756 | Gross, C. (1992) |
| CAG13128 ^c | MC1061 thr: :Tn10 dnaK302 | Gross, C. (1992) |
| CAG13350 ^c | MC1061 thr: :Tn10 dnaK204 | Gross, C. (1992) |
| Ω 394 ^d | F ⁻ sup ^o galKTE-P _R -λcl857indl-P _L -Nam7,53 thr: :Tn10 | Gaitanaris, G. (1990) |
| Ω 419 ^d | Ω 394 thr::Tn10 dnaK756 | Gaitanaris, G. (1990) |
| Ω 585 ^e | Ω 394 dnaK756 groEL100 groES ⁺ : :Tn10 | Gragerov, A. (1992) |
| Ω 587 ^e | Ω 394 dnaK756 groEL ⁺ groES30: :Tn10 | Gragerov, A. (1992) |

^a Donada por el Dr. T. Yura.

^b Donada por el Dr. Koreaki Ito.

^c Donada por la Dra. Carol Gross.

^d Donada por el Dr. Max E. Gottesman.

^e Donada por el Dr. George A. Gaitanaris.

METODOS

1. *Condiciones de crecimiento.*

Los cultivos bacterianos se iniciaron a partir de un precultivo de 12 a 16 hrs, el cual se diluyó 2:100 en medio Luria fresco. Este cultivo se creció en matraces nefelométricos de 125 ml a 30°C y en agitación a 180 rpm. El crecimiento bacteriano se siguió por medio de lecturas de unidades de absorbancia a 550 nm, hasta que el cultivo alcanzó un crecimiento exponencial: $D.O_{550nm}=0.4$, que equivale a aproximadamente 1×10^8 células/ml.

Cuando las células se sometieron a estrés calórico, los cultivos en crecimiento exponencial se transfirieron a matraces precalentados a la temperatura de estrés (47° ó 50°C) y se incubaron con agitación a esta temperatura por 2 ó 15 min.

2. *Transformación bacteriana con el plásmido pMS01.*

Todas las cepas que se enlistan en la Tabla 1 se transformaron con el plásmido pMS01. El plásmido se obtuvo a partir de lisados alcalinos celulares según la técnica de Sambrook, J. *et al* 1989. Para las transformaciones, cada cepa se creció a una $D.O_{550 nm}$ de 0.4, se tomó 0.5 ml de cultivo, se adicionó 0.5 ml de TSS 2X y se mezcló manualmente. De esta mezcla se tomaron 100 μ l y se añadió 1 μ l del plásmido pMS01 (1 μ g/ μ l). La mezcla se incubó 30 min en hielo;

posteriormente 5 min a 43°C y se regresó a hielo. Después se adicionaron 900 µl del Luria fresco y se incubó por 1 hr a 30°C.

Finalmente se sembraron varias alícuotas de aproximadamente 200 µl cada una en cajas de medio Luria con ampicilina (200 µg/µl) como medio de selección.

3. *Obtención de la distribución de topoisómeros del plásmido pMS01.*

a) *Purificación del plásmido pMS01.*

Para los plásmidos se siguió el método de Sambrook, *et al* al que se le hicieron varias modificaciones. A continuación se describe en detalle el método que se utilizó:

Se puso un cultivo por toda la noche de la cepa en medio Luria con Carbecin 300 µg/ml. Para estos experimentos se utilizó Carbecin que se degrada más lento que la Ampicilina, por lo que la presión selectiva sobre las células que contienen al plásmido pMS01 es mayor. Se tomaron 960 µl del cultivo de toda la noche y se inocularon en 36 ml de medio Luria con Carbecin 300 µg/ml. Después este cultivo se dividió en tres matraces nefelométricos con 12 ml de cultivo cada uno y se crecieron en agitación hasta alcanzar una $D.O_{.550} = 0.4$. Los cultivos se sometieron a estrés calórico de 47°C por 15 min y se transfirieron a tubos de 30 ml con 18 g de Luria congelado y picado. El Luria hecho hielo se usó para obtener un enfriado rápido y así obtener el efecto preciso del aumento de temperatura sobre el DNA. Las células se cosecharon por centrifugación a 11, 000 rpm por 10 min. El

sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de solución I con lisozima (0.01g/2ml) y se adicionaron 15 μ l de RNasa (10 mg/ml). La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agitó suavemente en el vortex hasta formar un homogenado y se incubó en hielo-agua por 10 min. Posteriormente se le adicionaron 400 μ l de la solución II y se mezcló manualmente invirtiendo el tubo rápidamente tres o cuatro veces y se incubó durante 10 min en hielo-agua. A este lisado se le adicionaron 300 μ l de solución III y se agitó el tubo invertido en el vortex por 10 segundos y se dejó en hielo-agua por 10 min. El lisado se centrifugó a 12 000 rpm durante 12 min en frío. Se tomó el sobrenadante, se pasó a un tubo Eppendorf limpio y se le adicionaron 650 μ l de isopropanol y se incubó toda la noche a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 12 000 rpm durante 12 min en frío. Se decantó el líquido y la pastilla se secó a 42°C por 2 hrs y se resuspendió en 11 μ l de agua y 9 μ l de colorante guía para electroforesis. El colorante contiene glicerol (30%), azul de bromofenol (0.25%) y EDTA 1mM.

b) Separación de topoisómeros del plásmido pMS01 por electroforesis en geles de agarosa con cloroquina.

Las formas isoméricas del plásmido pMS01 purificado por lisis alcalina, se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y cloroquina 12 μ g/ml. La electroforesis se llevo a cabo en un buffer de Tris-boratos (TBE 1X) durante 22 hrs a 25 Volts. Después de la electroforesis el gel se lavó con agua destilada durante 4 h con cuatro

cambios por lo menos. El gel se tiñó con bromuro de etidio 2.5 µg/ml y se destiñó en agua durante toda la noche a 4°C. Al final se le tomó una fotografía con película Kodak TRI-X pan utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y un filtro rojo.

4. Separación de topoisómeros del plásmido pHOT1 por electroforesis en geles de agarosa.

Esta técnica se usa para determinar la actividad de la girasa *in vitro*. Además, por este método solo se pueden ver dos poblaciones de DNA en el gel: un grupo de 3-5 bandas que corresponden a moléculas de DNA relajado y una sólo banda que migra al frente del gel y que representa el DNA SE.

Para observar el plásmido pHOT1 en su forma relajada o superenrollada, el DNA se corrió en geles de agarosa al 1% en un buffer de Tris-acetatos (TAE). La electroforesis se llevó a cabo en un minigel de 6 X 7.5 cm, a temperatura ambiente por hora y media a 50 volts. Después el gel se teñó 10 min en bromuro de etidio 2.5 µg/ml y destiñó durante 30 min en agua. Finalmente se tomó una fotografía con película Kodak TRI-X pan utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y un filtro rojo.

5. Marcaje radioactivo de proteínas.

Con objeto de marcar a las proteínas que sintetiza *E. coli* se empleó [³⁵S] - L - metionina (> 100 Ci/mmol) a una concentración de 100 µCi/ml de cultivo. Para realizar esto, se prepararon cultivos

bacterianos en Luria y se crecieron a 30°C hasta llegar a un $D.O_{550\text{nm}} = 0.4$, se tomó 0.5 ml de este cultivo y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml los cuales se encontraban a la temperatura deseada y se dejaron 2 min para equilibrar la temperatura. Una vez que transcurrió el tiempo establecido se agregó la marca radiactiva (10 μl de metionina a una concentración de 100 $\mu\text{Ci/ml}$) y se incubó durante 10 min.

Después se agregó metionina no radiactiva en una proporción 100 veces más que la metionina marcada para competir con ésta y permitir el término de la síntesis de proteínas no completas. Los tubos se colocaron en hielo-agua para detener la reacción y se agregó TCA frío a una concentración final de 5% y se incubó durante 10 min. Luego se centrifugó en frío a 14 000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 3 μl del inhibidor de proteasas PMSF (10 mM) y 20 μl de solución Laemmli. Esta última contiene un colorante guía para la electroforesis, glicerol, SDS y β -mercaptoetanol para evitar que se agreguen las proteínas.

6. Separación de proteínas celulares por electroforesis en geles de acrilamida.

La separación de las proteínas se realizó según la técnica reportada por Laemmli (1970).

El gel separador contenía 10 % de acrilamida. Se añadió Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y 0.1 % SDS para desnaturalizar a las proteínas y minimizar sus cargas negativas. El gel se polimerizó químicamente

por la adición de 0.025 % de TEMED y persulfato de amonio 10 mM. El gel concentrador se preparó con 3 % de acrilamida y se le agregó Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y 0.1 % de SDS y se polimerizó de igual forma que el gel separador. Los geles se montaron en cámaras para electroforesis verticales Mini-Protean (Bio-Rad). Para desnaturalizar a las proteínas, previamente se incubaron a 92°-95°C en baño María por cinco minutos.

Los carriles en el gel concentrador se cargaron con 8 μ l de muestra. La electroforesis se corrió con el amortiguador de corrida Laemmli a 70 Volts para el gel concentrador y a 150 Volts para el gel separador.

Los geles se tiñeron una hora a 37°C con azul de Coomassie al 0.1%, preparado en ácido acético al 10% y metanol al 30%. Después se destiñeron con una solución de ácido acético al 10 % durante toda la noche.

7. Ensayo in vitro de la actividad de ATPasa de la chaperona GroEL.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l y contenía: el Buffer A; la proteína GroEL (0.75 μ M) y la proteína GroES (1.5 μ M). Las proteínas se incubaron previamente 5 min a temperatura ambiente y la reacción se realizó a 37°C por 30 min; la reacción se inició al adicionarse el ATP a una concentración final de 100 μ M. Para detener la reacción se añadió un volumen de agua fría y se guardaron a -20°C.

8. Ensayo in vitro de la actividad de ATPasa de la chaperona DnaK.

La mezcla de reacción contenía el Buffer A, DnaK 0.46 μM , DnaJ 0.8 μM , GrpE 0.25 μM y ATP 100 μM . El volumen total de la reacción fue de 25 μl y se llevó a cabo a 30°C durante 1 hora. Las proteínas se incubaron previamente 5 min a temperatura ambiente y la reacción comenzó al adicionar el ATP. Al final se adicionó un volumen de agua fría y se guardó a -20°C.

9. Determinación de la relación ATP/ADP por cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC).

Para evaluar la actividad de ATPasa de ambos sistemas de chaperonas se empleó la cromatografía de líquidos en alta presión (HPLC). La columna empleada fue de intercambio iónico (μ -Bondapack C-18, 125 Å, 10 μm , 3.9 X 300 mm, Waters Millipore); en este tipo de columna, los nucleótidos con una menor carga negativa tienen un menor tiempo de retención, mientras que los nucleótidos que contienen una mayor carga negativa tienen un mayor tiempo de retención. El buffer de elución fue 96% de buffer HPLC y 4% metanol. Esta técnica nos permitió cuantificar el ATP degradado a ADP por las chaperonas GroEL o DnaK las cuales tienen actividad intrínseca de ATPasa.

10. Ensayos *in vitro* de reactivación de Girasa mediante las chaperonas DnaK o GroEL.

A. Inactivación de Girasa a 50°C y ensayo de su actividad a la misma temperatura.

Para inactivar a la girasa por calor, la enzima (0.4 μ l a 0.016 mg/ml) se incubó en 15 μ l de buffer de reacción 1X a 50°C por 15 minutos. El buffer de reacción previamente se incubó 5 minutos a 50°C. La reacción enzimática se inició al añadir 15 μ l de buffer con: 3 μ l del buffer de reacción 5X, ATP a una concentración final de 1 mM, 4.5 μ M de GroEL, 0.25 μ M de GroES y 0.1 μ g de DNA. Esta mezcla de reacción se incubó a la misma temperatura de 50°C durante 30 minutos. En el caso del sistema DnaK, se añadieron: DnaK (15.2 μ M), DnaJ (28 μ M) y GrpE (0.23 μ M). Para terminar la reacción se adicionó un volumen de agua fría, 1 μ l de tRNA (10 μ g/ μ l), un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se colocó en hielo-agua. Después se centrifugó 10' en la PicoFuge, se recuperó la fase acuosa y se le añadió 1/25 de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol absoluto. Finalmente se dejó precipitando a -20°C durante toda la noche.

B. Inactivación de Girasa a 50°C y ensayo de su actividad a 30°C.

El ensayo se realizó como en A. La DNA girasa se diluyó e inactivó por calor a 50 °C durante 15 min. En este ensayo, y a diferencia del ensayo descrito en A, después de la inactivación, la mezcla de reacción se transfirió a 30°C. A esta temperatura se añadieron las proteínas chaperonas, el ATP y el DNA sustrato.

11. *Ensayo in vitro de protección de Girasa mediante la chaperona GroEL.*

A. Inactivación de Girasa a 50°C y ensayo de su actividad a la misma temperatura.

La mezcla de reacción, 7 µl de agua y 3 µl de buffer de reacción 5X se incubó previamente a 50°C. Una vez equilibrada a esta temperatura se añadió girasa (5.3×10^{-4} µM), GroEL (4.5 µM), GroES (0.25 µM) y ATP a una concentración final de 1 mM. La mezcla se incubó a 50°C durante 15 min (período de inactivación). Posteriormente se añadieron 12 µl de agua, 3 µl de buffer de reacción 5X y 0.1 µg de DNA, y se incubó a 50°C por 30 min más. La reacción se terminó de la misma forma como se describe en 10.

B. Inactivación de Girasa a 50°C y ensayo de su actividad a 30°C.

El ensayo se realizó como se describe previamente, con la diferencia que después del período de inactivación a 50°C, la mezcla de reacción se transfirió a 30°C, período de recuperación en el que se llevó a cabo el ensayo de actividad de la girasa.

12. Ensayo in vitro de protección de Girasa mediante la chaperona DnaK.

Se preparó una mezcla de reacción con: 3 μl del buffer de reacción 5X, girasa (5.3×10^{-4} μM), DnaK (15.2 μM), DnaJ (28 μM), GrpE (0.23 μM), y MgCl_2 (9.5 mM). Esta mezcla fue preincubada por 5 min a 30°C. Posteriormente se añadió ATP a una concentración final de 3 mM y se incubó a 50°C durante 15 min (período de inactivación). A continuación se transfirió la mezcla a 30°C y se incubó a esta temperatura durante 10 min. Después de esta incubación se inició el ensayo de superenrollamiento del DNA al añadir 12 μl de agua, 3 μl de buffer de reacción 5X y 0.1 μg de DNA y se incubó por 30 min más a 30°C. La reacción se terminó de la misma forma como se describió anteriormente.

RESULTADOS

I. ESTUDIOS *in vivo* DEL EFECTO DEL ESTRÉS CALÓRICO EN EL NIVEL DEL SUPERENROLLAMIENTO (SE) DEL PLÁSMIDO REPORTERO pMS01 EN MUTANTES *rpoH*, *gyrB*, *groE* y *dnaK*.

Efecto del estrés calórico en el nivel del SE del plásmido en la mutante en el gene regulador rpoH.

En un trabajo previo, Camacho, *et al.* 1995, reportaron que el cloranfenicol (Cm), un inhibidor de la síntesis de proteínas, inhibe la recuperación del SE de un plásmido reportero durante el estrés por calor. Para verificar que las proteínas de estrés calórico (PEC) están involucrados en esta recuperación, como lo sugiere el experimento con (Cm), se estudió el efecto del estrés calórico en el nivel del SE de un plásmido reportero en una mutante del gene *rpoH* (KY1603) en *E. coli*. En esta mutante no se presenta el aumento en la síntesis de las PEC en el estrés por calor; sin embargo, en esta mutante la síntesis de GroE es constitutiva. En la Figura 1a se observa que cuando la mutante KY1603 se somete a un cambio de temperatura (30° a 47°C) por 15 minutos, se inhibe el aumento en el nivel del SE del DNA en comparación con la cepa silvestre control. Este dato apoya fuertemente la idea de que las proteínas que forman parte del regulón σ^{32} son importantes para observar el incremento en el SE del DNA inducido por calor. Cabe señalar que a los 2 min del cambio de temperatura el DNA se encuentra relajado en ambas cepas, silvestre y mutante, como lo reportó Mizushima, (1993). Estos datos se pueden observar de manera más clara en la Figura 1b, que muestra la densitometría correspondiente a las bandas que se observan en la Figura 1a.

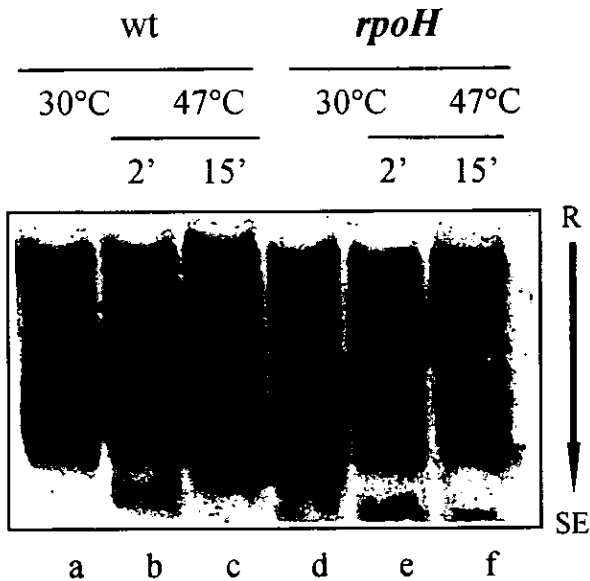


Figura 1a Efecto del estrés calórico en el SE del plásmido pMS01 en la cepa KY1603 que carece del gene *rpoH*, principal regulador de la respuesta a estrés por calor en *E. coli*. Los topoisómeros de pMS01 se separan por electroforesis en geles de agarosa-cloroquina.

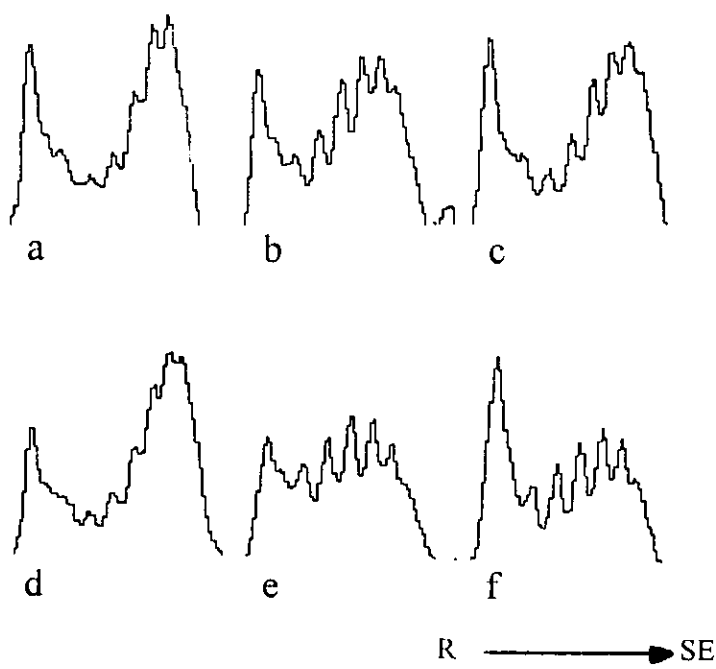


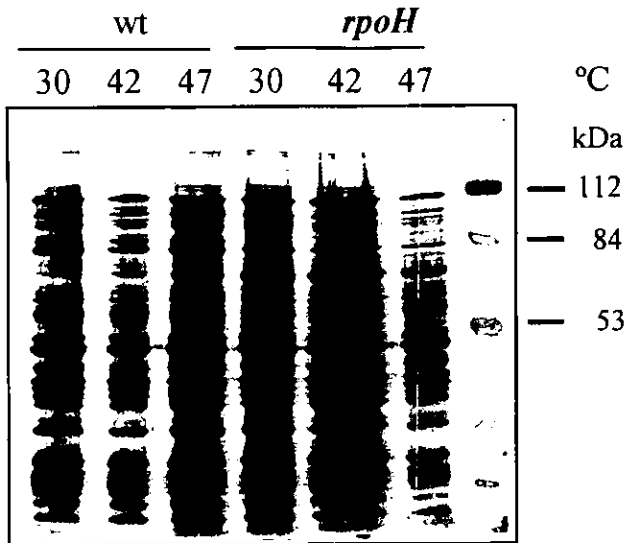
Figura 1b. Densitometría de la figura 1a.

Adicionalmente se realizó un marcaje de proteínas con metionina [³⁵S] para observar si la falta del gene *rpoH* se expresa en una disminución en la síntesis de las PEC durante una respuesta a estrés calórico. En la Figura 2b se puede ver la respuesta de la cepa silvestre a un cambio de temperatura como un aumento en la síntesis de las PEC y un aumento menor en la síntesis del resto de las proteínas. A 47°C se observa más claramente las bandas correspondientes al aumento en la síntesis de las proteínas GroEL y DnaK, del orden de 8 y 13 veces respectivamente. En la cepa KY1603 se observa que a 42° y 47°C no hay un aumento en las PEC con excepción de GroE que se expresa constitutivamente como ya se mencionó. En la Figura 2a se muestra un control de la cantidad de proteínas presente en cada carril mediante un gel de poliacrilamida-SDS al 10% teñido con azul de Coomassie. Este resultado confirma que las PEC son importantes en la recuperación del SE del plásmido en el estrés calórico y a su vez sugiere que GroE no tiene un papel en esta recuperación.

Efecto del estrés calórico en el nivel del SE del plásmido en la mutante gyrB temperatura-sensible.

En el trabajo de Camacho, R. *et al*, 1995, también se observó que el incremento en el SE del DNA se inhibió cuando las células fueron tratadas con novobiocina, un inhibidor de girasa. Este resultado sugiere que girasa podría estar involucrada en el aumento del SE del plásmido inducido por calor. Sin embargo, novobiocina es un antibiótico que también inhibe a la topoisomerasa IV, por lo que es importante estudiar el papel de la girasa de manera más directa. Para esto se analizaron los cambios en el SE de pMS01 en una mutante temperatura-sensible en *gyrB* durante el estrés calórico. En la

A. Tinción con Azul de Coomassie.



B. Autoradiografía.

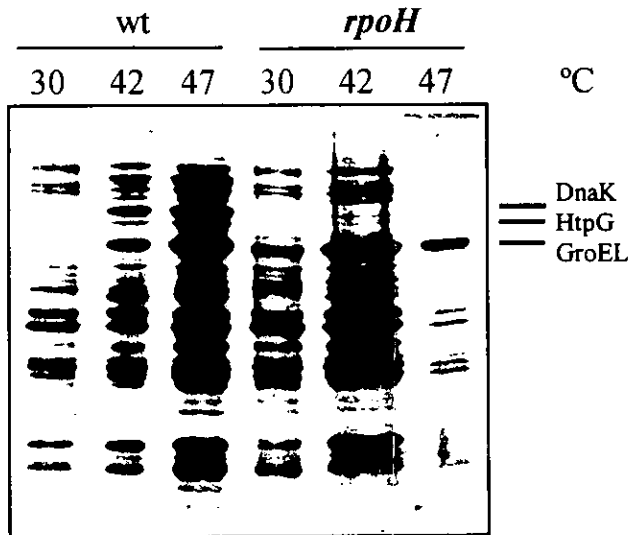


Figura 2 Respuesta a estrés por calor en la cepa KY1603 $\Delta rpoH30::kan$. Las proteínas que se sintetizan durante el estrés por calor se marcaron con [35 S]-Metionina y se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE, las proteínas totales se tiñeron con azul de Coomassie y las marcadas se visualizaron por autoradiografía.

Fig. 3 se muestran los topoisómeros correspondientes a la mutante *gyrB_{Val-164}* y su cepa isogénica. En la mutante, la relajación del plásmido que se presenta a los 2 minutos del estrés calórico es mayor que en la cepa silvestre (Fig. 3) y la recuperación del nivel de SE no es total (15 min a 42°C). La recuperación parcial puede deberse a que la subunidad GyrB temperatura-sensible no se inactivó completamente a la temperatura utilizada. Estos resultados muestran que la girasa participa tanto en la relajación inicial como en la recuperación del SE del plásmido durante la respuesta a estrés calórico. Cabe mencionar que la Dra. Carmen Gómez realizó los experimentos con dos mutantes distintas de *gyr B* (*gyrB_{Val-164}* y *gyrB₄₀₂*) y en ambos casos obtuvo los mismos resultados.

Efecto del estrés calórico en el nivel del SE del plásmido en las mutantes dnaK, groE y dnaK groE.

Los resultados previos de nuestro grupo (Camacho *et al.* 1995) y los que se obtuvieron con las mutantes *rpoH* y *gyrB* muestran que las PEC y la girasa juegan un papel importante en el incremento del SE del plásmido que se observa durante la respuesta a estrés calórico. Para estudiar cual o cuales PEC participan en este fenómeno, se probó la hipótesis de que la girasa, una enzima sensible a temperaturas por arriba de 46°C, disminuye su actividad durante el estrés calórico y posteriormente la recobra por acción de las chaperonas que se inducen en este estrés. Para comprobar esta hipótesis, se seleccionaron dos cepas con mutaciones diferentes en el gene *groEL* (*groEL44* y *groEL100*), tres con mutaciones puntuales diferentes en *dnaK* (*dnaK756*, *dnaK204* y *dnaK302*) y una cepa doble mutante *dnaK756 groEL100*.

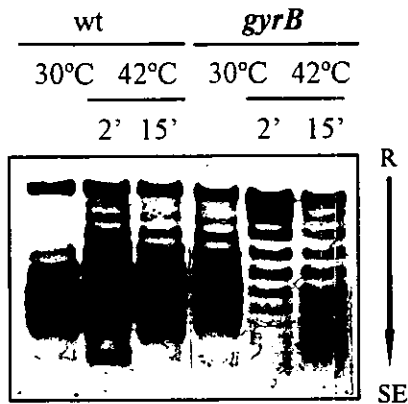


Figura 3 Efecto de la temperatura en el SE del plásmido pMS01 en la cepa L1030 (*gyrB_{val-164}*) con una mutación puntual en el gene *gyrB*, el cual codifica para la subunidad B de la DNA girasa.

En la Figura 4 se presenta el efecto del estrés calórico en el nivel del SE de un plásmido reportero en la mutante *groEL44* (NKR117). En esta mutante, así como en la mutante *groEL100* (datos no mostrados), la recuperación del grado de SE de pMS01 es similar al que se observa en la cepa silvestre (15 min a 47°C).

En la Figura 5a se observa el efecto del estrés calórico en el nivel del SE de un plásmido reportero en la mutante *dnaK756* (Ω 419). Esta mutante muestra un comportamiento similar a la cepa silvestre NKR117. Con las mutantes *dnaK204* y *dnaK302* se obtuvieron resultados similares (Fig. 5b y 5c). Los resultados obtenidos con estas tres mutantes sugieren que la ausencia o disminución en la actividad de las chaperonas GroEL y DnaK es dispensable para el incremento en el nivel del SE del plásmido inducido por calor. Sin embargo, es posible que en la mutante NKR117 (*groEL44*) el aumento en el SE del plásmido se deba a la presencia de la chaperona DnaK y viceversa, en la mutante Ω 419 (*dnaK756*) este aumento lo produzca GroEL. Para estudiar esta posibilidad se utilizó la doble mutante *groEL100 dnaK756*.

En la Figura 6 se observa el efecto del estrés calórico en el nivel del SE de un plásmido reportero en una doble mutante *dnaK756 groEL100* (Ω 585). Sin embargo, volvemos a ver que la mutante Ω 585 se comporta de manera similar a la cepa silvestre. Los resultados obtenidos con las mutantes en los genes de las principales chaperonas sugieren que estas proteínas no juegan un papel importante en el incremento del SE del plásmido inducido por calor.

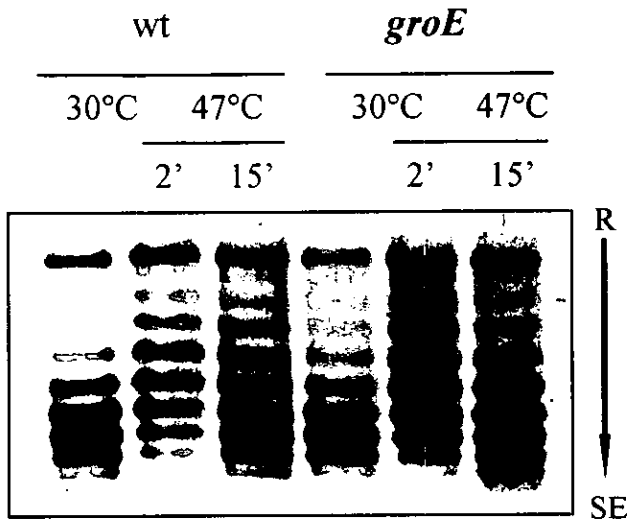


Figura 4 Efecto del estrés por calor en el SE del plásmido pMS01 en la cepa NKR117 (*groEL44*) que tiene una mutación puntual en el gene *groEL*.

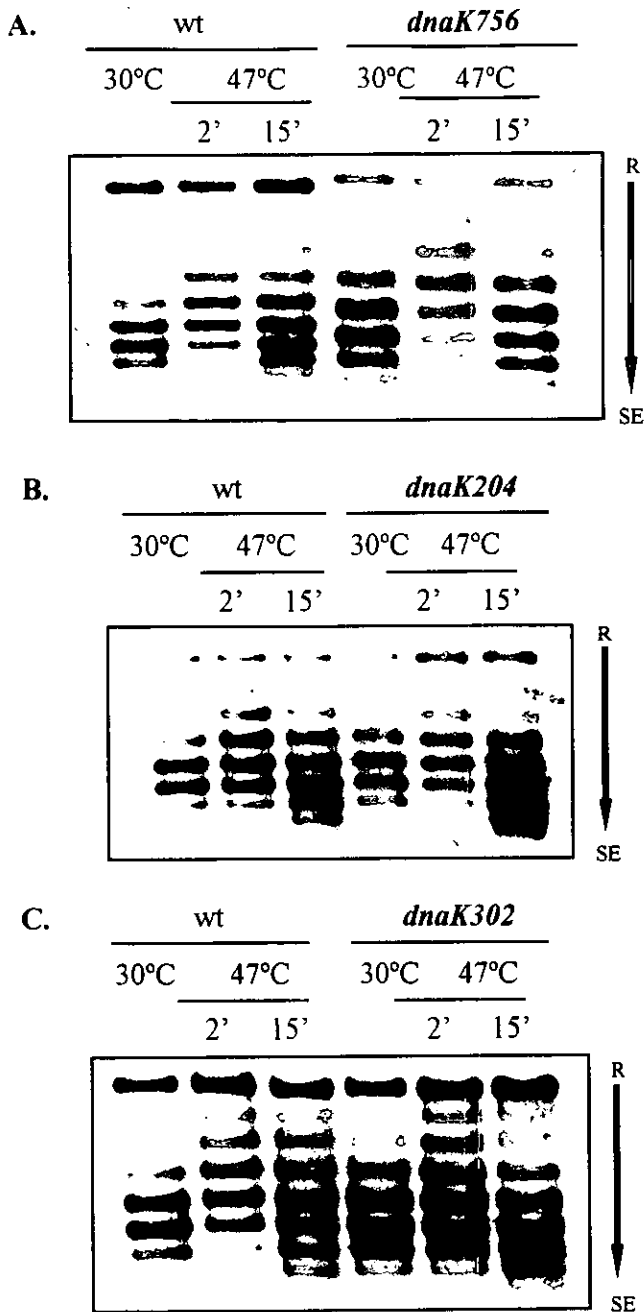


Figura 5 Efecto del estrés calórico en el SE del plásmido pMS01 en bacterias que presentan una mutación puntual en el gene *dnaK*.

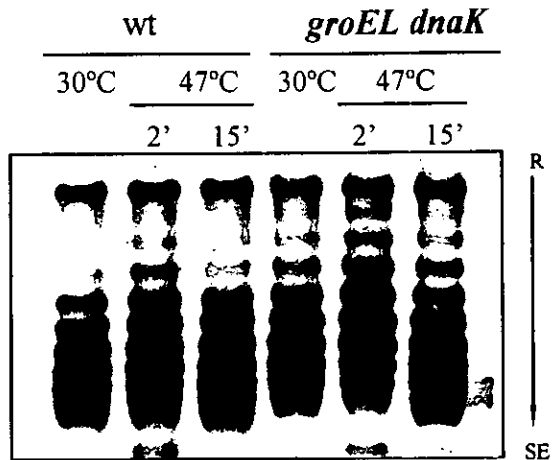


Figura 6 Efecto del estrés calórico en el SE del plásmido pMS01 en la cepa Ω 585 *groEL100 dnaK756*.

II. ESTUDIOS *in vitro* DE LA ACTIVIDAD DE LA DNA GIRASA A TEMPERATURAS ALTAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LAS CHAPERONAS GROE Y DNaK.

Los resultados que se obtuvieron con diferentes mutantes *groEL* y *dnaK* sugieren, que las PEC GroEL y DnaK, no están involucradas en la posible protección de la girasa a altas temperaturas. Si bien se probaron diferentes mutaciones en los genes para las chaperonas GroEL y DnaK, estas proteínas presentan varias funciones celulares. Las mutaciones en DnaK que se utilizaron afectan principalmente la actividad de ATPasa de esta proteína, la cual es muy importante para su actividad de reactivación de enzimas desnaturalizadas; sin embargo, la chaperona mutada puede presentar una actividad de ATPasa residual o bien tener otras funciones normales.

Para estudiar de manera más directa el papel de estas chaperonas en la actividad de girasa a altas temperaturas, se decidió desarrollar un sistema *in vitro*.

Para llevar a cabo un ensayo *in vitro* que involucra a varias proteínas, primero es indispensable probar la actividad de cada una de ellas de manera individual.

Las proteínas GroEL y DnaK se caracterizan por tener la capacidad de hidrolizar ATP (Viitanen, P. *et al*, 1990 & Liberek, K. *et al*, 1990). Además estas proteínas forman parte, cada una, de un sistema de chaperonas bien definido. Por ejemplo GroEL actúa en conjunto con la co-chaperona GroES y DnaK a su vez forma un equipo con las co-chaperonas DnaJ y GrpE. Como un control positivo de la actividad de estas enzimas se verificó su capacidad para hidrolizar ATP mediante una cromatografía de líquidos en alta presión

(HPLC). La columna empleada fue de intercambio iónico de manera que los nucleótidos con una menor carga negativa tienen un menor tiempo de retención (ADP), mientras que los nucleótidos que contienen una mayor carga negativa tienen un mayor tiempo de retención (ATP). En la Figura 8 se observa el ensayo de actividad de ATPasa del sistema GroEL-GroES. Cabe mencionar que en este caso GroES actúa inhibiendo la actividad de ATPasa de GroEL. En la Figura 7a se ve un pico que corresponde a 100 μ M de ATP; en la Figura 7b se observa que en la presencia de GroEL, la mayor parte del ATP se degradó a ADP. En la Figura 7c, se ve que la hidrólisis de ATP se reduce significativamente, esto se debe a la presencia de la co-chaperona GroES, la cual ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de ATPasa de GroEL.

En la Figura 8 se esquematiza la actividad de ATPasa del sistema de chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE. Es importante mencionar que en este caso DnaK posee una actividad débil de ATPasa que es estimulada por la co-chaperona DnaJ aproximadamente 13 veces, y en conjunto DnaJ y GrpE incrementan la hidrólisis de ATP hasta 50 veces (McCarty, J. *et al*, 1995). En la Fig. 8b se ve un pico que corresponde a 100 μ M de ATP, mientras que en la Fig. 8c se observa que en la presencia del sistema DnaK, DnaJ y GrpE el pico de ATP disminuye y aparece un nuevo pico que corresponde al ADP generado.

La DNA girasa, por su parte, es una enzima tetramérica formada por dos subunidades A y dos subunidades B. La subunidad A tiene afinidad por el DNA de doble cadena mientras que la subunidad B presenta actividad de ATPasa. La girasa se caracteriza básicamente por su actividad de superenrollar el DNA negativamente. En 1978 Peebles y Cozarelli mostraron que la girasa es lábil a alta temperatura (47°C). En la Figura 9 se muestra un

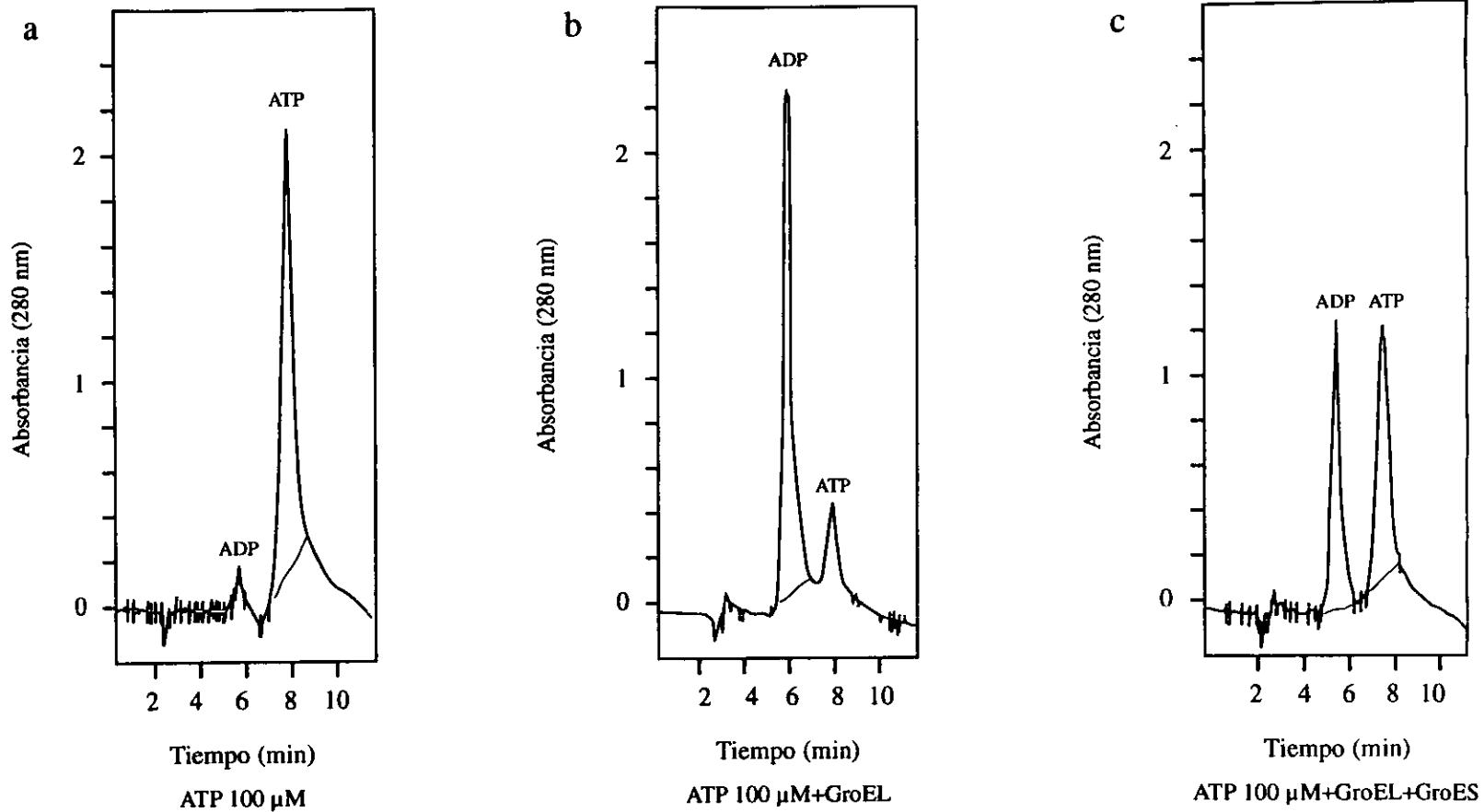


Figura 7. Actividad de ATPasa de la chaperona GroEL.

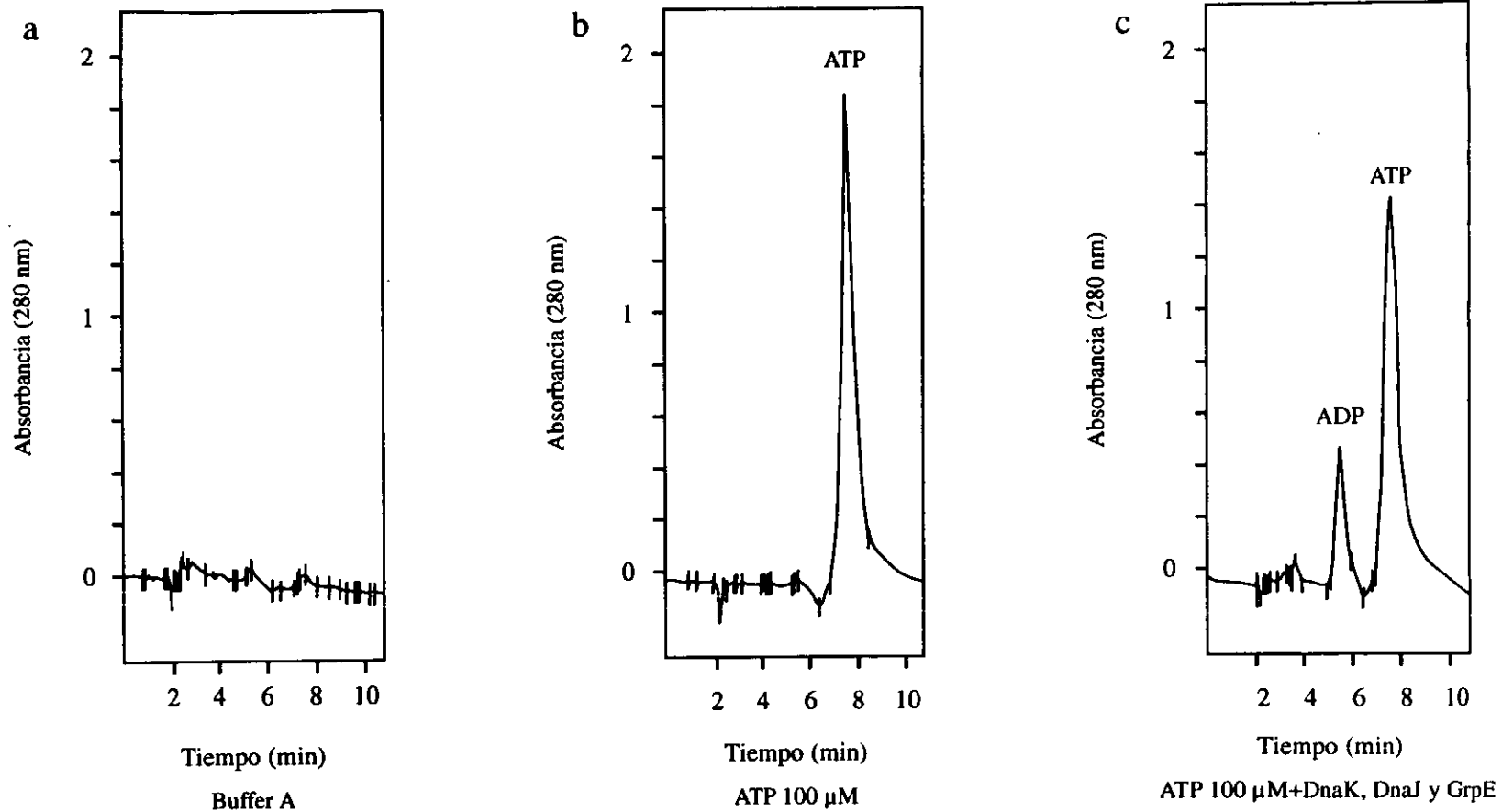


Figura 8. Actividad de ATPasa de la chaperona DnaK.

ensayo *in vitro* de la actividad de girasa a diferentes temperaturas; en este ensayo se usó como sustrato DNA relajado (primer carril). A 30° se observa una actividad completa de la enzima ya que se ve una sola banda al frente del gel que corresponde DNA superenrollado; a 47° se ve que la banda de DNA superenrollado es más tenue y se observan un conjunto de bandas que corresponden a una población de topoisómeros de DNA relajado que no se logró superenrollar lo cual confirma los datos de Peebles de que la actividad de girasa disminuye por la temperatura; sin embargo, nosotros observamos que sólo a 50°C se obtiene una inactivación completa de la enzima ya que el DNA sustrato está completamente relajado. La banda superior en los carriles de 30° y 47°C corresponden a moléculas rotas lineales presentes en el DNA sustrato.

En la Figura 10 se observa que la inactivación de girasa a 50°C por 15 minutos es similar tanto si el ensayo enzimático se realiza después a 30° ó a 50°C (carriles b y c). En el carril d) se muestra un control positivo de la actividad de la enzima a 30°C, a esta temperatura la girasa es capaz de superenrollar el DNA. La banda superior del carril d), como ya se mencionó, corresponde a DNA lineal.

En general, cada enzima tiene características propias que la definen y por tanto condiciones óptimas en las cuales llevan a cabo su actividad. Es por ello que el segundo paso para montar un sistema *in vitro* que involucra a varias proteínas es definir las condiciones adecuadas para que funcionen todas las enzimas que en él intervienen.

Por ejemplo, tanto las chaperonas, DnaK y GroEL como la DNA girasa tienen actividad de ATPasa, sin embargo, sus constantes de afinidad (K_m) por

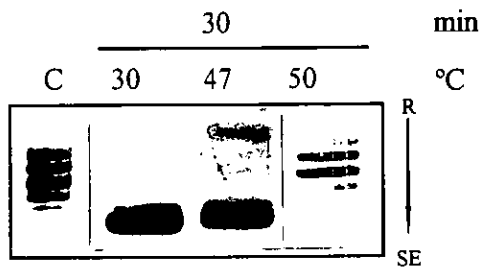


Figura 9 Ensayo *in vitro* sobre el efecto de la temperatura en la actividad de la enzima DNA girasa. Los topoisómeros relajados del plásmido pHOT1 se separaron por electroforesis en geles de agarosa.

- C, Control, DNA relajado
- R, DNA relajado
- SE, DNA superenrollado

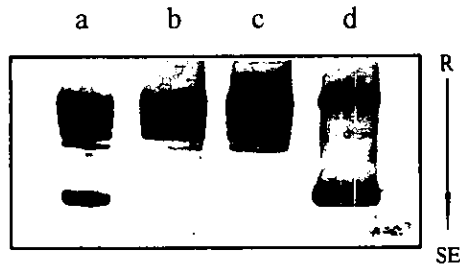


Figura 10 Inactivación de la Girasa con temperatura.

- a. Control (DNA relajado).
- b. Inactivación de girasa a 50°C durante 15 min y ensayo de su actividad a 30°C por 30 min.
- c. Inactivación de girasa a 50°C durante 15 min y ensayo de su actividad a la misma temperatura por 30 min.
- d. Ensayo de la actividad de girasa a 30°C durante 20 min.

el ATP son distintos. La girasa tiene una K_m de 0.3 mM por el ATP mientras que la DnaK tiene una K_m de 0.02 mM de ATP. En la Figura 11 se muestra un ensayo de la actividad de girasa a diferentes concentraciones de ATP. Como se puede observar, un exceso de ATP no afecta la actividad óptima de la enzima, la cual funciona bien en concentraciones de 2, 3 y 4 mM de ATP.

También fue necesario hacer compatibles las condiciones de sales en las que funcionan las chaperonas con las condiciones de sales de la girasa. Se ha reportado que tanto el magnesio como el potasio funcionan como cofactores importantes para el buen funcionamiento de las chaperonas DnaK y GroE. Las concentraciones adecuadas de estas sales, para las chaperonas son: 10 mM de $MgCl_2$ y 10 mM de KCl. Sin embargo, girasa requiere concentraciones menores de estos mismos iones: 0.8 mM de $MgCl_2$ y 4.8 mM de KCl. En la Fig. 12 se muestra un ensayo de la actividad de girasa con las concentraciones de magnesio y potasio adecuadas para las chaperonas. Como se puede observar aún en 10 mM de magnesio y de potasio la girasa presentó una buena actividad comparable con la actividad que presenta en sus condiciones óptimas de estos iones (carril a).

Ensayos in vitro de la actividad de la DNA girasa en presencia de las chaperonas GroE y DnaK después de su inactivación por calor.

Esta ampliamente documentado que las proteínas DnaK y GroE pueden reactivar a proteínas desnaturalizadas por compuestos químicos o por temperatura, así como prevenir la inactivación por temperatura de ciertas proteínas. Por lo tanto, para probar la hipótesis de que girasa mantiene una conformación activa a temperaturas altas gracias a las chaperonas DnaK y/o

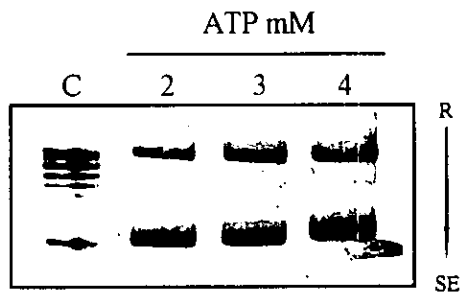


Figura 11 Ensayo *in vitro* de la actividad de girasa con diferentes concentraciones de ATP.

C, DNA sustrato.

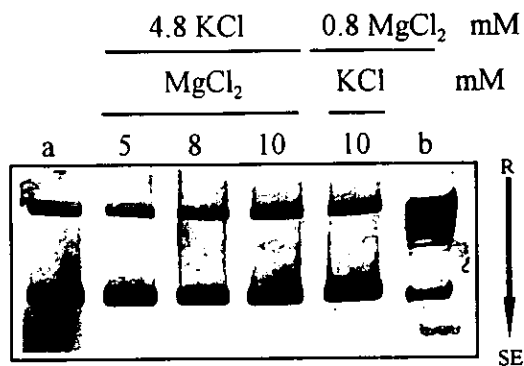


Figura 12 Ensayo *in vitro* de la DNA girasa en presencia de concentraciones diferentes de MgCl₂ y KCl.

- a. Concentración óptima de sales para DNA girasa (0.8 MgCl₂ y 4.8 KCl).
- b. DNA relajado.

GroE, se diseñó un sistema *in vitro* donde se estudió el efecto de la temperatura en presencia y ausencia de las chaperonas DnaK y GroEL.

En la Figura 13 se muestra un ensayo de reactivación de la girasa a 50°C mediante el sistema GroEL-GroES. En los dos primeros carriles que corresponden al control positivo se observa que la presencia de las chaperonas no afecta la actividad de la girasa a 30°C. Sin embargo, su presencia no reactiva a la enzima inactivada por temperatura (15 min a 50°C).

En la Figura 14a se puede ver un ensayo de actividad de la girasa a 50°C en presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE. En los tres primeros carriles se muestran los controles a 30°C y se ve que una concentración mayor de ATP (2 mM) y la presencia de las chaperonas no afecta la actividad de la girasa. Sin embargo, ensayos similares, pero a 50°C, muestran que las chaperonas no son capaces de reactivar a la enzima inactivada por la temperatura. Es importante mencionar que el ensayo de actividad de la girasa se realizó a la misma temperatura de inactivación, 50°C. No obstante, en la Figura 14b se observa el ensayo de reactivación de la girasa mediante DnaK pero probando la actividad de la girasa a 30°C. En ninguna condición se observó un aumento en la actividad de la girasa; es decir, las chaperonas no logran reactivar a la enzima inactivada por temperatura. El incremento en la banda superior (DNA roto lineal) en los carriles de 50°C en relación a los de 30°C podría deberse a la actividad de la subunidad GyrA de la girasa, la cual es resistente a altas temperaturas (Peebles, C. 1978). A 30°C tanto GyrA como GyrB son activas por lo que la girasa introduce supervueltas al plásmido; en cambio a 50°C sólo Gyr A se mantiene activa, lo que podría generar moléculas relajadas y lineales del plásmido.

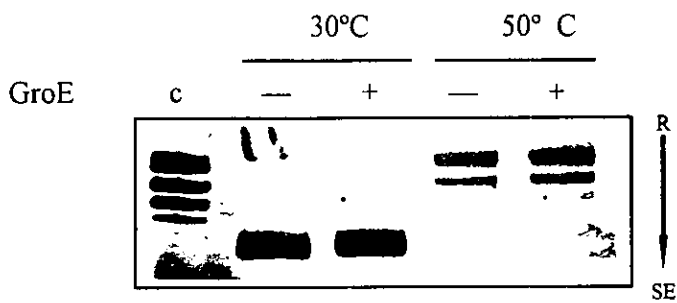
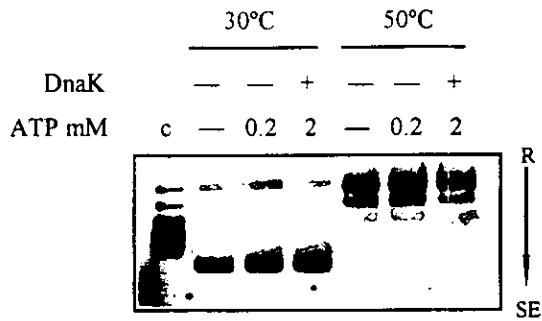


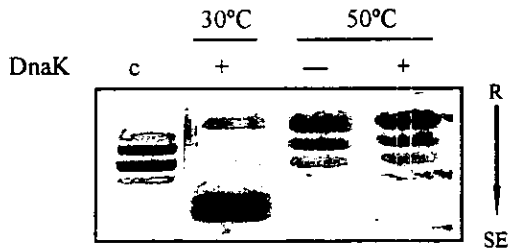
Figura 13 Actividad de la girasa en ausencia o presencia del sistema GroEL-GroES después de su inactivación por temperatura.

c, DNA relajado.

- ♦ Inactivación de la girasa a 50°C por 15 min.
- ♦ Ensayo de su actividad a la misma temperatura.



- a) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
 Ensayo de su actividad a la misma temperatura

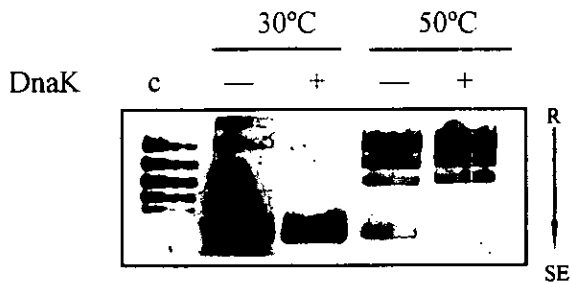


- b) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
 Preincubación a 30°C por 10 min.
 Ensayo de su actividad a 30°C por 30 min.

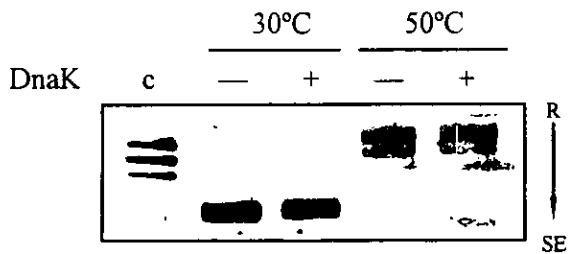
Figura 14 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE después de su inactivación por temperatura.
 c, DNA relajado.

Se han reportado estudios en donde es necesario adicionar una concentración alta de la proteína DnaK para restablecer la actividad de la RNA polimerasa tratada con calor (Skowrya, D. 1990; Ziemienowicz, A. 1993). Por lo tanto, como una alternativa nosotros usamos un exceso de DnaK para observar algún efecto en la recuperación de la girasa tratada con calor. En la Figura 15a se muestra un ensayo con un exceso de 10 moléculas de DnaK, DnaJ y GrpE, y en la Figura 15b se muestra un ensayo con 20 moléculas más de DnaK. En ningún ensayo, se observa la reactivación de girasa inactivada por calor.

Una explicación alternativa es que la girasa necesita de ambas chaperonas, DnaK y GroEL, para mantener una conformación estable a temperaturas altas. Para varias proteínas la interacción con DnaK es necesaria pero no suficiente para un plegamiento y ensamblaje adecuado, el cual, depende de la subsecuente transferencia del polipéptido a GroE. En nuestro caso, es probable que, en los ensayos en donde se adicionó DnaK después de la inactivación a 50°C, los ciclos de unión y liberación de la proteína sustrato no fueron suficientes para alcanzar su conformación nativa, la cual se alcanzaría si el polipéptido fuera transferido a la chaperona GroE. Y por el contrario, cuando el ensayo de reactivación de la girasa se llevó a cabo sólo con el sistema GroE, probablemente la proteína sustrato no se encontraba en una conformación más ordenada con la que pudiera interactuar GroE y así progresar al estado nativo de la proteína. Esta idea de que las chaperonas pudieran funcionar de manera secuencial, podría explicar los resultados negativos anteriores. De esta manera el ensayo de reactivación siguiente debería ser con ambas chaperonas. En la Figura 16 se muestra que la presencia



- a) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
Sistema DnaK-DnaJ-GrpE: 10 veces más proteína que en el ensayo de la Figura 14a.



- b) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
DnaK 20 veces más proteína que en la Figura 14a.

Figura 15 Actividad de girasa en ausencia o presencia de un exceso de DnaK después de su inactivación por temperatura. c, DNA relajado.

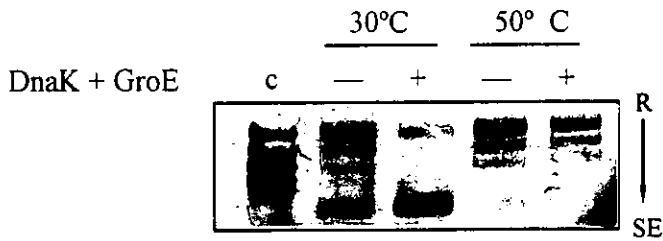


Figura 16 Actividad de girasa en ausencia o presencia de los sistemas DnaK y GroE después de su inactivación por temperatura.
c, DNA relajado.

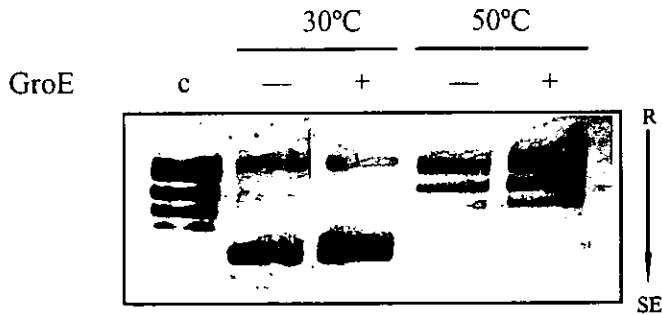
de los dos sistemas de chaperonas, DnaK y GroE, tampoco reactivan a la girasa.

Ensayos in vitro de la actividad de la DNA girasa en presencia de las chaperonas GroE y DnaK durante su inactivación por calor.

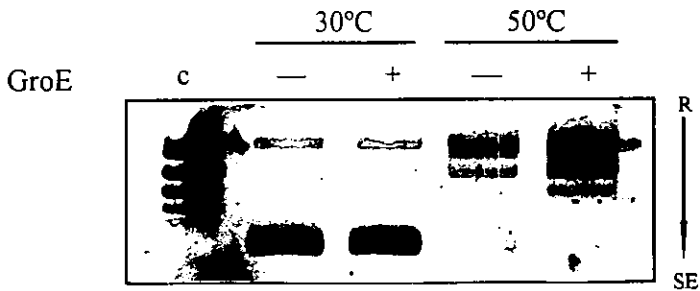
Otra forma de abordar el problema, fue diseñar un nuevo protocolo, en el cual, en lugar de añadir las chaperonas después de exponer a la girasa a una temperatura elevada, éstas se adicionaron a la girasa durante la incubación a 50°C, para estudiar si las chaperonas podían proteger a esta enzima y mantenerla activa a temperaturas altas.

En la Figura 17a se muestra un ensayo con el sistema GroEL-GroES. El resultado muestra que la presencia de estas proteínas no protegió a la enzima del calor. En este ensayo, la actividad de la girasa se probó a 50°C; por lo tanto, se realizó un ensayo similar pero probando la actividad de la girasa a 30°C (Fig. 17b). Sin embargo, en los dos experimentos se observó que aún en la presencia del sistema GroE, durante el tratamiento por calor, la girasa se inactiva.

En la Figura 18a se presentan los resultados de un ensayo similar pero utilizando el sistema de chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE. Este sistema, igual que el de GroE, no protegió a la girasa de la inactivación por calor. Este ensayo también se realizó probando la actividad de girasa a 30°C (Fig. 18b). El resultado fue similar a los anteriores. Sin embargo, si se observan con cuidado tanto en la Figura 18b como en las Figuras 15, 16 y 17 se puede ver una banda muy tenue en el carril que corresponde a 50°C sin chaperonas, la

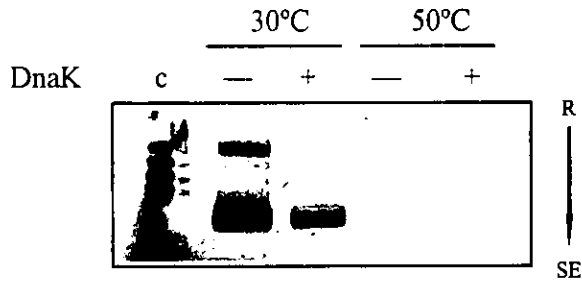


- a) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
Ensayo de su actividad a la misma temperatura.

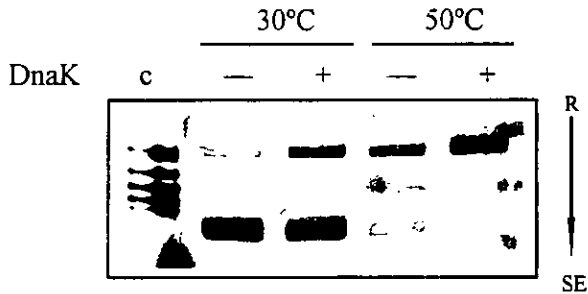


- b) Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
Ensayo de su actividad a 30°C.

Figura 17 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema GroEL-GroES durante el período de inactivación por temperatura. c, DNA relajado.



a) Inactivación de la girasa a 50°C por 15 min.
 Ensayo de su actividad a 50°C por 30 min.



b) Inactivación de la girasa a 50°C por 15 min.
 Preincubación a 30°C por 10 min.
 Ensayo de su actividad a 30°C por 30 min.

Figura 18 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE durante la inactivación por temperatura.
 c, DNA relajado.

que corresponde a DNA SE y habla de una actividad muy baja de la enzima a esta temperatura. Paradójicamente esta actividad residual no se observa en presencia de las chaperonas. Esto nos llevó a pensar que quizá DnaK y girasa realizan ciclos de unión y liberación para llegar al estado nativo de la enzima, pero que, por alguna razón, estos ciclos son incompletos. De esta forma girasa se encuentra unida permanentemente con DnaK y no puede llevar a cabo la actividad residual que presenta a 50°C en la ausencia de las chaperonas.

En los ensayos de protección, después de la inactivación a 50°C se realizó una preincubación a 30°C por 10 minutos antes de agregar el sustrato de la girasa y probar su actividad. Esta preincubación se hizo para que las chaperonas terminaran con su actividad iniciada durante la incubación a 50°C. Probablemente era muy corto el tiempo de interacción entre girasa y DnaK y era indispensable un período más largo para que concluyeran los ciclos necesarios de unión y liberación entre DnaK y girasa. En la Figura 19 se realizó un ensayo similar pero aumentando el período de preincubación a 20 min. Sin embargo, nuevamente no se observó ningún cambio con respecto al ensayo anterior. Una posibilidad era que la temperatura utilizada para inactivar a girasa (50°C) fuera muy elevada. En ese caso, si bien girasa se inactiva, es posible que el daño sea irreversible. Por lo tanto, se decidió probar una temperatura más baja, 47°C. Sin embargo, como se muestra en la Figura 20, los resultados son similares a los obtenidos con 50°C.

Como otra alternativa se probó una cantidad mayor de chaperonas (10X de DnaK, DnaJ y GrpE). En la Figura 21 se muestra que un aumento de estas proteínas no mejoró el efecto inhibitorio de la temperatura sobre la girasa. Una vez más, sólo quedaba por descartar una posibilidad, la presencia de ambos sistemas de chaperonas durante la incubación de girasa a 50°C. En la Figura

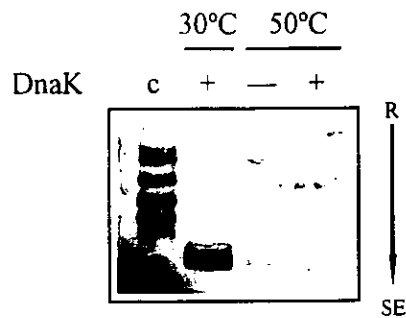


Figura 19 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE durante su inactivación por temperatura.
c, DNA relajado.

- ♦ Inactivación de la girasa a 50°C por 15 min.
- ♦ Preincubación a 30°C por 20 min.
- ♦ Ensayo de su actividad a 30°C por 30 min.

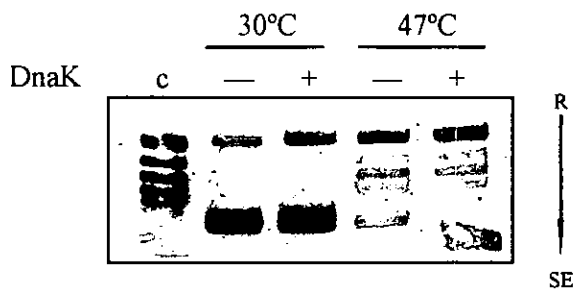


Figura 20 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE durante la inactivación por temperatura.
c, DNA relajado.

- ♦ Inactivación de girasa a 47°C por 15 min.
- ♦ Ensayo de su actividad a la misma temperatura.

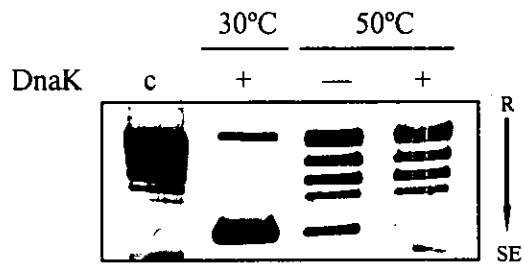


Figura 21 Actividad de girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE, con un exceso de 10 veces más proteína que en la Figura 20. c, DNA relajado.

- ♦ Inactivación de girasa a 50°C por 15 min.
- ♦ Ensayo de su actividad a la misma temperatura.

22 se observa que aún en la presencia de las dos chaperonas durante la incubación a 50°C, la girasa se inactiva totalmente.

Finalmente, como se mencionó arriba, el ATP es esencial para la actividad de la girasa y de las chaperonas, además, la relación ATP/ADP es muy importante para la girasa; una relación ATP/ADP mayor que 1 es favorable para su actividad mientras que una relación ATP/ADP menor que 1 no es adecuada para su actividad. Es posible que el uso del ATP por las chaperonas genere una relación ATP/ADP desfavorable para la actividad de la girasa. Para descartar esta posibilidad, se realizaron experimentos con un sistema regenerador de ATP (creatin-cinasa y creatin-fosfato) (Oggata, 1996). En la Figura 23 se muestra un ensayo de reactivación de girasa con DnaK y un sistema regenerador de ATP. No obstante, no se observó una recuperación en la actividad de la enzima a 50°C en presencia del sistema de chaperonas DnaK y el sistema regenerador de ATP. En resumen, los resultados de los ensayos *in vitro* muestran que los dos principales sistemas de chaperonas, DnaK y GroE, del regulón σ^{32} no protegen a girasa de temperaturas elevadas.

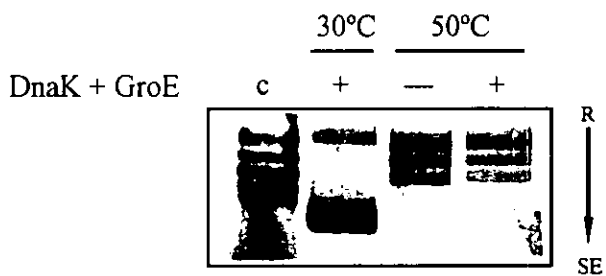


Figura 22 Actividad de girasa en ausencia o presencia de los sistemas DnaK y GroE durante la inactivación por temperatura.
c, DNA relajado.

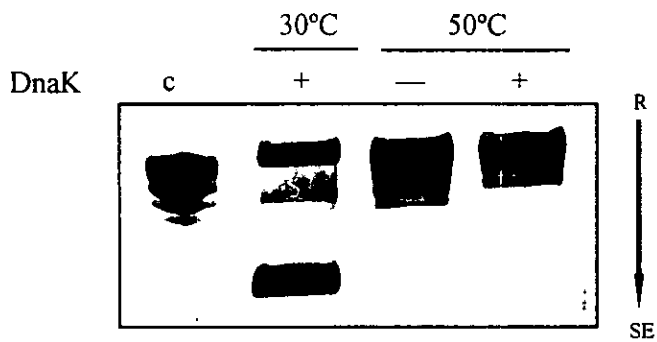


Figura 23 Actividad de la girasa en ausencia o presencia del sistema DnaK-DnaJ-GrpE, complementado con un sistema regenerador de ATP (creatin-cinasa y creatin-fosfato).
c, DNA relajado.

DISCUSIÓN

El DNA cromosomal de las bacterias se encuentra superenrollado negativamente, lo que favorece muchas de las actividades del DNA como: transcripción, transposición, replicación y recombinación. El nivel del SE del DNA *in vivo* es determinado por el balance entre las actividades opuestas de la topoisomerasa I y la DNA girasa y es regulado por la modulación homeostática de la expresión de los genes *topA* y *gyr* en respuesta a cambios en el SE del DNA cromosomal. Varios estudios independientes han demostrado que los cambios ambientales parecen afectar el nivel del SE del DNA; por ejemplo, cambios en la osmolaridad del medio, en la concentración de oxígeno, en la relación [ATP]/[ADP] y en la temperatura. En este trabajo nosotros nos interesamos por estudiar el efecto de la temperatura en el nivel de SE del DNA mediante un plásmido reportero purificado de células que crecen bajo condiciones diferentes.

En un estudio previo, usando los antibióticos novobiocina (inhibidor de topoisomerasa II y topoisomeras IV) y cloranfenicol (inhibidor de la síntesis de proteínas), se sugirió que girasa y proteínas sintetizadas durante el estrés calórico son responsables del cambio observado en el nivel del SE del plásmido reportero. Para verificar estos datos, nosotros utilizamos mutantes en *gyrB* y *rpoH*.

Como la novobiocina es un antibiótico que también inhibe a la topoisomerasa IV, se estudio el papel de la girasa de una manera más directa mediante una mutante *gyrB* temperatura-sensible. En esta mutante tanto la relajación inicial como la recuperación del SE del DNA se vio afectada durante la respuesta a estrés calórico. Este resultado muestra que la girasa es importante en el nivel del SE del DNA durante la respuesta a estrés por calor.

Las cepas que carecen de σ^{32} (*rpoH*) son extremadamente sensibles a temperatura y sólo crecen a temperaturas menores o iguales a 20°C. En este trabajo se utilizó una mutante nula en *rpoH* que tiene una mutación supresora que le permite crecer a 20°-40°C. La mutación supresora tiene una secuencia de inserción en la región 5' del operón GroE que da como resultado un aumento en la síntesis de las proteínas GroEL y GroES. En la Figura 2b se observa la expresión constitutiva de GroEL en la mutante nula *rpoH*. Esto muestra que las chaperonas GroEL-GroES permiten el crecimiento a temperaturas fisiológicas normales entre 20°-40°C de cepas $\Delta rpoH$. Los resultados que se muestran en la mutante *rpoH*, en la cual la transcripción de los genes de estrés calórico es muy reducida confirman, junto con el dato del cloranfenicol, que ciertas proteínas del estrés calórico son importantes para observar el incremento en el SE del plásmido inducido por calor.

El siguiente paso consistió en discernir qué proteínas de estrés calórico, en conjunto con la girasa, eran las responsables del SE del DNA a temperaturas altas. Nuestra hipótesis de trabajo propuso que las chaperonas DnaK y GroE, proteínas sintetizadas en los primeros minutos de la respuesta a estrés calórico, eran los mejores candidatos. Sin embargo, los datos obtenidos con la mutante *groEL* muestran que esta chaperona no tiene un papel importante en el nivel del SE del DNA, ya que en esta mutante se sigue observando la recuperación en el nivel del SE del plásmido. Además, los datos obtenidos con la mutante *rpoH*, la cual presenta una expresión constitutiva de GroEL, ya sugerían que esta proteína no era importante.

Nuestros resultados con la mutante *dnaK* muestran que la proteína DnaK tampoco está involucrada en el incremento del SE del plásmido. Sin embargo, el grupo de Ogata muestra resultados distintos a los nuestros con respecto a esta mutante (Ogata y colaboradores, 1996). Es importante aclarar

que este grupo usó una mutante nula en el gene *dnaK* ($\Delta dnaK52$). Esta mutante es defectuosa en la segregación de los cromosomas y presenta un rango de temperatura más limitado que el observado con otras mutantes *dnaK* ya descritas. La mutación $\Delta dnaK52$ tiene deletada toda la región promotora de *dnaK* y 933 pb de la secuencia codificadora, de manera que la eliminación de la región promotora de *dnaK* da como resultado una reducción en los niveles de la proteína DnaJ en estas cepas (Rockarbrand, D. 1995). Como se mencionó anteriormente, DnaK es un regulador negativo de σ^{32} , por lo tanto en una mutante nula *dnaK* se observa una sobreproducción de las PEC. Además la proteína DnaK esta involucrada en división celular, síntesis de DNA y RNA, plegamiento y secreción de proteínas y replicación del fago lambda. Un espectro tan amplio de acción sugiere que la proteína DnaK esta involucrada en mecanismos generales para la supervivencia de la célula. Adicionalmente, al estudiar el crecimiento de mutantes nulas en el gene *dnaK* a 30°C, se muestra que después de varias generaciones de crecimiento se acumulan mutaciones supresoras (Yura, T. 1988).

Nosotros usamos células con mutaciones puntuales en el gene *dnaK* (*dnaK204*, *dnaK302* y *dnaK756*). Estas mutaciones se localizan en la región que está íntimamente involucrada en la actividad enzimática central de unión y catálisis de ATP por DnaK (Wild, J. 1992). Particularmente la mutante *dnaK756* se caracteriza por: i) tener una actividad más alta de ATPasa; ii) tener baja afinidad para la proteína P de lambda y la proteína GrpE y iii) estar permanentemente 'asegurada' en una conformación abierta (Liberek, K. 1991). En el modelo propuesto para el plegamiento de proteínas por este sistema DnaK, se sugieren varios ciclos de unión y liberación del sustrato para que éste alcance su conformación nativa. Si bien la mutante *dnaK756* presenta una mayor actividad de ATPasa, esto se debe a que no presenta un cambio

conformacional después de la hidrólisis de ATP y en consecuencia baja su afinidad por el sustrato así como su eficiencia de unión y liberación del mismo; como resultado, se vuelve una proteína deficiente en su actividad como chaperona.

Los datos obtenidos con las mutantes *dnaK* y *groE* sugieren que estas chaperonas no son importantes en el aumento del SE del plásmido inducido por calor. Sin embargo, otra posible explicación es que estas proteínas se sustituyeran mutuamente, por ejemplo en una mutante *dnaK* la proteína DnaK es defectuosa y no funciona bien, pero está presente la proteína GroEL y viceversa. Por otra parte, existen reportes en la literatura de que estos dos sistemas de chaperonas, más que actuar en forma paralela, en algunos casos funcionan sucesivamente; parece ser que DnaK comienza el trabajo y GroEL lo termina (Gragerov, A. *et al*, 1992 y Gaitanaris, G. *et al*, 1994). Por esta razón se probó una doble mutante *dnaK groEL*. Sin embargo, no se observó ningún efecto de la temperatura en el nivel de SE del DNA en la doble mutante *dnaK groEL*. Este resultado, en conjunto con los datos obtenidos con las mutantes por separado *dnaK* y *groE*, muestran que estas chaperonas no están involucradas en el aumento del SE del plásmido inducido por calor. Sin embargo, el resultado obtenido con la mutante *rpoH* sugiere que no hay que descartar a otras proteínas de estrés calórico, chaperonas y/o proteasas, posiblemente implicadas en el aumento del SE del plásmido inducido por calor.

Para estudiar la actividad de girasa a altas temperaturas en presencia y ausencia de las chaperonas DnaK y GroEL, en condiciones más controladas, se utilizó un sistema *in vitro*. En este sistema se diseñaron dos protocolos diferentes, uno para determinar si las chaperonas pueden proteger a girasa de

temperaturas entre 47°-50°C y otro para ver si pueden reactivar a la enzima después de inactivarla a esas temperaturas.

Nuestros resultados en los ensayos de reactivación con las proteínas DnaK y GroEL, muestran que la girasa no restableció su actividad después del tratamiento con calor. Aun cuando la actividad de la girasa se ensayó a 30°C no se observó una recuperación en la actividad de la enzima. En los controles podemos ver que no es un aumento en la concentración del ATP o en la cantidad de proteína lo que pudiera afectar el ensayo *in vitro*, ya que a 30°C se obtiene una buena actividad de la enzima. Es claro que la temperatura (50°C) es lo que afecta a la girasa y que las chaperonas no ayudan a su recuperación.

En la literatura se encuentran diversos trabajos acerca de la cantidad adecuada de chaperonas que es necesaria para la recuperación de ciertas proteínas inactivadas previamente. En el caso del sistema DnaK-DnaJ-GrpE es posible que un exceso de moléculas de DnaK hagan innecesaria la participación de DnaJ y GrpE. En los ensayos de reactivación nosotros probamos un exceso de 20 moléculas más de DnaK y un exceso de 10 moléculas más de DnaK, DnaJ y GrpE con respecto a la relación que se usó previamente: Girasa/DnaK/DnaJ/GrpE, 1/19/1/17 (Ziemienowicz, A. 1993). Sin embargo, un aumento en la cantidad de estas chaperonas no dió como resultado la reactivación de la enzima inactivada por temperatura.

Una explicación a estos resultados podría ser que la girasa requiere de los dos sistemas de chaperonas: DnaK y GroE para alcanzar una conformación completamente activa a temperaturas altas. Algunos trabajos muestran que estos dos sistemas actúan ya sea en secuencia o en conjunto (Gragerov, A. 1992; Gaitanaris, G. 1994). Para varias proteínas la interacción con el sistema DnaK es necesaria pero no suficiente para una plegamiento adecuado, el cual requiere además de la participación de las chaperonas GroEL-GroES. Sin

embargo, el resultado que se obtuvo en el ensayo de reactivación usando los dos sistemas de chaperonas, muestra que aún en conjunto estas chaperonas no pueden reactivar a la enzima inactivada por calor.

Es importante mencionar que Ogata y colaboradores (1996) realizó ensayos de superenrollamiento del DNA *in vitro*, y observó que la adición de la proteína DnaK daba lugar a un incremento en el SE del DNA. Sin embargo, estos ensayos se llevaron a cabo con extractos celulares, lo cual implicaría a cualquier otra proteína presente en dicho extracto. Aún cuando muestran un ensayo de SE del DNA con las proteínas girasa y DnaK purificadas, todas estas reacciones se llevaron a cabo a 25°C, lo cual no sugiere un papel importante de DnaK en el SE del DNA, durante un estrés por temperatura. Los datos a temperaturas altas (45°C) no los muestran en su trabajo; además, esta temperatura no correlaciona con sus datos *in vivo*, que se realizaron a 50°C, y en donde sugieren que DnaK es importante para el SE del DNA durante un estrés calórico. Cabe mencionar que girasa se reportó como una proteína inactiva a temperaturas por arriba de 46°C (Peebles, C. 1978), además, en este trabajo se muestra que girasa se inactiva parcialmente a 47°C y sólo se obtiene una inactivación completa de la enzima a 50°C (Fig. 9). Por otra parte, la cantidad de proteína DnaK que usaron en sus reacciones de SE del DNA es mucho mayor (20 veces más) que la cantidad que nosotros usamos en nuestros ensayos.

En los ensayos de reactivación y de protección, de éste trabajo, se probó la actividad de la girasa a 50°C. Esto se debe a los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*; cuando las células se someten a estrés calórico (47° o 50°C) por 15 minutos se observa un aumento en el nivel del SE del DNA. Como la única proteína que puede superenrollar al DNA es la girasa, nosotros especulamos que esta enzima *in vivo* es activa a estas temperaturas, (gracias a

las chaperonas?). Por lo tanto en los ensayos *in vitro* se probó la actividad de la girasa a la misma temperatura de inactivación, 50°C.

En los ensayos de actividad de la girasa a 50°C en presencia del sistema DnaK, no se observó actividad de la enzima después del tratamiento con calor. Sin embargo, llama la atención que a 50°C en ausencia de las chaperonas se observa una actividad residual de la girasa, mientras que a 50°C en presencia de las chaperonas esa pequeña actividad residual se elimina completamente. Este dato posiblemente nos hable de una interacción entre una girasa en una conformación no nativa y DnaK; quizá estas dos proteínas realizan ciclos de unión y liberación para llegar al estado nativo de la enzima, pero, por alguna razón, estos ciclos son incompletos, de tal forma que girasa se encuentra permanentemente unida con DnaK y no puede llevar a cabo la actividad residual que presenta a 50°C en la ausencia de la chaperona. Nosotros pensamos que probablemente se requerían tiempos más largos de recuperación a 30°C después del período de inactivación a 50°C, con el objeto de que las chaperonas terminaran su actividad de renaturalizar a la girasa. Sin embargo, aun con tiempos largos de incubación a 30°C no se observó una recuperación de la actividad de la enzima.

Finalmente, es importante mencionar que el ATP juega un papel esencial en la actividad del conjunto de proteínas que están involucradas en estos ensayos *in vitro*. Para la girasa en particular, la relación ATP/ADP determina una buena actividad de la enzima ya que cuando la relación esta a favor del ADP la actividad de la girasa se reduce (Drlica, 1983; Maxwell, 1989; Camacho, 1995). Es probable que el uso del ATP por las chaperonas genere una relación ATP/ADP menor que 1, desfavorable para la actividad de la girasa. Por lo tanto se realizaron experimentos para estudiar la posible reactivación de la girasa con las chaperonas en la presencia de un sistema

regenerador de ATP (creatin-cinasa y creatin-fosfato). No obstante, aún en la presencia de un sistema regenerador de ATP no se logró obtener una recuperación en la actividad de la girasa.

De los datos obtenidos en los experimentos *in vitro* sugerimos que probablemente la temperatura de inactivación de la girasa (50°C) causó un daño irreversible de manera que las chaperonas no lograron renaturalizar a la enzima, o bien que, por lo menos, las proteínas DnaK y GroEL no son las responsables de mantener activa a la girasa a temperaturas altas.

La proteína ClpB, que pertenece a la familia de las Hsp100 en *E. coli*, surge como una de las proteínas de estrés calórico posiblemente implicada en el aumento en el SE del DNA. Hasta el momento, se sabe que el regulón de σ^{32} no tiene que ver con termotolerancia en la bacteria *E. coli*. De manera similar una mutante en el factor de estrés calórico, en levadura, muestra termotolerancia si se le da un pretratamiento de temperatura. Por otra parte, se sabe que la proteína Hsp104 es suficiente para inducir termotolerancia en levadura (Lindquist, 1996). Adicionalmente, la proteína Hsp104 muestra una alta homología con la proteína ClpB (Parsell, 1991). Experimentos separados indican que la familia de las Hsp100 tienen la habilidad de promover la resolubilización de oligómeros o proteínas agregadas, particularmente aquellas inducidas por estrés calórico. Como se mencionó al principio de la discusión, parece ser que las proteínas GroE y DnaK tienen papeles distintos que parecen ser ejercidos en diferentes estados del estrés calórico; bajo tales circunstancias, la tasa de desnaturalización de proteínas, a temperaturas muy altas, probablemente rebase la habilidad de las chaperonas GroE y DnaK como sistemas protectores o para prevenir la agregación y la ClpB proporcionaría una estrategia de sobrevivencia adicional a estas temperaturas.

Existen diferentes formas de comprobar esta segunda hipótesis. La primera sería mediante una mutante en *clpB*. Con esta cepa se harían experimentos similares a los de este trabajo, ver el efecto del estrés calórico en el nivel del SE del plásmido reportero en una mutante en *clpB*. Adicionalmente se puede corroborar este dato con una doble mutante *dnaK clpB*. Una segunda alternativa sería un ensayo *in vitro*, en donde de forma indirecta, se probaría si DnaK es capaz de reactivar a una proteína inactivada por calor, probando diferentes temperaturas, quizá puede renaturalizar a proteínas inactivadas a temperaturas de 42°, 45°, 47°C y no a proteínas termolabiles a 50°C, por ejemplo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- La girasa y algunas de las proteínas reguladas por sigma 32 son importantes para que se lleve a cabo la recuperación en el nivel de SE del DNA.
- Los datos obtenidos *in vivo* e *in vitro*, bajo las condiciones experimentales utilizadas, sugieren que las proteínas DnaK y GroE no están involucradas en la protección de la girasa a temperaturas altas.

Es posible que otras chaperonas y/o proteasas reguladas por sigma 32 sean las responsables del aumento en el SE del DNA.

APENDICE

Soluciones:

TSS 2X

| | |
|----------------------|--------|
| NaCl | 1.0 % |
| Triptona | 1.0 % |
| Extracto de levadura | 0.5 % |
| MgCl ₂ | 50 mM |
| PEG | 20.0 % |
| DMSO | 10.0 % |
| pH | 6.5 |

Solución I

| | |
|----------|-------|
| Glucosa | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Tris-HCl | 25 mM |
| pH | 8 |

Solución II

| | |
|------|-------|
| SDS | 10 % |
| NaOH | 0.2 N |

Solución III

| | |
|-----------------------|--------|
| Acetato de Potasio | 3 M |
| Acido acético glacial | 11.5 % |
| pH | 5.6 |

TBE 1X

| | |
|--------------|-------|
| Tris-base | 90 mM |
| Acido Bórico | 90 mM |
| EDTA | 10 mM |

TAE 1X

| | |
|----------------------------------|-------|
| Tris-base | 40 mM |
| EDTA | 1 mM |
| ajustar con ácido acético a pH 8 | |

Buffer A para Chaperonas

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl | 50 mM |
| KCl | 10 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| NaCl | 100 mM |
| pH | 7.5 |

Buffer de reacción 5X para Girasa

| | |
|--------------------|-------------|
| Tris-HCl | 35 mM |
| KCl | 24 mM |
| MgCl ₂ | 4.0 mM |
| DTT | 2.0 mM |
| Espermidina | 1.8 mM |
| ATP | 1.0 mM |
| Glicerol | 6.5 % (w/v) |
| Albumina de bovino | 0.1 mg/ml |
| pH | 7.5 |

Buffer para HPLC

| | |
|---------------------------------|-------|
| Hidróxido de tetrabutilamonio | 2 % |
| KH ₂ PO ₄ | 0.1 M |
| Metanol | 4 % |
| Agua grado HPLC | |
| PH | 7 |

Abreviaturas:

| | |
|-------|---|
| ATP | Adenosin Trifosfato |
| EDTA | Ethylenediamine-tetraacetic acid |
| EGTA | Ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethyl ether) N,N'-tetra-acetic acid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTE | Dithioerythritol |
| DTT | Dithiothreitol |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N' -[2-ethanesulfonic acid] |
| PEG | Polyethylene glycol |
| PMSF | Phenylmethyl-sufonyl fluoride |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| TEMED | N, N, N', N' -Tetramethylethylenediamine |
| TCA | Trichloroacetic acid |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |

LITERATURA CITADA

Bauer, W. R.; F. H. C. Crick y J. H. White. 1980. Supercoiled DNA. *Sci. Amer.* **243**: 118-133.

Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hegde, D. Boisvert, A. Joachimiak, A. Horwich y P. Sigler. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature.* **371**: 578-586.

Bruckner, R., y M. Cox. 1989. The histone-like H protein of *Escherichia coli* is ribosomal protein S3. *Nucl. Acids Res.* **17**: 3145-3116.

Buchberger, A., A. Valencia, R. McMacken, C. Sander y B. Bukau. 1994. The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. *The EMBO Journal.* **13**: 1687-1695.

Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**:671-680.

Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernández, J. Ramírez-Santos, J. Castro-Dorantes, V. Chagoya de Sánchez y M. C. Gómez-Eichelmann. 1995. *J. Bacteriol.* p. 3619-3622.

Chen, S., A. Roseman, A. Hunter, S. Wood, S. Burston, N. Ranson. 1994. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature.* **371**:261-264.

Craig, E., B. Gambill y R. Nelson. 1993. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Protein Biogenesis. *Microbiological Reviews.* p. 402-414.

Crick, F. H. C. 1976. Linking number and nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2639-2643.

Dean, F. y R. Cozzarelli. 1985. Mechanism of strand passage by *Escherichia coli* topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J. Biol. Chem.* **260**: 4984-4994.

Digate, R. J. y K. J. Marians. 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 13366-13373.

Digate, R. J. y K. J. Marians. 1989. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **264**: 17924-17930.

Dorman, C., C. Barr, N. Ni Bhrian y C. Higgins. 1988. DNA supercoiling and the Anaerobic and Growth Phase Regulation of *tonB* Gene Expression. *J. Bacteriol.* pag. 2816-2826.

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

Drlica, K. 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**: 425-433.

Drlica, K.; G. J. Pruss; R. M. Burger; R. J. Franco; L. S.. Hsieh y B. A. Berger. 1992. Roles of DNA topoisomerases in bacterial chromosome structures and function, p. 195-204. En: K. Drlica y Ml Riley (ed.), *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Frydman, J. y F. U. Hartl. 1994. Molecular Chaperone Functions of hsp70 and hsp60 in Protein Folding, p. 251-283. En: R. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos (ed.), *The Biology of HEAT SHOCK PROTEINS and MOLECULAR CHAPERONES*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Gilbert, R. y M. Kohiyama. 1993. Specificity of the *Escherichia coli* chaperone DnaK (70-KDa heat-shock protein) for hydrophobic Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **268**: 24074-24077.

Gragerov, A., L. Zeng, X. Zhao, W. Burkholder y M. E. Gottesman. 1994. Specificity of DnaK-peptide Binding. *J. Mol. Biol.* **235**: 848-854.ómez

Gómez-Eichelmann, M.C. y R. Camacho-Carranza. 1995. El nucleóide bacteriano. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **37**:281-290.

Gómez-Eichelmann, M.C. y R. Camacho-Carranza. 1995. Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **37**:291-304.

Gottesman, S., S. Wickner y M. Maurizi. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Rev. Genes & Development.* **11**:815-823.

Gross, C. A. 1996. Function and Regulation of the Heat Shock Proteins, p. 1382-1399. En: Neidhardt, F. C. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Hartl, F. U. 1994. Secrets of double-doughnut. *Nature.* **371**: 557-559.

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

Hunt, J., A. Weaver, S. Landry, L. Gierasch y J. Deisenhofer. 1996. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature.* **379**: 37- 45.

Jun-Ichi, K., H. Susuki y H. Ikeda. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 25676 - 25684.

Kato, J., Y. Nishimura, y M. Hirota. 1988. *J. Bacteriol.* **170**: 3967 - 3977.

Krawiec, S. y M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* **54**: 502 - 539.

Mizushima, T., Y. Ohtsuka, T. Miki y K. Sekimizu. 1994. Temperature shift-up leads to simultaneous and continuous plasmid DNA relaxation and induction of DnaK and GroEL proteins in anaerobically growing *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiology Letters*. **121**: 333-336.

Murai, N., Y. Makino y M. Yoshida. 1996. GroEL locked in a closed conformation by an interdomain cross-link can bind ATP and polypeptide but cannot precess futher reaction steps. *J. Biol. Chem.* **271**: 28229-28234.

Neidhardt. F. C., y R. A. Van Boogelen. 1987. Heat shock response. *In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Neidhardt. F. C. (Ed.) American Society for Microbiology Washington, D. C.

Ogata, Y., T. Mizushima, K. Kataoka, K. Kita, T. Miki y K. Sekimizu. 1996. DnaK heat shock protein of *Escherichia coli* maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. *J. Biol. Chem.* **271**: 29407-29414.

Owen-Hughes, T. A., G. Pavitt, D. Santos, J. Sidebotham, C. Hulton, J. Hinton y C. Higgins. 1992. The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell*. **71**: 255 - 265.

Parsell, D., Y. Sanchez, J. Stitzel y S. Lindquist. 1991. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature*. **353**: 270-273.

Peebles, C., P. Higgins, N. Kreuzer, A. Morrison, P. Brown, A. Sugino y R. Cozzarelli. 1978. Structure and Activities of *Escherichia coli* DNA Gyrase. En: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. **48** (DNA replication and recombination) (Parte 1) pp 41-52.

Randal, L., T. Topping y J. Hardy. 1994. The basis of recognition of nonnative structure by the chaperone SecB, p. 285-298. En: R. Morimoto, A. Tissières y C. Georgopoulos (ed.), *The Biology of HEAT SHOCK PROTEINS and MOLECULAR CHAPERONES*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rassow, J., O. Ahsen, U. Bömer y N. Pfanner. 1997. Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Rev. Trends in CELL BIOLOGY*. 7:129-133.

Roseman, A. M., S. Chen, H. White, K. Braig y H. Saibil. 1996. The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switchig and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell*. 87: 241-251.

Schmid, M. B. 1988. Structure and function of the bacterial chromosome. *Trends Biochem. Sci.* 13: 131-135.

Schmid, M. B. 1990. More than just "histone-like" proteins. *Cell*. 63: 451-453.

Schmidt, M., K. Rutkat, R. Rachel, G. Pfeifer, R. Jaenicke, P. Viitanen, G. Lorimer, J. Buchner. 1994. Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the funtional cycle. *Science*. 265: 656-659.

Schofield, M. A., R. Agbunag, M. Michaels y J. Miller. 1992. Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.* 174: 5168-5170.

Sidnen, R. R. y D. E. Pettijohn. 1981. Chrömosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. USA*. 78: 224-228.

Skowyra, D. y S. Wickner. 1995. GrpE alters the affinity of DnaK for ATP and Mg²⁺. *J. Biol. Chem.* 270: 26282-26285.

Steck, T., R. Franco, J. Wang y K. Drlica. 1993. Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol. Microbiol.* 10: 473-481.

Szyperski, T., M. Pellecchia, D. Wall, C. Georgopoulos y K. Wüthrich. 1994. NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondaty structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc. Natl. Acad. USA*. 91: 11343-11347.

Wang, J. C. 1985. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 665-697.

Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 635-692.

Weissman, J. S., C. Hohl, O. Kovalenko, Y. Kashi, S. Chen, K. Braig, H. Saibil, W. Fenton y A. Horwich. 1995. Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell.* **83**: 577-587.

Weissman, J. S., H. Rye, W. Fenton, J. Beechem y A. Horwich. 1996. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell.* **84**: 481-490.

Worcel, A. y E. Burgi. 1972. On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**: 127-147.

Yang, Y. y G. Ferro-Luzzi Ames. 1992. The family of repetitive extragenic palindromic sequences: interaction with DNA gyrase and histone-like protein HU, p. 211-225. En: K. Drlica y M. Riley *The Bacterial Chromosome*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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

Zuber, F., D. DKotlarz, S. Rimsky y H. Buc. 1994. Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **12**: 231-240.

Zylicz, M., D. Ang y C. Georgopoulos. 1987. The grpE protein of *Escherichia coli*. **262**: 17437-17442.