

03021  
6



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

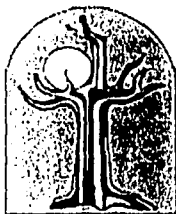
**ESTUDIOS SOBRE EL PAPEL DE  
LAS CHAPERONAS  
MOLECULARES EN LA  
PROTECCIÓN DE PROTEÍNAS  
CONTRA EL DAÑO OCASIONADO  
POR EL ESTRÉS OXIDATIVO.  
EJEMPLAR UNICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL ESPARZA CERÓN



BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México



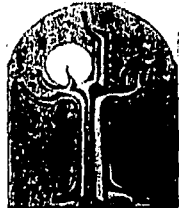
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



BIOMEDICAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Jorge Membrillo Hernández, en el Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Miguel Angel Esparza Cerón

Dr. Jorge Membrillo Hernández  
Investigador Titular "B" de T. C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Esta Tesis Está Dedicada a  
Angélica de la Cruz Cerón García**

## AGRADECIMIENTOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Quiero agradecer de todo corazón a las personas que han estado conmigo en los momentos más difíciles, en los fáciles y hasta en los momentos que nunca pensé en necesitar de alguien.

Agradezco a Dios por haberme dado la dicha de tener a mi lado en todo momento a la mujer más extraordinaria de todas: mi madre, quien me ha enseñado a hacer las cosas de la mejor manera y sé que cuando me he equivocado ha sido porque no he podido entender sus enseñanzas. Mil Gracias Madre.

También quiero agradecer y dedicar esta Tesis a mis hermanos, Félix y Aglaé, de quienes en todo momento he recibido un gesto de apoyo y comprensión. Sé que lo que hemos vivido juntos nos ha ayudado para mantenernos por siempre unidos.

Gracias a Manlio Quiroz por su paciencia y por permitirnos ocupar un espacio en su vida y en su familia. A Elena y Guadalupe a quienes hemos quedado unidos como hermanos, lo cual es algo que no voy a olvidar.

Gracias a mis grandes amigos y casi hermanos: Pepe Pak, quien me ha enseñado a ser; a Paco Mendoza, mi amigo de siempre y por siempre, a Alejandro Sánchez y a el perdido José Manuel Martínez Morales a quien estoy seguro que volveré a ver.

Mil gracias a Maritrini Colón por estar en los mejores y en los peores momentos, estoy convencido que sin su ayuda no hubiera podido salir adelante en muchas situaciones adversas. Gracias por el cariño que me ha demostrado a pesar de mis altibajos.

Gracias a mi madre académica, Beatriz Ruiz, por su apoyo académico y por la paciencia que ha tenido para escuchar y resolver mis problemas.

## RESUMEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El estrés oxidativo se ha definido como un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y su desecho a favor de su producción. Dicho desbalance se ha asociado con el envejecimiento celular y carcinogénesis, también se le ha involucrado con diferentes padecimientos como el Alzheimer. El estrés oxidativo puede dañar a todas las estructuras celulares ocasionando que gran parte de las funciones normales de la célula no se lleven a cabo. Por ello, todos los organismos tienen sistemas de defensa que les ayudan a hacer frente a este tipo de estrés. En *Escherichia coli* se ha estudiado la respuesta genética al estrés oxidativo y se ha descrito que dos regulones están involucrados: *oxyR* y *soxRS*. Sin embargo, en fechas recientes se ha descrito la participación de algunas chaperonas moleculares en la protección de proteínas contra el estrés oxidativo, con lo cual se ha abierto un campo de estudio bastante promisorio. En esta Tesis se pretende avanzar en el conocimiento sobre la participación de las chaperonas moleculares durante el estrés oxidativo.

El trabajo que se en esta Tesis demostró la protección de la enzima fermentativa etanol óxidorreductasa (AdhE) contra el estrés oxidativo a través de la unión de la chaperona molecular DnaK, sugiriendo, con base en los resultados obtenidos, a DnaK como un escudo molecular. Además se observó que las chaperonas HtpG, ClpB, Hsp33, IbpA e IbpB tienen un papel protector durante el estrés oxidativo ocasionado por el peróxido de hidrógeno. Dicho trabajo se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Joaquim Ros Salvador de la Universidad de Lérida, España.





## ABSTRACT

Oxidative stress has been defined as the lost in the balance between the production and disposal of reactive oxygen species favouring the production. Such imbalance has been associated with cellular aging and carcinogenesis, it has also been involved in different diseases such the Alzheimer. The oxidative stress can damage all cellular structures, causing disruption of many cellular processes. For these reasons, all organisms possess defence mechanisms against the oxidative damage. In *Escherichia coli*, two genetic responses to oxidative stress have been described: the *oxyR* and *soxRS* regulons. In addition, recent studies have proposed the involvement of some molecular chaperones in the protection against oxidative stress. These findings have opened a new field of research. The present work is focused on the understanding of the protective role of the molecular chaperones during the oxidative stress.

Our results demonstrated that the molecular chaperone DnaK is responsible for the protection of the ethanol oxidoreductase (AdhE) activity under aerobic conditions. Based on our data, DnaK is proposed as a molecular shield. Additionally, it was observed that the chaperones HtpG, ClpB, Hsp33, IbpA and IbpB have also a protective role in the oxidative stress protection in cells treated with hydrogen peroxide. The present work was carried out in collaboration with the group of Dr. Joaquim Ros Salvador from the University of Lleida, Spain.



## PRESENTACIONES Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Parte del trabajo descrito en esta Tesis ha sido presentado en conferencias o en publicaciones científicas:

### CONGRESOS

- 1) Membrillo-Hernández J., Esparza-Cerón M. A., Cornejo-Altuzar G., Medina-Vázquez G., Echave P., Cabisco E., Tamarit J., Ros J., and E. C. C. Lin. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. EMBO (European Molecular Biology Organization) Workshop on Prokaryotes in the Third Millennium. EMBL (European Molecular Biolaboratory), Heidelberg, Alemania. 26-30 abril, 2002.
- 2) Echave P., Esparza-Cerón M. A., Cabisco E., Tamarit J., Ros J., Membrillo-Hernández J., and E. C. C. Lin. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. Gordon Research Conference: Microbial Stress Response. Salve Regina University. Newport, Rhode Island, USA. 14-18 julio, 2002.
- 3) Esparza-Cerón M. A. and Membrillo-Hernández J. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. EURESCO Conference and FEBS Advanced Course, Biology of Molecular Chaperones, Mechanisms and Regulation of Chaperones. Tomar, Portugal. agosto 30-septiembre 4, 2003.

## PUBLICACIONES

- 1) Pedro Echave, M. Angel Esparza-Cerón, Elisa Cabisco, Jordi Tamarit, Joaquim Ros, Jorge Membrillo-Hernández and E. C. C. Lin, DnaK-dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol 99, no. 7, pp. 4626-4631. 2002.

## ABREVIATURAS

Todas las abreviaturas empleadas en este trabajo exceptuando las listadas a continuación, son las adoptadas por el Journal of Bacteriology e indicadas en el apartado de "Instrucciones a los autores".

DMSO	Dimetil sulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FRD	Fumarato reductasa
HEPES	4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-ácido etanosulfónico
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MK	Menaquinona
PeP	Fosfoenol piruvato
PFL	Piruvato formiato liasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
psi	Libras por pulgadas al cuadrado ( <i>Pounds-force per square inch</i> )
PVDF	Difloruro de polivinilideno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TA	Temperatura Ambiente
TMAO	Trimetilamina N-óxido
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. <b><i>Escherichia coli</i></b> .....	3
1.1.1. Respiración aeróbica .....	4
1.1.2. Respiración anaeróbica .....	5
1.1.3. Metabolismo fermentativo .....	6
1.2. <b>Estrés oxidativo en <i>Escherichia coli</i></b> .....	7
1.2.1. Consecuencias del estrés oxidativo.....	8
1.2.1.1. Daño oxidativo a los lípidos .....	8
1.2.1.2. Daño oxidativo al DNA.....	8
1.2.1.3. Daño oxidativo en proteínas .....	9
1.2.2. Respuestas al estrés oxidativo .....	10
1.2.2.1. Regulón <i>oxyR</i> .....	10
1.2.2.2. Regulón <i>soxRS</i> .....	11
1.2.2.3. Mecanismos independientes.....	12
1.3. <b>Chaperonas moleculares</b> .....	14
1.3.1. Definición de chaperona molecular.....	15
1.3.2. Clasificación.....	15
1.3.3. Funciones de las chaperonas .....	17
1.3.4. Sistema DnaK/J .....	19
1.3.5. Sistema GroEL/S .....	20
1.3.6. ClpB .....	21
1.3.7. HtpG.....	21
1.3.8. IbpA/B .....	22
1.3.9. Hsp33.....	22
1.4. <b>AdhE como un modelo de estudio del estrés oxidativo en <i>Escherichia coli</i></b> .....	23
1.4.1. Papel de AdhE en el metabolismo de <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.4.2. Regulación de AdhE .....	24
1.4.2.1. Regulación transcripcional .....	25
1.4.2.2. Regulación traduccional.....	25
1.4.2.3. Regulación postraduccional.....	26
1.4.3. Aislamiento de mutantes resistentes al MCO .....	27
1.4.3.1. FucO .....	27
1.4.3.2. AdhE .....	28
1.4.4. Antecedentes específicos del proyecto.....	28
1.5. <b>Objetivo en esta Tesis</b> .....	29

<b>CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	31
2.1. <b>Cepas y oligonucleótidos</b> .....	33
2.2. <b>Medios y condiciones de cultivo</b> .....	34
2.2.1. Medios de Cultivo .....	34
2.2.2. Condiciones de cultivo .....	35
2.3. <b>Métodos genéticos</b> .....	35
2.3.1. Transducción .....	35
2.3.1.1. Preparación de lisados.....	35
2.3.1.2. Transducción al genoma bacteriano .....	36
2.3.2. Mutagénesis por inserción de un elemento transponible .....	36
2.3.2.1. Preparación del lisado con fago $\lambda$ .....	37
2.3.2.2. Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10.....	37
2.4. <b>Métodos bioquímicos</b> .....	38
2.4.1. Curvas de crecimiento .....	38
2.4.2. Determinación de la concentración de proteínas .....	38
2.4.3. Viabilidad .....	38
2.4.4. Actividad enzimática de AdhE.....	39
2.4.5. Derivatización .....	39
2.4.6. Cuantificación cromatográfica de los carbonilos totales .....	40
2.4.6.1. Geles de poliacrilamida.....	41
2.4.7. Western-blot.....	43
2.4.8. Inmunodetección de proteínas.....	44
2.4.8.1. Inmunodetección de proteínas oxidadas.....	45
2.4.9. Coimmunoprecipitación.....	45
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b> .....	47
3.1. <b>DnaK en la protección de la enzima AdhE contra el estrés oxidativo</b> .....	49
3.1.1. Requerimiento de DnaK durante el crecimiento en etanol de la cepa JE46 y JE52.....	49
3.1.2. Actividad enzimática de AdhE.....	51
3.1.3. Ensayos de coimmunoprecipitación: Interacción física entre las proteínas DnaK y AdhE.....	52
3.1.4. Cuantificación de grupos carbonilos en el extracto proteico en ausencia de DnaK.....	54
3.2. <b>Estudios sobre la participación de diferentes chaperonas moleculares en la protección contra el estrés oxidativo</b> .....	56
3.2.1. Recuperación de un estrés oxidativo de cepas deficientes en diferentes chaperonas moleculares .....	57
3.2.2. Viabilidad de cultivos de cepas deficientes en diferentes chaperonas moleculares después de un estrés oxidativo .....	59
3.2.3. Búsqueda de otros componentes que participen en la defensa contra el estrés oxidativo .....	60
3.2.3.1. Aislamiento de mutantes de la cepa JE52 incapaces de crecer en etanol .....	60
<b>CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN</b> .....	63
4.1. <b>Resultados Generales</b> .....	65



4.1.1. Participación de chaperonas moleculares en la protección contra el daño ocasionado por el estrés oxidativo. ....	65
CAPÍTULO 5. REFERENCIAS .....	69
CAPÍTULO 6. APÉNDICE .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Respiración aeróbica en <i>E. coli</i> .....	5
Figura 1.2. Respiración anaeróbica en <i>E. coli</i> .....	7
Figura 1.3. Mecanismo de oxidación y reducción de los sistemas OxyR y SoxRS. ....	12
Figura 1.4. Funcionamiento esquematizado de los diferentes tipos de chaperonas presentes en <i>E. coli</i> .....	16
Figura 1.5. Esquema de las rutas fermentativas en <i>E. coli</i> .....	24
Figura 1.6. Estructura secundaria del transcrito del gen <i>adhE</i> obtenida del programa 'Mfold'.....	26
Figura 1.7. Oxidación catalizada por un metal (MCO) a través de la reacción de Fenton. ....	27
Figura 3.1. Construcción P <sub>IP<sub>7G</sub></sub> <i>dnaK</i> .....	49
Figura 3.2. Crecimiento de la cepa ECL4000 y cepas mutantes diferentes condiciones y fuentes de carbono.....	50
Figura 3.3. Actividad enzimática de AdhE en diferentes fondos genéticos .....	52
Figura 3.4. Coinmunoprecipitación de DnaK en extractos celulares .....	53
Figura 3.5. Formación de grupos carbonilo en células tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
Figura 3.6. Formación de grupos carbonilo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en cepas deficientes de diferentes chaperonas moleculares .....	57
Figura 3.7. Curva de recuperación al tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de mutantes deficientes en chaperonas. ....	58
Figura 3.8. Viabilidad de mutantes deficientes en diferentes chaperonas después de un tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	59
Figura 3.9. Esquema de la amplificación fragmentada del gen <i>adhE</i> . ....	61
Figura 3.10. Corroboración de la integridad de gen <i>adhE</i> .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Potenciales redox estándar de los diferentes aceptores externos de electrones que <i>E. coli</i> puede utilizar.....	5
Tabla 1.2. Reductasas terminales presentes en <i>E. coli</i> .....	6
Tabla 1.3. Genes regulados por los sistemas <i>oxyR</i> y <i>soxRS</i> .....	13

Tabla 1.4. Proteínas con actividad antioxidante independientes del los sistemas <i>oxyR</i> y <i>soxRS</i> . .....	14
Tabla 1.5. Principales familias de chaperonas en <i>E. coli</i> .....	17
Tabla 2.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en éste trabajo. ....	33
Tabla 2.2. Oligonucleótidos utilizados en éste trabajo.....	33

# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es una enterobacteria Gram-negativa anaeróbica facultativa la cual habita en el intestino del hombre y de muchos animales de sangre caliente. Este microorganismo también cuenta con la capacidad de sobrevivir fuera de su hospedero el tiempo suficiente para poder colonizar a uno nuevo.

*E. coli* ha sido, por varias razones, el organismo modelo en el cual se han estudiado muchos de los procesos fisiológicos esenciales de la vida. Debido a su rápida tasa de crecimiento, pocos requerimientos nutricionales, al desarrollo amplio de su genética y a la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma, *E. coli* es el organismo del que se cuenta con la mayor información acerca de su fisiología y funcionamiento.

Los estudios realizados en *E. coli* han contribuido con una gran cantidad de información fundamental con la cual se ha podido entender gran parte de la genética, incluyendo la naturaleza del material genético, definir a los genes y los mecanismos mediante los cuales estos funcionan y se regulan.

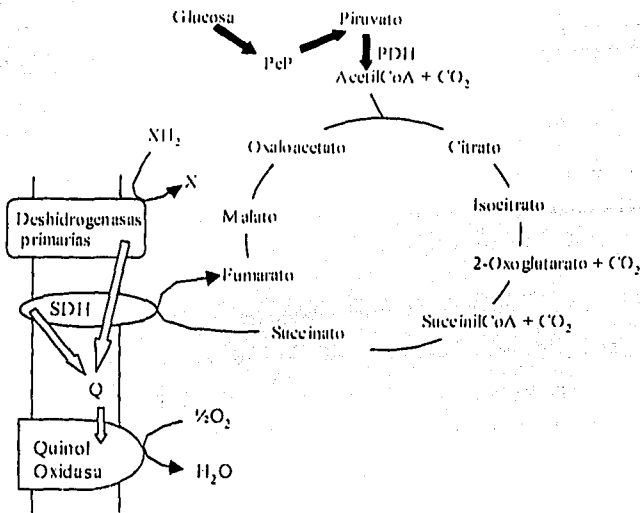
La secuencia completa del genoma de *E. coli* K-12 MG1655 fue reportada en septiembre de 1997 por Blattner y colaboradores (Blattner *et al.*, 1997). El genoma consiste en una doble cadena circular de DNA la cual contiene 4,639,221 pares de bases. Aproximadamente el 89% del cromosoma codifica para proteínas o RNA, el 11% restante del DNA son secuencias intergénicas las cuales están implicadas en regulación, también se encontraron secuencias de inserción, transposasas, profagos y secuencias inusuales de función desconocida las cuales pudieron tener su origen por transferencia horizontal. El análisis detallado del genoma completo de *E. coli* dio a conocer que el número real de genes es de 4,401, de los cuales 4,285 codifican para proteínas y 116 codifican para RNAs (Serres *et al.*, 2001).

### 1.1.1. Respiración aeróbica

Las bacterias anaeróbicas facultativas como *E. coli* pueden crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas obteniendo energía de la respiración o de la fermentación. El O<sub>2</sub> (dioxígeno) es una señal ambiental muy importante la cual es detectada por la célula para la regulación de su metabolismo, asegurando así que solamente la vía catabólica adecuada para la condición sea expresada. Esta bacteria es capaz de producir al menos dos oxidasas terminales y cuatro tipos de terminales reductasas dependiendo del aceptor de electrones que se encuentre en el medio.

En presencia del dioxígeno sólo se usa a éste como último aceptor de electrones. En estas condiciones la fuente de carbono es oxidada, en el caso de la glucosa, a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs, hasta la formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Los electrones generados en este proceso son transferidos a una cadena de transporte de electrones donde el último aceptor de estos es el oxígeno. Las moléculas responsables de la reducción del dioxígeno a agua en *E. coli* son dos quinol oxidasas (Fig. 1.1.). Durante el crecimiento en tensiones altas de oxígeno la quinol oxidasa *bo*<sub>3</sub> es expresada y cuando la concentración del O<sub>2</sub> baja hasta llegar a la microaerofilia (aproximadamente 2% de O<sub>2</sub>), la terminal oxidasa *bo*<sub>3</sub> es reemplaza por la quinol oxidasa *bd*, esta última tiene 100 veces mayor afinidad por el dioxígeno que la *bo*<sub>3</sub> (D'Mello *et al.*, 1995).

La utilización jerárquica del O<sub>2</sub> sobre otros aceptores de electrones se debe a que el cambio de energía libre que se produce al degradar un sustrato es directamente proporcional al potencial del par redox del aceptor de electrones externo, como se muestra en la Tabla 1.1. el potencial redox que se obtiene utilizando al O<sub>2</sub> es mayor que cualquier otro aceptor de electrones que puede utilizar *E. coli*.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 1.1. Respiración aeróbica en *E. coli* (Spiro y Guest, 1991).

Tabla 1.1. Potenciales redox estándar de los diferentes aceptores externos de electrones que *E. coli* puede utilizar.

Pareja redox	$E'_0$ (V)
Fumarato / Succinato	+0.03
$(CH_3)_2SO / (CH_3)_2S$	+0.16
$NO_3^- / NO_2^-$	+0.43
$O_2 / H_2O$	+0.82

### 1.1.2. Respiración anaeróbica

En ausencia de dioxígeno la cadena respiratoria aeróbica es modificada de tal manera que en estas condiciones se puede utilizar a un aceptor de electrones alternativo, para ello es necesario la inducción de la ruta metabólica apropiada para la terminal reductasa requerida. Como ya se mencionó, *E. coli* cuenta con cuatro reductasas terminales diferentes, las cuales están reguladas jerárquicamente dependiendo del aceptor de electrones disponible (Tabla 1.2.).

**Tabla 1.2. Reductasas terminales presentes en *E. coli*.**

Reductasa terminal	Reacción catalizada
Nitrato reductasa (I y II)	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$
Fumarato reductasa	Fumarato $\rightarrow$ Succinato
Sulfóxido reductasa	$(\text{CH}_3)_2\text{SO} \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{S}$
Amina-N-óxido reductasa	$(\text{CH}_3)_3\text{NO} \rightarrow (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{H}$

En ausencia del dióxígeno el ciclo de Krebs es transformado en una vía no cíclica, en este cambio se reprime considerablemente el complejo enzimático de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, además es reemplazada la enzima succinato deshidrogenasa por la fumarato reductasa. El complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa es substituido por la piruvato formato liasa. La mayoría del sustrato, durante la respiración anaeróbica, es convertido a acetato, etanol,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ , además se generan pequeñas cantidades de succinato, formiato y lactato (Fig. 1.2; Spiro y Guest, 1991).

### 1.1.3. Metabolismo fermentativo

En ausencia de aceptores de electrones, *E. coli* puede llevar a cabo la fermentación, en este proceso los azúcares son transformados en una mezcla de ácidos y no son degradados a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$  como en la respiración. Los productos mayoritarios de la fermentación en *E. coli* son el acetato, etanol y formiato, también se generan pequeñas cantidades de succinato (Clark, 1989).

La fermentación es un proceso redox, en el cual el ATP es generado a través de la fosforilación a nivel de sustrato acoplada a la oxidación del mismo. Por otro lado el transporte de electrones a una molécula receptora no está acoplado a la conservación energética de dicho proceso a diferencia de la respiración (Lengeler *et al.*, 1999).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



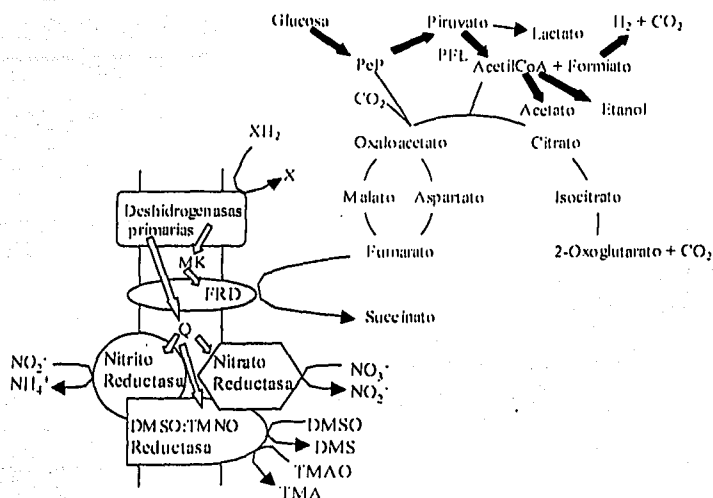


Figura 1.2. Respiración anaeróbica en *E. coli* (Spiro y Guest, 1991).

### 1.2. Estrés oxidativo en *Escherichia coli*.

En la tierra primigenia prevalecía una atmósfera reductora y fueron bajo estas condiciones donde los primeros seres vivos aparecieron en nuestro planeta. Con la aparición de los organismos fotosintéticos, aproximadamente hace 2,700 millones de años, la atmósfera primitiva comenzó a sufrir importantes cambios, ya que gradualmente se fue acumulando el  $O_2$  en el ambiente. La aparición del  $O_2$  ocasionó la evolución del metabolismo aeróbico con el cual un organismo es capaz de utilizar al dioxígeno para producir energía (Lengeler *et al.*, 1999).

Aunque el utilizar el dioxígeno en el metabolismo resultó beneficioso en el aspecto energético para los organismos, la reducción de esta molécula a  $H_2O$  en la cadena respiratoria genera inescapablemente especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales libres hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) los cuales pueden reaccionar irreversiblemente con los diferentes componentes celulares deteriorando las funciones normales de la célula (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El estrés oxidativo se ha definido como un desbalance entre la producción de ROS y su desecho a favor de su producción (Storz y Zheng, 2003). Dicho desbalance se ha asociado con el envejecimiento celular y carcinogénesis, también se le ha involucrado con diferentes padecimientos como el Alzheimer y la progeria (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### 1.2.1. Consecuencias del estrés oxidativo

Actualmente existe una gran cantidad de trabajos publicados referentes al daño que representa la exposición de los organismos a las ROS, por lo que se ha hecho un gran esfuerzo por comprender los mecanismos por los cuales se producen estas moléculas en el metabolismo, conocer su impacto en los diferentes componentes celulares así como las defensas que tienen los organismos para contender con ellas.

#### 1.2.1.1. Daño oxidativo a los lípidos

En los lípidos la oxidación puede causar la formación de peróxidos lipídicos lo cual conlleva una disminución en la fluidez de la membrana, además de inducir el intercambio de fosfolípidos entre la bicapa y afectar la permeabilidad de la misma (Richter, 1987). No hay que dejar a un lado que el cromosoma de muchos organismos se encuentra anclado a la membrana, por lo que el daño en lípidos puede ocasionar una desestabilización en el anclaje del material genético (Halliwell y Gutteridge, 1999).

#### 1.2.1.2. Daño oxidativo al DNA

El DNA puede sufrir mutaciones de manera espontánea a causa de la oxidación intrínseca de la célula, de hecho se ha demostrado que la citosina puede perder su grupo amino y transformarse en uracilo, lo cual puede ocasionar mutaciones en el DNA durante la replicación del mismo. Aún así, éstas y otras modificaciones, debido a la baja frecuencia con la que suceden y a los sistemas de reparación del DNA con los que

cuenta la célula, el impacto que tienen en el organismo es poco significativo en la gran mayoría de los casos. Sin embargo, durante un estrés oxidativo la frecuencia con la que sucede estos procesos aumenta considerablemente (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otra parte, los radicales libres hidroxilo, generados durante un estrés oxidativo, pueden reaccionar directamente con las bases nitrogenadas en el DNA y formar diferentes compuestos como la 8-hidroxiadenina, 8-hidroxi guanina, 5-hidroxiuracilo, glicol citosina, entre otros compuestos. Estas alteraciones en las bases propician transversiones o transiciones en la secuencia del DNA (Cooke *et al.*, 2003). Así mismo, las hebras de DNA pueden romperse debido a las ROS y originar enlaces entre las bases nitrogenadas y aminoácidos de proteínas, principalmente aquellas que interaccionan con el DNA, esto ocasiona que los sistemas de reparación del DNA no pueda llevar a cabo su función lo cual tiene una gran repercusión en la replicación y transcripción del material genético (Altman *et al.*, 1995).

#### 1.2.1.3. Daño oxidativo en proteínas

Las proteínas también sufren considerables daños a causa de las ROS, sin embargo, los estudios que se han realizado al respecto son limitados, esto se debe principalmente a que se ha dificultado montar técnicas donde se pueda detectar con relativa facilidad los productos de la oxidación proteica. Además, en muchas ocasiones el daño a proteínas sólo es evidente en aquellas que llevan a cabo alguna función enzimática ya que ha sido sencillo correlacionar el daño que ha sufrido la enzima con la disminución de su actividad, a pesar de ello, no quiere decir que la enzima no haya sufrido algunos cambios por la oxidación aún antes de perder su actividad.

Los estudios que se han realizado en relación a las modificaciones que sufren las proteínas a causa de las ROS muestran que las prevalentes son aquellas que se dan en las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos, como la formación de hidróxidos, hidroperóxidos y aldehídos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Además, se ha observado que la oxidación puede causar la liberación de  $\text{NH}_3$ ,  $\alpha$ -cetoácidos,  $\text{CO}_2$  y

hasta la escisión de la cadena peptídica (Stadtman, 1993). Así mismo, podemos mencionar de manera importante la formación de grupos carbonilo durante la oxidación de algunos residuos de aminoácidos como la treonina y la tirosina (Levine *et al.*, 1994).

### 1.2.2. Respuestas al estrés oxidativo

Actualmente sabemos que las células cuentan con todo un sistema de adecuación que les permiten contender con el estrés oxidativo. En *E. coli* se han descrito dos sistemas globales de respuesta al estrés oxidativo: *oxyR* y *soxRS* cada sistema responde a diferentes agentes oxidantes. Tanto el regulón de *oxyR* como el de *soxRS* tienen la finalidad de activar a una serie de genes que codifican proteínas que ayudan a eliminar a las ROS, participan en la protección y reparación del material genético y regulan parte del metabolismo celular como la utilización del hierro. La descripción de dichos sistemas dio a conocer la existencia de una respuesta adaptativa al estrés oxidativo a nivel molecular. Al parecer existen de una u otra manera mecanismos similares de respuesta al estrés oxidativo a lo largo de la escala evolutiva, lo cual habla de la importancia vital que tiene poder contender con la oxidación para los organismos.

#### 1.2.2.1. Regulón *oxyR*

OxyR es una proteína de 34 kDa la cual presenta en el dominio amino terminal un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a DNA (Zheng *et al.*, 1998). Esta proteína se encuentra en la célula como homotetrámero el cual pueden existir en dos formas, reducida u oxidada, y únicamente en la forma oxidada puede funcionar como activador transcripcional (Storz *et al.*, 1990). El estado redox de esta proteína está en función a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula, cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta puede ser censado por OxyR a través de la formación de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteínas (C199 y C208; Fig. 1.3. A; Zheng *et al.*, 1998). Hasta la fecha se han identificado una decena de genes que son activados por OxyR, las proteínas que son codificadas por dichos genes protegen contra el daño que puede causar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

eliminandolo (hidroperoxidasa I y alquil hidroperóxido reductasa), ayudan a mantener el balance tior-disulfuro en la célula (glutación reductasa, glutarredoxina 1 y tioredoxina 2), protegen el DNA del estrés oxidativo (Dps) y evitan la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como el represor de la internalización del hierro: Fur (Tabla 1.3.; Storz y Zheng, 2003).

1.2.2.2: Regulón *soxRS*

El regulón *soxRS* responde a la oxidación ocasionada por el radical superóxido. La respuesta se encuentra regulada en dos pasos: el primero es la activación de la proteína SoxR a través de la oxidación de su centro hierro-azufre, y el segundo es la producción de la proteína SoxS, la cual es el activador transcripcional de al menos catorce genes que codifican para proteínas involucradas en la protección al daño oxidativo (Wu y Weiss, 1992). Posteriormente Pomposiello y colaboradores (Pomposiello *et al.*, 2001) estudiaron el perfil transcripcional del genoma de *E. coli* durante el estrés oxidativo ocasionado por el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> identificando 112 genes que son regulados en respuesta a dicho estímulo, muchos de los cuales no se encuentran bajo la regulación del sistema *soxRS* como *lyxK* (L-xilulosa cinasa), *sodB* (superóxido dismutasa), genes codificantes para subunidades del ribosoma, entre otros.

La proteína SoxR es un regulador transcripcional, su peso es de 17 kDa y tiene un centro [2Fe-2S]. Esta proteína se encuentra en la célula constitutivamente como un homodímero el cual activa únicamente la transcripción del gen *soxS* cuando su centro reducido ([2Fe-2S]<sup>1+</sup>) es oxidado ([2Fe-2S]<sup>2+</sup>) por el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Fig.1.3. B; Ding *et al.*, 1996)

Además de proteger contra el daño causado por el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el regulón SoxRS también le confiere resistencia a la célula contra el daño que pueda ocasionar algunos solventes orgánicos, especies reactivas de nitrógeno (Nunoshiba *et al.*, 1993) y a diferentes antibióticos y drogas (Miller y Sulavik, 1996); de hecho se piensa que la activación del sistema SoxRS puede ser considerada como la respuesta a xenobióticos más que a estrés oxidativo (Storz y Zheng, 2003).

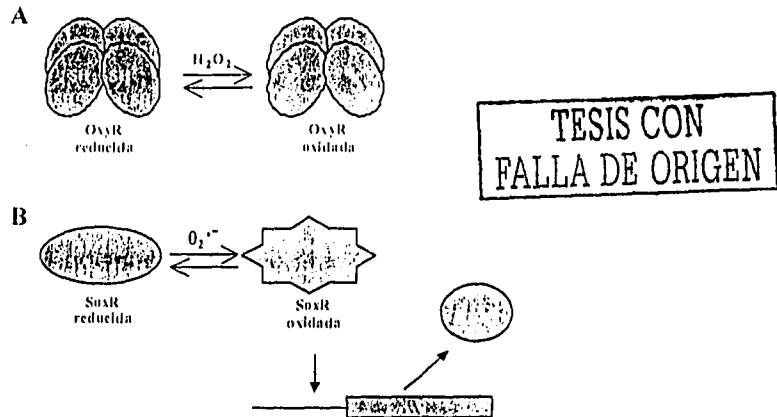


Figura 1.3. Mecanismo de oxidación y reducción de los sistemas OxyR (A) y SoxRS (B).

Entre los genes que son inducidos por SoxS se encuentran los que codifican para la superóxido dismutasa de manganeso (*sodA*) la cual cataliza la reducción del  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ , la endonucleasa IV (*nfo*) que participa en la reparación del DNA y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*) la cual ayuda en la recuperación del poder reductor de la célula, entre otras (Tabla 1.3.).

### 1.2.2.3. Mecanismos independientes

Se han descubierto diferentes proteínas en *E. coli* que tienen claramente funciones protectoras contra el estrés oxidativo o nitrosativo y que no están bajo la regulación transcripcional de los regulones *oxyR* y *soxRS* (Tabla 1.4.). En algunos casos se sabe la forma de regulación de estas proteínas como las enzimas hidropoxidasa II y la exonucleasa III las cuales se encuentran bajo la regulación del factor sigma de fase estacionaria ( $\sigma^S$ ; Loewen *et al.*, 1998), en otros casos se desconoce la forma de regulación como la flavohemoglobina Hmp la cual se ha observado que es inducida por NO y  $O_2^{\bullet-}$  de manera independiente de SoxRS (Poole *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández *et al.*, 1997).

Tabla 1.3. Genes regulados por los sistemas *oxyR* y *soxRS* (modificado de Storz y Zheng, 2000).

Gen	Proteína codificada
<b>Sistema OxyR</b>	
<i>agn43</i>	Antígeno 43
<i>ahpCF</i>	Alquil hidroperóxido reductasa
<i>dps</i>	Dps
<i>fuhF</i>	Reductasa de hierro
<i>fur</i>	Represor de la internalización de hierro
<i>gorA</i>	Glutation reductasa
<i>grxA</i>	Glutarredoxina 1
<i>katG</i>	Hidroperoxidasa I
<i>oxyS</i>	RNA regulatorio
<i>trxC</i>	Tioredoxina 2
<b>Sistema SoxRS</b>	
<i>acnA</i>	Aconítasa A
<i>acrAB</i>	Bomba de salida de diversas drogas
<i>fldA</i>	Flavodoxina
<i>fldB</i>	Flavodoxina
<i>fpr</i>	Ferreodoxina/flavodoxina reductasa
<i>fumC</i>	Fumarasa C
<i>fur</i>	Represor de la internalización de hierro
<i>micF</i>	RNA regulador de <i>ompF</i>
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV
<i>nfsA</i>	Nitroreductasa A
<i>ribA</i>	GTP ciclohrolasa
<i>sodA</i>	Manganeso superóxido dismutasa
<i>toIC</i>	Proteína de la membrana externa
<i>zwf</i>	Gucosa-6-fosfato deshidrogenasa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1.4. Genes inducidos por estrés oxidativo de manera independiente de los sistemas *oxyR* y *soxRS* (modificado de Storz y Zheng, 2000).

Gen	Proteína codificada
<i>hmp</i>	Flavoheemoglobina
<i>hslO</i>	Hsp33
<i>satE</i>	Hidroperoxidasa II
<i>msrA</i>	Metionina sulfóxido reductasa
<i>nth</i>	Endonucleasa III
<i>polA</i>	DNA polimerasa I
<i>recA</i>	RecA
<i>sodB</i>	Superóxido dismutasa
<i>sodC</i>	Superóxido dismutasa de Cobre-Zinc
<i>xthA</i>	Exonucleasa III

### 1.3. Chaperonas moleculares.

Además de los sistemas globales de respuesta al estrés oxidativo se ha descrito que el regulón de estrés térmico, particularmente la inducción de chaperonas moleculares, también es importante durante la protección contra dicho estrés (Dukan y Nystrom, 1998; Dukan y Nystrom, 1999). De manera importante, se ha descrito a una chaperona molecular cuya actividad es regulada por su estado redox (Jakob *et al.*, 1999), de quien más adelante hablaremos. Así, se ha comenzado a vislumbrar a las chaperonas moleculares como un elemento importante en la protección contra el estrés oxidativo.

Para el funcionamiento correcto de las proteínas es necesario que éstas tengan una conformación tridimensional determinada, aunque la adquisición de dicha conformación depende en gran medida de su estructura primaria, el ambiente donde se encuentre la proteína puede influir de manera importante, ya sea para conservar la conformación correcta de ésta o para modificarla. A nivel celular, lo anterior tienen repercusiones importantes ya que al interferir con el plegamiento de una proteína puede significar la pérdida de su función.



En el plegamiento de una proteína participan diferentes tipos de interacciones moleculares, en muchos de los casos no covalentes, como los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces disulfuro, entre otras; debido a la naturaleza de dichas interacciones existen varios factores que pueden influir en ellas, y por tanto en el plegamiento de las proteínas, como la temperatura, la oxidación e inclusive la concentración de las mismas proteínas (Mogk *et al.*, 2001).

Los organismos han tenido que desarrollar sistemas que prevengan el desdoblamiento de las proteínas así como la interacción inespecífica entre sí, estas funciones son llevadas a cabo por las chaperonas moleculares.

### 1.3.1. Definición de chaperona molecular

Las chaperonas moleculares son proteínas cuya función es reconocer a otras proteínas en estado no nativo y asistirles para que adquieran su conformación funcional o sean degradadas. Es decir que las chaperonas son capaces de reconocer a aquellas proteínas que no tienen o que hayan perdido su conformación tridimensional, la cual les permite llevar a cabo su función, además de reconocerlas pueden ayudar a estas proteínas a adquirir o readquirir su conformación funcional; si no es posible, las chaperonas las exponen para que sean degradadas (Hayes y Dice, 1996).

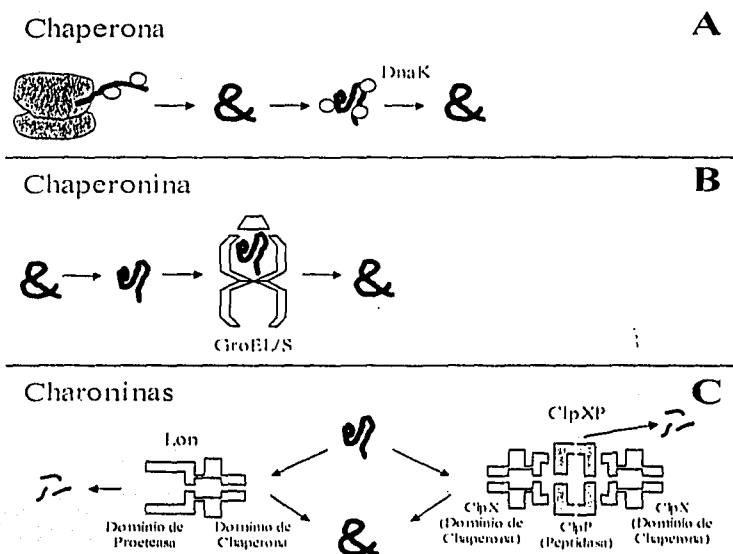
### 1.3.2. Clasificación

A las chaperonas se les ha clasificado en dos grandes grupos: chaperonas y chaperoninas. La diferencia entre estos grupos es el mecanismo mediante el cual asisten a las proteínas desplegadas para que readquieran su conformación funcional.

Las chaperonas reconocen a su sustrato a través de interacciones hidrofóbicas, el mecanismo mediante el cual actúan es propiciando un microambiente en la zona de

interacción con su substrato el cual le permite a este último readquirir o adquirir su conformación funcional (Fig. 1.4. A; Song y Morimoto, 2001).

Las chaperoninas, al igual que las chaperonas, reconocen a su substrato por interacciones hidrofóbicas; la diferencia consiste en que la chaperoninas forman multímeros con una estructura similar a la de un barril, las proteínas que necesitan ser asistidas son introducidas en dicha estructura y es ahí donde tienen el ambiente propicio para adquirir su conformación nativa (Fig. 1.4. B; Ranson *et al.*, 1998).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura 1.4. Funcionamiento esquematizado de los diferentes tipos de chaperonas presentes en *E. coli*.

Finalmente, podemos mencionar aquellas proteínas que participan en la degradación de péptidos dependientemente de ATP, las cuales, aunque no se han reconocido ampliamente como otro grupo de chaperonas y sólo se han descrito algunas como chaperonas asociadas a proteasas, tal es el caso de ClpXP y ClpAP (Fig. 1.4. C) o definitivamente proteasas como Lon y FtsH, tienen un mecanismo de acción y una estructura muy parecida a las chaperonas por lo que algunos autores les han denominado charoninas (Maurizi, 2001). La importancia de las charoninas en la célula

radica en que más del 90% de la degradación de las proteínas es dependiente de ATP, lo que implica que parte importante de la degradación de proteínas es a través de chaperonas (Maurizi, 1992).

Por otra parte las chaperonas también se han agrupado en familias con base en el peso molecular. En la Tabla 1.5. se encuentran enlistadas las principales familias de chaperonas de *E. coli*.

**Tabla 1.5. Principales familias de chaperonas en *E. coli* (modificado de Lund, 2001).**

Familia de chaperonas	Chaperona en <i>E. coli</i>	Homólogo en Eucariote	Función
Hsp100	CipA	Hsp104, Hsp78	Proteólisis dependiente de ATP
	CipB	Afg3p, Rcalp	Desagregación de proteínas dependiente de ATP
	CipX	Lon	Proteólisis dependiente de ATP
	CipY (HslU)		Proteólisis dependiente de ATP
	FtsH		Proteólisis dependiente de ATP
	Lon		Proteólisis dependiente de ATP
Hsp90	HtpG	Hsp82	Chaperona dependiente de ATP
Hsp70	DnaK	Hsc70, Hsp72, Bip	Chaperona dependiente de ATP
	Hsc66	Ssq1p	Desconocida
	Hsc62		Desconocida
Hsp60	GroEL	CCT, Tric	Chaperona dependiente de ATP
Hsp40	DnaJ	Hdj-1, Scj1, Ydj1	Chaperona independiente de ATP
Sep	IbpA, IbpB	Hsp25	Chaperona dependiente de ATP
Hsp33	Hsp33		Chaperona independiente de ATP regulada por redox

### 1.3.3. Funciones de las chaperonas

La asistencia de las chaperonas en el plegamiento de los péptidos nacientes y en la protección de las proteínas ya sintetizadas, son las funciones básicas que tienen las chaperonas en la célula. Sin embargo, las chaperonas moleculares están involucradas en diversos procesos celulares.

Como se mencionó, el control de la calidad de las proteínas se encuentra regulado por las chaperonas y no sólo por las chaperonas, de hecho se ha reportado que

mutaciones en las chaperonas específicas como en DnaK, DnaJ, GroEL y GroES disminuyen la tasa de degradación de las proteínas (Mogk *et al.*, 2001).

El desdoblamiento de las proteínas y su agregación es el mayor daño que causa el estrés térmico en las células. Las chaperonas son parte vital en la respuesta a éste estrés y es en este rubro donde se han realizado una impresionante cantidad de trabajos. Se ha descrito que las chaperonas ayudan a las proteínas ya sintetizadas a mantener su conformación funcional durante el estrés lo que permite que los procesos celulares puedan realizarse aún en condiciones de temperaturas altas.

Sin embargo, la protección contra el estrés térmico no es la única función de las chaperonas moleculares.

Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de pequeñas chaperonas moleculares (sHsp; *small Heat shock proteins*) en *E. coli* aumentan la resistencia al estrés oxidativo causado por  $O_2^{\bullet -}$  (Kitagawa *et al.*, 2000). Por otro lado se ha descrito a la chaperona Hsp33 cuya función está regulada por su estado redox (Jakob *et al.*, 1999). Dicha chaperona cuenta con cuatro residuos de cisteínas altamente conservadas en relación a sus homólogos en otros organismos diferentes a *E. coli*, la oxidación de los residuos de cisteínas promueven la formación de enlaces disulfuro los cuales regulan la actividad de chaperona de esta proteína (Barbirz *et al.*, 2000). Por lo anterior se ha propuesto una participación de las chaperonas moleculares en la protección al estrés oxidativo.

Por otro lado, un gran número de proteínas requieren ser transportadas a través de la membrana celular. Este proceso esta regulado por la secuencia de aminoácidos del amino terminal de los péptidos y por una maquinaria de proteínas que comprende tanto a proteínas embebidas en la membrana como a proteínas que se encuentran en su periferia, también se a observado la participación de las chaperonas en éste proceso.

La chaperona tetramérica SecB es un claro ejemplo de la participación de las chaperonas en el transporte de proteínas a través de la membrana celular, dicha chaperona mantiene a los péptidos que serán transportados desdoblados con la finalidad de que puedan pasar por el complejo del translocón. SecB unido a su sustrato puede interactuar con la proteína SecA la cual sirve como un nexo entre SecB y el translocón (Driessen *et al.*, 1998).

Además de lo ya mencionado, existen otros procesos celulares que requieren la participación de las chaperonas moleculares como la degradación de proteínas (Maurizi, 1992), la síntesis de péptidos (Hesterkamp *et al.*, 1996), entre otros.

#### 1.3.4. Sistema DnaK/J

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La chaperona DnaK de *E. coli* es parte de la familia Hsp70, esta compuesta de dos dominios funcionales; el dominio ATPasa, el cual abarca del residuo 1 al 385, y el dominio de unión a péptidos, el cual comprende del residuo 393 al 537. Un punto importante de DnaK y de otras chaperonas de la familia Hsp70 es el hecho que su interacción con un péptido, ya sea para unirse o liberarlo, está modulada por la unión e hidrólisis de ATP. La unión de DnaK con ATP forma un complejo de baja afinidad por su sustrato, en este estadio DnaK puede unir y liberar un péptido en un lapso de segundos e inclusive de milisegundos. Por otro lado, DnaK al hidrolizar al ATP forma un complejo de alta afinidad por su sustrato, el cual puede mantenerse unido un péptido por minutos e inclusive horas (Slepenkov y Witt, 2002). Para llevar a cabo el intercambio del ADP por ATP y reanudar el ciclo de acción de DnaK se requiere la participación de la proteína GrpE la cual cataliza la disociación del ADP-DnaK y promueve la unión de ATP-DnaK (Packschies *et al.*, 1997). En estos ciclos de unión y liberación del péptido se promueve su plegamiento de la proteína desdoblada.

DnaK requiere la participación de su co-chaperona DnaJ para hacer más eficiente el reconocimiento a sus sustratos. DnaJ puede unir proteínas parcialmente desnaturalizadas, una vez establecido el complejo DnaJ-péptido, este es reconocido por

ATP-DnaK y través de la interacción entre el dominio J de DnaJ y el dominio ATPasa de DnaK se promueve la hidrólisis de ATP, de esta manera DnaK forma un complejo de alta afinidad y estabiliza la unión con su sustrato (Karzai y McMacken, 1996).

DnaJ es una chaperona de 40 kDa que consta de cuatro dominios: el dominio del extremo amino terminal o dominio J, el cual abarca del residuo 1 al 78, seguido de una secuencia de conexión que va del residuo 79 al 142 la cual une al dominio J con un dominio de dedos de zinc constituido por los residuos del 143 al 200 y por último se encuentra el dominio carboxilo terminal, este dominio es altamente conservado y abarca de residuo 201 al 376 (Kelley, 1998).

### 1.3.5: Sistema GroEL/S

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La chaperonina GroEL es el típico ejemplo de las chaperonas de la familia Hsp60. Junto a su co-chaperona GroES forman el sistema GroEL/S, el cual es el único sistema de chaperonas esencial en cualquier condición de cultivo de *E. coli* (Fayet *et al.*, 1989). GroEL es una proteína de 57 kDa que se encuentra en la célula como un homoligómero de catorce subunidades las cuales forman dos anillos heptaméricos que a su vez forman una estructura de barril con dos grandes cavidades (Braig *et al.*, 1994). La subunidad de GroEL esta dividida en el dominio apical, que corresponde a los residuos 191-376; el dominio intermedio que va del residuo 134 al 190 y del 377 al 408; y el dominio ecuatorial, que abarca los residuos 1 al 333 y 409 al 547. La unión a los péptidos se realiza en la parte superior de los dominios apicales, en este dominio se forma un ambiente hidrofóbico apropiado para la interacción con las regiones hidrofóbicas de las proteínas que se encuentran plegadas inapropiadamente (Fenton *et al.*, 1994). Al igual que DnaK, la unión y liberación de los péptidos con GroES está modulado por ATP. La co-chaperona GroES es un homoheptámero de subunidades de 10 kDa, el heptámero es la cubierta del barril formado por GroEL (Fig. 1.4. B).

El complejo de GroEL cuenta con siete sitios de unión a ATP en cada anillo. Cuando uno de los anillos tiene ATPs, éste es capaz de reconocer a un péptido que se encuentre parcialmente desdoblado. Así mismo se promueve la unión de ese anillo con

GroES esto desplaza al péptido dentro de la cavidad de GroEL. Lo anterior promueve la liberación de ADP, GroES y algún péptido encapsulado en el anillo contrario. Después de 10 a 20 segundos el ATP es hidrolizado en el anillo donde se encuentra el péptido capturado con lo cual se promueve la disociación de éste y de GroES, reiniciando así el ciclo (Rye *et al.*, 1999).

1.3.6. ClpB

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ClpB es parte de la familia Hsp100, ha sido descrita como una chaperona molecular que puede desagregar aglomerados de proteínas mediante la hidrólisis de ATP y en conjunto con el sistema de chaperonas DnaK-DnaJ (Goloubinoff *et al.*, 1999). Se ha observado que ClpB, además de ser inducida por el estrés térmico, juega un papel vital en la viabilidad de las células de *E. coli* a altas temperaturas.

Por otra parte se ha descrito que ClpB forma homoheptámeros en presencia de nucleótidos con una estructura parecida a un anillo, su actividad de ATPasa está regulada por la unión al péptido que será asistido (Kim *et al.*, 2000). Sin embargo el mecanismo por el cual ClpB reconoce a su substrato y lo asiste para que adquiera su conformación funcional no se ha descrito aún.

La familia a la que pertenece ClpB (Hsp100) está dividida en dos subfamilias. Los miembros de la subfamilia de clase I tienen dos dominios de unión a nucleótidos, mientras que los miembros de la clase II sólo tienen uno. ClpB se encuentra entre los miembros de la subfamilia de clase II (Schirmer *et al.*, 1996).

### 1.3.7. HtpG

La chaperona HtpG tiene un peso molecular de 65.5 kDa y presenta homología con la proteína Hsp90 descrita en eucariontes. La ausencia de HtpG no afecta la viabilidad de *E. coli*, sin embargo el crecimiento es disminuido en cultivos crecidos a más de 44°C (Bardwell y Craig, 1988). HtpG funciona como un dímero y es inducida por

estrés térmico (Spence y Georgopoulos, 1989). El funcionamiento en *E. coli* de HtpG no ha sido plenamente descrito, mucho de lo que se ha especulado con relación a su mecanismo de acción ha sido a través de los trabajos realizados en homólogos de ésta chaperona en diferentes organismos.

### 1.3.8. IbpA/B

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las proteínas IbpA e IbpB son de la familia de chaperonas sHsp, de las cuales se han encontrado homólogos en todos los organismos estudiados. Ambas proteínas pueden formar multímeros de una peso de molecular alrededor de 2 a 3 MDa que están formados de 100 a 150 subunidades. Estas chaperonas previenen la desnaturalización de otras proteínas ya sea por calor o por oxidación independientemente de ATP (Kitagawa *et al.*, 2002).

### 1.3.9. Hsp33

Hsp33 es una chaperona cuya transcripción está regulada por la respuesta al estrés térmico (Chuang y Blattner, 1993), sin embargo su regulación post-transcripcional esta bajo el control de su estado de oxidación (Jakob *et al.*, 1999). Ésta chaperona previene eficientemente la agregación de proteínas en vías de desdoblamiento, pero es incapaz de asistir a proteínas desdobladas para que readquieran su conformación funcional (Graf y Jakob, 2002).

Bajo condiciones reductoras, la chaperona Hsp33 se encuentra en monómeros y las cuatro cisteínas que regulan la actividad de esta chaperona están coordinadas con el zinc, en esta conformación Hsp33 no presenta en su superficie regiones hidrofóbicas lo que previene interacción con sus substratos (Raman *et al.*, 2001). En condiciones oxidantes, las cisteínas que se encontraban coordinadas con el zinc forman enlaces disulfuro entre ellas, liberando de esta manera al metal y propiciando la exposición de una superficie hidrofóbica lo cual activa a Hsp33 como chaperona (Jakob *et al.*, 1999)).



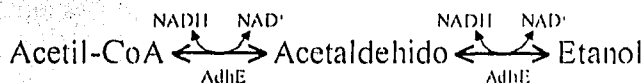
#### 1.4. AdhE como un modelo de estudio del estrés oxidativo en *Escherichia coli*.

Muchas proteínas que son requeridas en la célula en condiciones anaeróbicas son muy susceptibles a la inactivación por oxidación. Sin embargo, es posible obtener proteínas de funciones anaeróbicas que, a través de mutaciones, adquieren la capacidad de realizar su función aún en condiciones aeróbicas, lo cual indica que de algún modo éstas proteínas son menos susceptibles al daño causado por la oxidación. Estudiar los mecanismos por los cuales dichas proteínas pueden llevar a cabo sus funciones en aerobiosis, ha ayudado a enriquecer nuestro entendimiento sobre las diferentes alternativas que tiene la célula para hacer frente al daño causado por la oxidación. Un claro ejemplo es la enzima AdhE, la cual nos ha servido en el laboratorio como un modelo idóneo para estudiar la participación de chaperonas moleculares en la protección de proteínas al estrés calórico.

##### 1.4.1. Papel de AdhE en el metabolismo de *Escherichia coli*.

Durante el proceso de fermentación en *E. coli* se producen grandes cantidades de equivalentes reductores los cuales deben ser eliminados por la célula para preservar el equilibrio entre equivalentes reductores y equivalentes oxidantes, a lo anterior se le denomina balance redox. El balance redox se puede preservar a través de la reducción de piruvato a lactato (en condiciones ácidas), acetato a etanol (en condiciones alcalinas) o fumarato a succinato (en cualquier condición de pH; Clark y Cronan, 1980).

El etanol es un producto mayoritario en la fermentación de *E. coli*, su producción es catalizada por la enzima bifuncional etanol óxidoreductasa (AdhE) la cual lleva a cabo dos reacciones consecutivas de reducción dependientes de NADH, la primera es la transformación de acetil-CoA a acetaldehído e inmediatamente cataliza la reducción de acetaldehído a etanol:



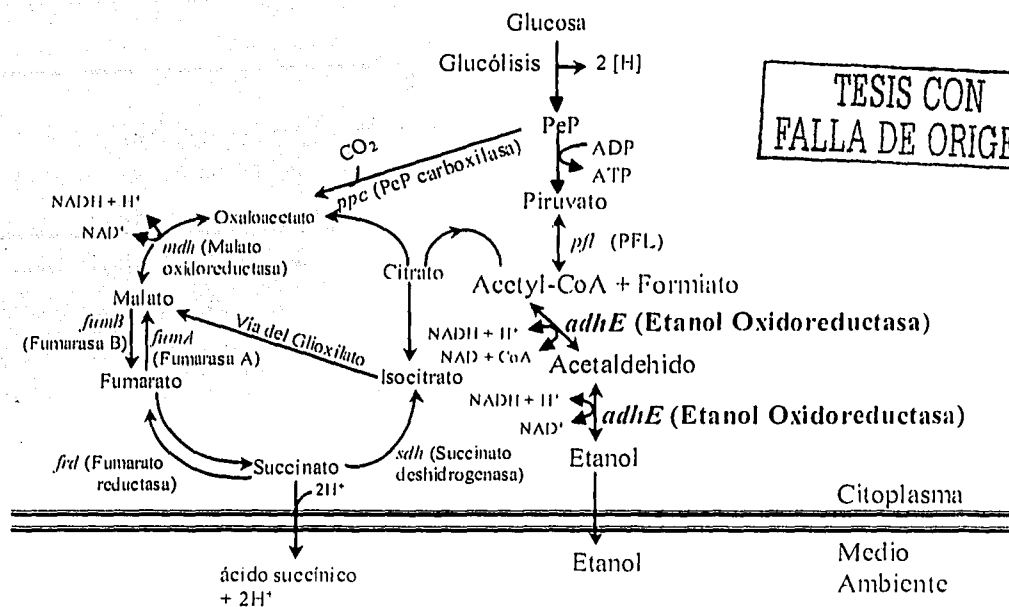


Figura 1.5. Esquema de las rutas fermentativas en *Escherichia coli*.

La proteína AdhE en *E. coli* se presenta *in vivo*, bajo condiciones aeróbicas, como estructuras helicoidales de aproximadamente 60 subunidades y de 120 nm de longitud a las cuales se les han llamado espirosomas (Kessler *et al.*, 1992). Durante la fermentación se ha calculado que pueden existir aproximadamente 500 espirosomas por bacteria. No se ha descrito algún papel fisiológico relacionado a dichas estructuras, de igual manera no se sabe que regiones de AdhE son necesarias para la polimerización ni qué factores regulan la formación de los espirosomas. Sin embargo se ha sugerido que la formación de los espirosomas está relacionada con la actividad de la enzima AdhE.

#### 1.4.2. Regulación de AdhE

La proteína AdhE está codificada por el gen *adhE* el cual se encuentra en el minuto 27.9 del cromosoma de *E. coli*. La regulación de este gen es muy compleja y de

hecho no se ha podido esclarecer hasta la fecha en su totalidad, sin embargo, se sabe que tiene regulación a nivel transcripcional, traduccional y postranscripcional.

#### 1.4.2.1. Regulación transcripcional

El gen *adhE* responde al cambio metabólico de la célula de condiciones aeróbicas a condiciones anaeróbicas y viceversa. En ausencia de oxígeno la transcripción de este gen aumenta aproximadamente 8 veces respecto a la transcripción observada en condiciones aeróbicas (Chen y Lin, 1991). Aunque en la región promotora de *adhE* se han podido ubicar secuencias de unión de varios reguladores transcripcionales como NarL (Chen y Lin, 1991), Fnr (Membrillo-Hernández y Lin, 1999), Cra (Mikulskis *et al.*, 1997) y Fis (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999), los cuales, a pesar que pueden modular la expresión de éste gen, no han sido descritos como los responsables de la regulación de la expresión de *adhE* en el cambio metabólico de aerobiosis a anaerobiosis.

#### 1.4.2.2. Regulación traduccional

La secuencia no traducida del extremo 5' del mRNA del gen *adhE* adopta una estructura secundaria compleja la cual impide el reconocimiento de los ribosomas a su sitio de unión en el mensajero (Fig. 1.6.). Para liberar el sitio de unión a ribosoma del mRNA de *adhE* se requiere la participación de la RNasa III (Aristarkhov *et al.*, 1996), la cual es una endorribonucleasa que corta RNA de doble cadena (Robertson *et al.*, 1968).

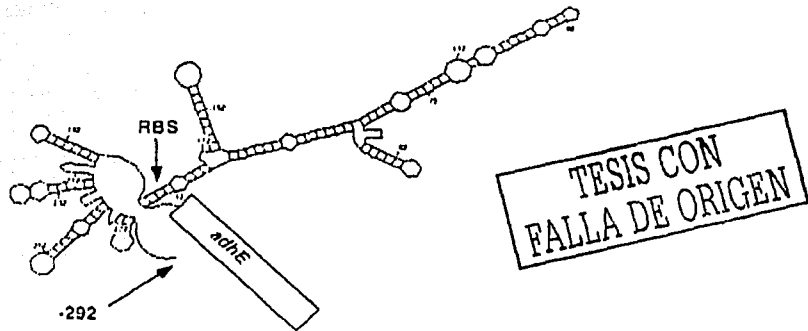


Figura 1.6. Estructura secundaria del extremo 5' no traducido del transcrito del gen *adhE* obtenida del programa 'Mfold' (Aristarkhov *et al.*, 1996; Membrillo-Hernández y Lin, 1999)

Por otro lado, la degradación del mRNA del gen *adhE* es específica a través de la RNasa G, ya que se ha observado que cuando el gen que codifica para RNasa G (*rng*) es interrumpido, el nivel del mRNA de *adhE* aumenta (Umitsuki *et al.*, 2001; Wachi *et al.*, 2001). Además de degradar el mRNA de *adhE*, la RNasa G se ha relacionado también con el procesamiento del transcrito del 16S rRNA (Li *et al.*, 1999) y del mRNA del gen *eno* (Kaga *et al.*, 2002).

#### 1.4.2.3. Regulación postraduccionál

La vida media de AdhE en condiciones aeróbicas es reducida de manera importante por el daño causado por la oxidación catalizada por un metal (MCO) la cual se lleva a cabo a través de la reacción de Fenton (Fig. 1.7.). En éste proceso se generan radicales libres hidroxilo a causa de la interacción entre el centro de hierro que posee AdhE con el peróxido de hidrógeno el cual es un producto inescapable de la respiración, los radicales libres producidos interaccionan covalentemente con los aminoácidos de la proteína en especial en el centro catalítico, ya que junto a este se encuentra el centro de hierro de la enzima (Cabiscol *et al.*, 1994; Tamarit *et al.*, 1998). Por ello la enzima AdhE sólo es activa en condiciones fermentativas.

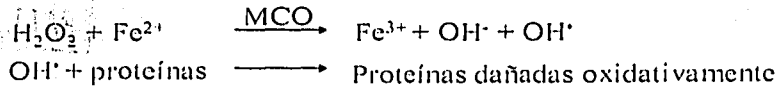


Figura 1.7. Oxidación catalizada por un metal (MCO) a través de la reacción de Fenton.

#### 1.4.3. Aislamiento de mutantes resistentes al MCO

En el cambio de la vida anaeróbica a la vida aeróbica, algunas proteínas tuvieron que sufrir cambios que les permitieron llevar a cabo sus funciones aún en presencia de oxígeno. Actualmente se ha demostrado que enzimas fermentativas pueden mantener su actividad en condiciones aeróbicas a través de mutaciones. A continuación se describirá brevemente dos ejemplos de enzimas anaeróbicas que sufren la inactivación por MCO y adquirieron la capacidad de mantener su actividad aún en condiciones aeróbicas.

##### 1.4.3.1. FucO

La enzima fermentativa L-1,2-Propanol:NAD,1-oxidoreductasa (FucO) cataliza la reducción de L-Lactaldehído a L-1,2-Propanodiol durante la fermentación:



En condiciones aeróbicas FucO es inactivada por MCO. El Dr. Zhe Lu y colaboradores pudieron aislar mutantes que pueden utilizar al L-1,2-Propanodiol como única fuente de carbono y energía en condiciones aeróbicas (Lu *et al.*, 1998), en dichas mutantes se observaron sustituciones de aminoácidos en la proteína las cuales le confirieron mayor resistencia a la inactivación por MCO.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.4.3.2. AdhE

Como ya se mencionó, la enzima AdhE cataliza dos reacciones consecutivas i) la reducción de Acetil-CoA a acetaldehído y ii) la reducción de acetaldehído a etanol, a pesar que ambas reacciones son reversibles *E. coli* no puede crecer utilizando al etanol como única fuente de energía y carbono debido a que, además de haber menor cantidad de la enzima en condiciones aeróbicas, su actividad es afectada por MCO. Sin embargo, al cultivar a *E. coli* en un medio donde se le obligue moderadamente a utilizar al etanol como fuente de carbono se pueden obtener mutantes capaces de crecer aeróbicamente utilizando al etanol como fuente de energía y carbono (Clark y Cronan, 1980; Membrillo-Hernández *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio se aislaron y caracterizaron mutantes capaces de crecer en etanol en condiciones aeróbicas, se observó que para este efecto, la proteína AdhE había adquirido una sustitución del aminoácido Ala267 por Thr (AdhE<sup>A267T</sup>) y a través de subcultivos de dichas mutantes se aisló una segunda mutante, la cual presentaba una mejora en el crecimiento al utilizar al etanol como única fuente de energía y carbono la cual había adquirido una segunda sustitución de aminoácidos: Glu568 por Lys (AdhE<sup>A267T/E568K</sup>). Sin embargo, a través de ensayos de inactivación por MCO de las enzimas purificadas AdhE<sup>A267T/E568K</sup> y AdhE<sup>A267T</sup> se observó que ninguna de ellas era más resistente a la MCO que la proteína silvestre (Membrillo-Hernández *et al.*, 2000).

Con base en lo anterior se planteó la siguiente pregunta: ¿cómo es posible que las enzimas AdhE<sup>A267T</sup> y AdhE<sup>A267T/E568K</sup> que son más susceptibles a la inactivación por la oxidación sean capaces de llevar a cabo su función en condiciones aeróbicas?

## 1.4.4. Antecedentes específicos del proyecto

El análisis de las proteínas AdhE<sup>A267T</sup> y AdhE<sup>A267T/E568K</sup>, realizado por el Dr. Jorge Membrillo Hernández, demostró que en extractos celulares crudos su resistencia a la inactivación por la MCO es mayor, así que, posiblemente exista un factor *in vivo* que de alguna manera estabiliza a AdhE<sup>A267T</sup> y a AdhE<sup>A267T/E568K</sup> para que pueda llevar a cabo

su función en aerobiosis. Además, logró identificar 16 zonas donde DnaK posiblemente interactuara con AdhE utilizando un algoritmo desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Bernd Bukau, el cual puede predecir posibles secuencias de reconocimiento para DnaK (Rüdiger *et al.*, 1997). Cabe señalar que las mutaciones que se observaron en AdhE de las cepas mutantes capaces de crecer en etanol como única fuente de energía y carbono en condiciones aeróbicas se encuentran en dichas zonas.

Por otro lado, durante el estrés calórico se ha reportado que AdhE interactúa con la chaperona molecular DnaK, lo cual es fundamental para evitar la formación de agregados de dicha enzima (Hesterkamp *et al.*, 1996). Así que posiblemente los cambios de los aminoácidos en la enzima AdhE<sup>A267T</sup> y AdhE<sup>A267T/E568K</sup> pudiesen, de alguna manera, desestabilizar a las proteínas moderadamente y propiciar su interacción con DnaK.

Con base en lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo fue que la chaperona molecular DnaK podría estar involucrada en la protección de la actividad aeróbica de la enzima AdhE.

### 1.5. Objetivo en esta Tesis

El objetivo de esta Tesis fue, en particular, probar la hipótesis de que las chaperonas moleculares pudieran estar involucradas en la protección de la actividad aeróbica de AdhE y en general estudiar el papel de las chaperonas moleculares en la defensa contra el estrés oxidativo en *Escherichia coli*.





## **CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 2.1. Cepas y oligonucleótidos

Las cepas y oligonucleótidos utilizados en éste trabajo están descritos en las Tablas 2.1. y 2.2.

**Tabla 2.1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en éste trabajo.**

Cepa	Genotipo Relevante	Referencia o Fuente
MC4100	<i>araD139</i> $\Phi$ ( <i>argF-lac</i> )169 <i>flh5301 furA25 relA rpsL150 rbsR22 deoC1</i>	Ceparío del Laboratorio
ECL4000	MC4100 $\Phi$ ( <i>adhE-lacZ</i> )	(Membrillo-Hernández <i>et al.</i> , 1999)
JE46	ECL4000 <i>adhE</i> <sup>A267T</sup>	(Membrillo-Hernández <i>et al.</i> , 2000)
JE52	ECL4000 <i>adhE</i> <sup>A267T/E568K</sup>	(Membrillo-Hernández <i>et al.</i> , 2000)
JMH0034	MC4100 <i>dnaKJ</i> -IPTG, <i>adhE</i> <sup>+</sup>	Ceparío del Laboratorio
JMH0035	MC4100 $\Delta$ <i>dnaK</i> , <i>adhE</i> <sup>+</sup>	Ceparío del Laboratorio
JMH800	ECL4000 $\Delta$ <i>dnaK</i> , <i>adhE</i> <sup>+</sup>	(Echave <i>et al.</i> , 2002)
JMH801	ECL4000 P <sub>IPTG</sub> <i>dnaKJ</i> , <i>adhE</i> <sup>+</sup>	(Echave <i>et al.</i> , 2002)
JMH802	JE52 $\Delta$ <i>dnaK</i> , <i>adhE</i> <sup>A267T/E568K</sup>	(Echave <i>et al.</i> , 2002)
JMH803	JE52 P <sub>IPTG</sub> <i>dnaKJ</i> , <i>adhE</i> <sup>A267T/E568K</sup>	(Echave <i>et al.</i> , 2002)
JMH805	JE46 P <sub>IPTG</sub> <i>dnaKJ</i> , <i>adhE</i> <sup>A267T</sup>	(Echave <i>et al.</i> , 2002)
JGT3	MC4100 $\Delta$ <i>clpB::kan</i>	(Thomas y Baneyx, 1998)
JGT11	MC4100 <i>zba315::kan</i> $\Delta$ <i>htpG::lacZ</i>	(Thomas y Baneyx, 1998)
JGT17	MC4100 $\Delta$ <i>ibpAB::kan</i>	(Thomas y Baneyx, 1998)
WM51	MC4100 $\Delta$ <i>hslO::kan</i>	Dra. Ursula Jakob

**Tabla 2.2. Oligonucleótidos utilizados en éste trabajo.**

Oligonucleótido	Secuencia
ADH 3'	5' GTT GGA TCC AGC GAC ATT AGT AAC AGC C 3'
ADH 5'	5' ATG AAT CCC CAC AAA GAA ACC AAA CAG 3'
ADH A3'	5' AGA AGC ACA GAT TAC GCC 3'
ADH A5'	5' AAT CAT CAC CGC ACT GAC 3'
ADH B3'	5' GCC ATC AGT AAT CAC CAC TTC ATC C 3'
ADH B5'	5' TAA AGC CGC ATA CAG CTC C 3'
ADH C3'	5' AGA CCA CCG AAA GCA CAC AG 3'
ADH C5'	5' TTC AAA CTC GCA CCT TCC C 3'
ADH D3'	5' GAA GGG GCC GTT TAT GTT G 3'
ADH D5'	5' TGG TTA TGG ACA YGC CGA AG 3'

## 2.2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.2.1. Medios de Cultivo

Como medio rico se utilizó LB, en caso de medios sólidos únicamente se le adicionó 1.5% de agar (w/v).

Medio LB:

- Extracto de levadura 0.5%
- NaCl 1%
- Triptona 1%

Medio mínimo:

- $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1%
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6%
- NaCl 0.05%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El MM utilizado fue suplementado con glucosa 0.2% o etanol 2%.

Los medios fueron esterilizados por calor húmedo a 21 psi y 121°C por 20 min.

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45  $\mu\text{m}$  y adicionados al medio bajo condiciones de esterilidad a una temperatura del medio de cultivo menor a 50°C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200  $\mu\text{g/ml}$ , cloramfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina 100  $\mu\text{g/ml}$  y tetraciclina 25  $\mu\text{g/ml}$ . Cuando fue necesario, se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM.

### 2.2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 200 rpm con temperatura controlada a 30°C. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en tubos de ensayo con tapa de rosca llenados al máximo volumen e incubados sin agitación. Los cultivos aeróbicos en medio sólido se crecieron en cajas de Petri en una incubadora a 30°C.

## 2.3. Métodos genéticos

### 2.3.1. Transducción

La transducción es un proceso por el cual se transfiere material genético de una cepa a otra utilizando como vehículo de entrega a bacteriófagos. En este trabajo se utilizó el bacteriófago  $P_{1vr}$  que es una variedad del fago  $P_1$  que no puede formar lisógenos.

#### 2.3.1.1. Preparación de lisados

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa donadora a 37°C con 200 rpm en medio LB suplementado con  $\text{CaCl}_2$  5 mM más el antibiótico correspondiente.
- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
- 4) Mezclar 200  $\mu\text{l}$  de células con 200  $\mu\text{l}$  de bacteriófago  $P_{1vr}$ , usar como control células sin fago.
- 5) Incubar a 37°C sin agitación por 20 min.
- 6) Agregar 2-3 ml de LB suplementado con  $\text{CaCl}_2$  5 mM y agitar con vortex.
- 7) Incubar a 37°C 200 rpm por 2 h hasta observar que el cultivo con fagos se clarifica mientras que el cultivo control llega a saturación.

- 8) Remover los restos celulares por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 9) Repetir el paso 8.
- 10) Adicionar al sobrenadante 2 gotas de cloroformo y agitar con vortex. Almacenar los lisados a 4°C.

#### 2.3.1.2. Transducción al genoma bacteriano

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa receptora a 37°C con 200 rpm en medio LB suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM más el antibiótico correspondiente.
- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial con MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- 4) Diluir los lisados obtenidos con el protocolo 2.3.1.1. a diferentes diluciones de 10<sup>0</sup> a 10<sup>-4</sup>, en MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- 5) Mezclar 100 µl de células con 100 µl del lisado a diferentes diluciones.
- 6) Utilizar como controles muestras de sólo células y sólo fagos, para observar que las células receptoras no sean resistentes a antibiótico y que los lisados no contengan células.
- 7) Incubar a 37°C por 20 min.
- 8) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 9) Resuspender en LB, repetir paso 8.
- 10) Repetir el paso 9.
- 11) Agregar 1 ml de LB e incubar a 37°C con 200 rpm por 1-2 h.
- 12) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 13) Resuspender el pellet en 80 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- 14) Platear en medio selectivo.

#### 2.3.2. Mutagénesis por inserción de un elemento transponible

Uno de los métodos más utilizados en genética molecular en la obtención de mutantes es la mutagénesis mediante el uso de elementos transponibles que se

insertan al azar en el cromosoma, ocasionando generalmente, la pérdida total de la función del gen en el cual se insertaron. En este trabajo se utilizaron los transposones mini-Tn5 ( $\lambda$ NK1105) y mini-Tn10 ( $\lambda$ NK1098) que confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente. El método que se siguió se basa en el protocolo descrito por Kleckner (Kleckner *et al.*, 1991).

#### 2.3.2.1. Preparación del lisado con fago $\lambda$

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa C<sub>600</sub> (ésta contiene una mutación en el supresor *supE* que permite insertar glutamina en los codones de término tipo ámbar) a 37°C con 200 rpm en medio LB.
- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 3) Mezclar 50  $\mu$ l de células con 50  $\mu$ l del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.
- 5) Agregar 2 ml de LB MgSO<sub>4</sub> 10 mM precalentado a 37°C.
- 6) Incubar de 2 h a 37°C con 200 rpm.
- 7) Una vez que el cultivo se lisó, agregar 2 gotas de cloroformo.
- 8) Colectar los restos celulares por centrifugación.
- 9) Remover el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo, agregar 2 gotas de cloroformo.
- 10) Almacenar el lisado a 4°C.

#### 2.3.2.2. Inserción de transposones mini-Tn5 y mini-Tn10

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa W3110 a 37°C con 200 rpm en medio LB.
- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 3) Mezclar 100  $\mu$ l de células con 100  $\mu$ l del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.

- 5) Agregar 1-2 ml de LB  $MgSO_4$  10 mM.
- 6) Incubar a 37°C sin agitación por 1 h.
- 7) Platear diluciones seriales en medio selectivo.
- 8) Incubar a 37°C.

## 2.4. Métodos bioquímicos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.4.1. Curvas de crecimiento

El crecimiento fue determinado midiendo la DO a 600 nm cada tiempo indicado utilizando el espectrofotómetro Ultraspec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech™), para ello, se utilizaron cubetas de plástico desechables de 1 ml, diluyendo 10 ó 100 veces la concentración del cultivo. En las cinéticas de recuperación al  $H_2O_2$ , se agregó  $H_2O_2$  a una concentración final de 4 mM cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de 0.2.

### 2.4.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas en las muestras se determinó utilizando el método micro DC de Bio-Rad a una DO de 620 nm. Se utilizó como punto de comparación a la albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones.

### 2.4.3. Viabilidad

- 1) A un cultivo de 20 ml crecido a una  $DO_{600}$  de 0.2 se le agregó  $H_2O_2$  a una concentración final de 8mM de por una hora.
- 2) Centrifugar el cultivo a 5,000 rpm por 10 min.
- 3) Resuspender la pellet en buffer PBS a una  $DO_{600}$  de 8.

Solución PBS:

NaCl 0.8% (w/v)

KCl 0.02% (w/v)

$Na_2HPO_4$  0.144% (w/v)



$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.024% (w/v)

- 4) Hacer diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ .
- 5) Inocular placas de LB con alícuotas de 2  $\mu\text{l}$  de cada dilución e incubar a 30°C.

El control del experimento no fue tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una vez que alcanzó el DO necesaria se centrifugó inmediatamente.

#### 2.4.4. Actividad enzimática de AdhE

- 1) Centrifugar a 5,000 rpm por 10 min a un cultivo de 50 ml crecido a una  $\text{DO}_{600}$  de 0.2.
- 2) Resuspender el pellet en buffer PBS.
- 3) Repetir los pasos 1 y 2.
- 4) Repetir el paso 1 y resuspender el pellet en 150  $\mu\text{l}$  de Tris/HCl 50mM, NaCl 160mM, pH 8.5.
- 5) Sonicar en frío a 14 micras por 18 s.
- 6) Centrifugar a 10,000 rpm por 15 min y recolectar el sobrenadante.
- 7) Llevar a cabo la medición de la actividad de AdhE en una cubeta desechable de 1 ml añadiendo 0.3 M de buffer de carbonatos ( $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KHCO}_3$ ; pH 10), 1.5 M de etanol, 2 mM de  $\text{NAD}^+$  y 10  $\mu\text{l}$  del sonicado.
- 8) Medir a 340 nm y tomar lectura cada 10 s por 1 min.

#### 2.4.5. Derivatización

La acción de las especies derivadas del oxígeno sobre las macromoléculas celulares da lugar a la aparición de diversos productos. La oxidación de aminoácidos comprende, entre toda una larga lista de alteraciones, la formación de grupos carbonilo. La presencia de estos grupos unidos a las proteínas puede utilizarse como medida del grado de oxidación de la célula (Levine *et al.*, 1994).

Los grupos carbonilos presentes en las proteínas reaccionan fácilmente con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Las técnicas que actualmente se emplean para la detección de grupos carbonilo se basan en esta reacción. El máximo de absorbancia de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) está a  $\lambda = 365$  nm. Como el máximo de absorción de las proteínas se sitúa a 280 nm este compuesto se detecta espectrofotométricamente con facilidad.

Alternativamente la presencia de grupos dinitrofenilo (DNP) puede detectarse mediante anticuerpos anti-DNP.

Tanto si la detección se lleva a cabo espectrofotométricamente o con anticuerpos, la derivatización de los grupos carbonilo presentes en las muestras se realiza siguiendo esencialmente el mismo protocolo:

- 1) Añadir a las muestras (que típicamente contienen 50-200  $\mu\text{g}$  de proteína) un volumen de SDS de modo que su concentración final sea del 6% (w/v).
- 2) Añadir un volumen igual de una solución de DNPH 10 mM en ácido trifluoroacético al 10% (v/v) y mezclar bien.
- 3) Incubar a 25°C durante 10 min. Es crítico controlar el tiempo de incubación y la temperatura.
- 4) Añadir 0.75 volúmenes de una solución de Tris 2 M para neutralizar la reacción. Cuando la reacción está neutralizada vira de color amarillo a naranja.

### 2.4.6. Cuantificación cromatográfica de los carbonilos totales

En esta técnica la cuantificación de los carbonilos presentes en las muestras se lleva a cabo cromatográficamente. Las muestras ya derivatizadas se inyectan en un sistema cromatográfico de gel filtración (FPLC), que gracias a las diferencias de peso molecular separa las proteínas del reactivo libre.

La separación se realizaba a media presión en un sistema Waters 600 utilizando como eluente un tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  200 mM pH 6.5, SDS 1 % (w/v). Se utilizó una columna Zorbax GF250 que se termoestabilizaba a 30°C. El flujo de elución fue 0.8 ml/min.

La detección de las proteínas unidas a DNP se llevaba a cabo midiendo la absorbancia a 276 y 365 nm simultáneamente, mediante un detector equipado con un sistema de fotodiodos (Waters PDA 996).

Alternativamente se puede eliminar el exceso de reactivo y disminuir el tiempo de elución precipitando las muestras con acetona a -20°C en proporción 1:9 e incubando durante al menos 15 min a -20°C, aunque no es conveniente utilizar este método si en nuestra preparación hay menos de 100  $\mu\text{g}$  de proteína. Posteriormente se resuspende el precipitado en buffer de elución.

Los carbonilos totales se refieren a la cantidad de proteína (nmol carbonilo/mg proteína total).

#### 2.4.6.1. Geles de poliacrilamida

Las electroforesis se llevaron a cabo empleando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Se escogió el sistema de buffers discontinuo desnaturante, descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). En este sistema la presencia de SDS dota a las proteínas de carga negativa y la cantidad de carga es proporcional al tamaño del polipéptido. Por tanto esta técnica permite separar las proteínas según su peso molecular.

La composición del stock de acrilamida estaba compuesta por una mezcla de acrilamida y bisacrilamida en una proporción 30:0.8 (Bio-Rad).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gel concentrador:

- Tris-HCl (pH 6.8) 125 mM
- Stock acrilamida 5% (v/v)
- SDS 0.1% (w/v)
- PSA 0.05% (w/v)
- TEMFD 0.025% (v/v)

Gel separador:

- Tris-HCl (pH 8.8) 375 mM
- Stock acrilamida 9% (v/v)
- SDS 0.1% (w/v)
- PSA 0.05% (w/v)
- TEMED 0.025% (v/v)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las células se resuspendieron en el volumen deseado de solución amortiguadora y se añadió medio volumen de solución de solubilización (3x). Se incubaron 3 min a 100°C y se dejaron a temperatura ambiente. Finalmente se añadió medio volumen de solución de carga (4x).

Solución de carga:

- Azul de bromofenol 0.0125% (w/v)
- Sacarosa 5% (w/v)

Solución de solubilización (3x):

- Tris-HCl (pH 6;8) 0.5 M
- $\beta$ -mercaptoetanol 15% (v/v)
- EDTA 10 mM

- SDS 5% (w/v)

La electroforesis se desarrollaba a intensidad constante (15 mA) hasta que el frente llegaba al final del gel.

Solución amortiguadora de electroforesis:

- Tris-HCl (pH 8.8) 25mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0.1% (w/v)

Las proteínas en el gel de poliacrilamida o en la membrana PVDF fueron teñidas con azul de Coomassie.

Tinción de Coomassie:

- Ácido acético 10% (v/v)
- Azul brillante de Coomassie 0.01% (w/v)
- Metanol 50% (v/v)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 2.4.7. Western-blot

Las membranas de PVDF (Inmobilon P, Millipore) se incubaban en metanol durante 5 min y se equilibraban durante 15 min en el buffer de transferencia con agitación suave antes de la transferencia. El gel que se iba a transferir fue incubado durante 1 min en 20 ml de esta solución amortiguadora.

La transferencia se llevaba a cabo utilizando un sistema 'semidry' (Hoeffer Semiphor), y una fuente Pharmacia EPS200, a una intensidad de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana, durante 1 hora.

Solución amortiguadora de transferencia:

- Glicina 39 mM
- Metanol 10% (v/v)
- SDS 0.0375% (w/v)
- Tris 48 mM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 2.4.8. Inmunodetección de proteínas

Para inmunodetectar las proteínas ya transferidas a la membrana de PVDF se utilizó el siguiente protocolo:

- 1) Incubar la membrana con I-block (Tropix) 0.2% (w/v) , Tween 20 (SIGMA) 0.1% (v/v) durante al menos 1 hora a 25°C con agitación suave. Alternativamente se puede incubar la membrana de PVDF toda la noche a 4°C con agitación suave.
- 2) Incubar con el anticuerpo primario que se requiera durante 1 hora a 25°C en 5 ml de solución de bloqueo, agitando en un Roller Mixer Srt 1.
- 3) Lavar tres veces la membrana con 10 ml de solución de bloqueo por 5 min.
- 4) Incubar durante 1 hora a 25°C con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (Tropix), en 5 ml de solución de bloqueo.
- 5) Lavar tres veces la membrana con 10 ml de solución de bloqueo por 5 min.
- 6) Lavar tres veces con 10 ml de un buffer de ensayo (dietilenamina/HCl 0.1 M pH 10 + MgCl 21 mM).

Extender la membrana de PVDF sobre una superficie plana e incubar con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Tropix) 0.24 mM. Añadir Nitro-block (Tropix) 0.5 mg/ml disuelto en buffer de ensayo para aumentar la eficiencia de la reacción.

La quimioluminiscencia se detecta exponiendo directamente la membrana sobre un film fotografico (Fuji Super HR-N) o mediante el sistema Lumi-Imager de Boehringer.

Al mismo tiempo se procesa otro gel con las mismas muestras y después de transferir las proteínas a una membrana de PVDF se tiñe dicha membrana directamente con azul de Coomassie para calcular, con la ayuda de marcadores de peso molecular, el tamaño de las señales obtenidas en el film.

#### 2.4.8.1. Inmunodetección de proteínas oxidadas

Cuando se detectaban las proteínas oxidadas (véase apartado 2.4.5 de Materiales y Métodos) la solución neutralizadora contenía: Tris 2M, glicerol 30% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 15% (v/v). Esto permitía analizar las muestras mediante geles de poliacrilamida, sin necesidad de añadir buffer de solubilización o buffer de carga.

La inmunodetección se llevaba a cabo siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito en el apartado 2.4.8. En este caso, el anticuerpo primario es anti-DNP (Dako), obtenido de suero de conejo, y fue empleado a una dilución 1/20000. El anticuerpo secundario, conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), fue empleado a una dilución 1/25000.

#### 2.4.9. Coinmunoprecipitación

El protocolo de coinmunoprecipitación que se empleó fue el siguiente:

- 1) Recoger un cultivo de *E. coli* en fase exponencial ( $OD_{600}$  0.2-0.3) de 50 ml y centrifugar a 5,000 rpm durante 6 min a 4°C.
- 2) Resuspender las células en 500 ml de buffer de lisis

Buffer de lisis:

- HEPES-KOH (pH 7.9) 10 mM
- Ditioneitol 1 mM
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM
- NaCl 125 mM
- Nonidet P-40 0.2% (v/v)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- N-tosil-L-fenilalaninaclorometilcetona 0.1 mM
  - Pepstatina A 1  $\mu$ M
- 3) Sonicar las células a 10  $\mu$ m durante 30 s en hielo y centrifugar a 12000xg 20 min a 4°C.
  - 4) Calcular la concentración de proteína del sobrenadante y diluirlo con buffer de lisis hasta que tengamos una concentración final de 2  $\mu$ g/ $\mu$ l.
  - 5) Transferir una alícuota de 250  $\mu$ l a otro eppendorf.
  - 6) Añadir 1  $\mu$ g del anticuerpo, mezclar y dejar incubando en hielo sin agitación durante 1 h.
  - 7) Pesar 80 mg de proteína A-Sepharosa (Pharmacia) aparte y lavarla con agua destilada 3 veces. Después resuspenderla en 80 J-1 de tampón de lisis en frío durante al menos 10 min antes de su utilización.
  - 8) Añadir 40  $\mu$ l de la suspensión de proteína A-Sepharosa al extracto.
  - 9) Incubar durante 90 min a 4°C en un rotor orbital para evitar que sedimente la resina.
  - 10) Centrifugar 8 s a 5000 rpm a TA y descartar el sobrenadante.
  - 11) Lavar el pellet 4-5 veces con 500  $\mu$ l de HEPES-KOH 10 mM pH 7.9, NaCl 125 mM. Descartar el sobrenadante en cada lavado.
  - 12) Tomar el pellet y añadir 12  $\mu$ l de tampón de solubilización diluido 2.5 veces con agua destilada, incubar 3' a 100°C y añadir 4  $\mu$ l de buffer de carga.
  - 13) Centrifugar 3 min a 10000 rpm y tomar el sobrenadante, que está listo para ser analizado por geles de poliacrilamida.



## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS**



### 3.1. DnaK en la protección de la enzima AdhE contra el estrés oxidativo.

La hipótesis que se planteó para este trabajo era que la chaperona molecular DnaK estaba implicada en mantener la actividad aeróbica de la enzima AdhE. Si la hipótesis era correcta entonces al disminuir la cantidad de DnaK en las cepas JE46 y JE52 (etanol<sup>++</sup>) estas no podrían utilizar al etanol como única fuente de energía y carbono en condiciones aeróbicas.

Para ello se estudió la capacidad de crecimiento en etanol de las cepas JE46 y JE52, a las cuales se les substituyó el gen *dnaK* por la construcción  $P_{IPTG}dnaK$ , en comparación a su cepa isogénica ECL4000 (Fig. 3.1.). Las cepas con la construcción  $P_{IPTG}dnaK$  fueron construidas por el Dr. Jorge Membrillo Hernández.

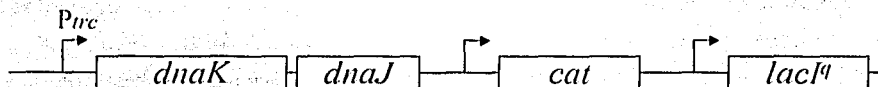
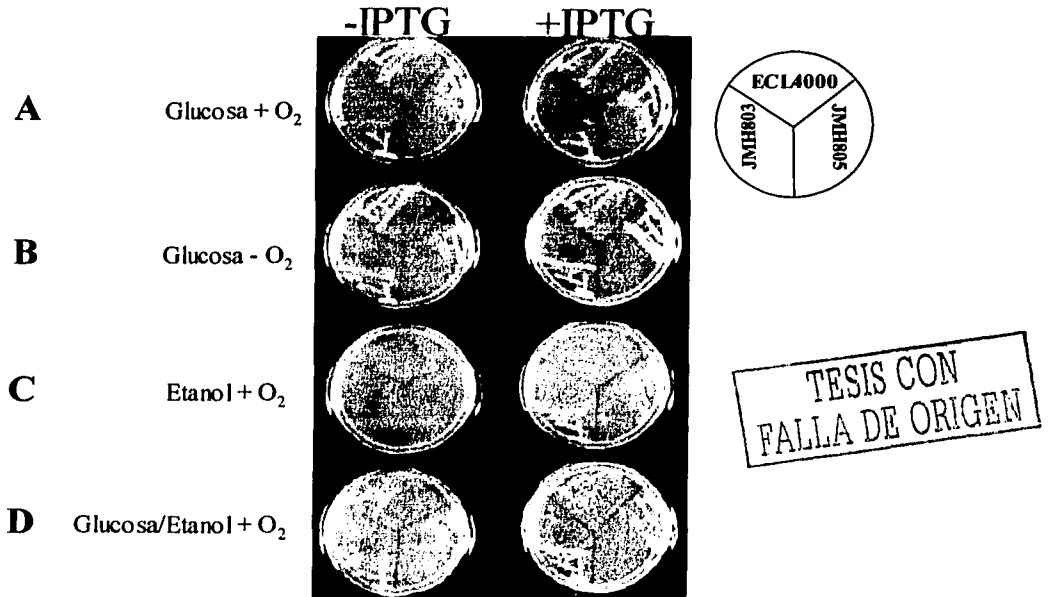


Figura 3.1. Construcción  $P_{IPTG}dnaK$ . El operón formado por *dnaK* y *dnaJ* tienen el promotor  $P_{trc}$  el cual es reprimido por el super-represor  $LacI^q$ . Para facilitar la manipulación genética de la construcción fue añadido un cassette de resistencia a cloramfenicol (*cat*).

#### 3.1.1. Requerimiento de DnaK durante el crecimiento en etanol de la cepa JE46 y JE52

Las cepas JMH803, JMH805 y ECL4000 fueron crecidas en etanol y glucosa-etanol como fuente de carbono en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, en presencia o ausencia de IPTG (Fig. 3.2.).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3.2. Crecimiento de la cepa ECL4000 y cepas mutantes diferentes condiciones y fuentes de carbono.** Cultivos de la cepa ECL4000 (silvestre), JMH803 ( $P_{IPTG}dnaK$ ,  $adhE^{A267T/E568K}$ ) y JMH805 ( $P_{IPTG}dnaK$ ,  $adhE^{A267T}$ ) en MM más glucosa en condiciones aeróbicas (A) o anaeróbicas (B), etanol aeróbicamente (C) o glucosa/etanol (D) como fuentes de carbono, en ausencia o presencia de IPTG 1 mM.

Se observó que el crecimiento en presencia de glucosa tanto de las cepas mutantes JMH803 y JMH805 como de la cepa ECL4000 no es dependiente de DnaK ni de la condición en la que fue crecido el cultivo. Sin embargo, al utilizar el etanol como fuente de carbono, únicamente las cepas JMH803 y JMH805 pudieron crecer en presencia de IPTG.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas JMH803 y JMH805 requieren indispensablemente la presencia de la chaperona molecular DnaK para utilizar al etanol como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, con este resultado no podemos afirmar que exista una interacción entre DnaK y AdhE.

### 3.1.2. Actividad enzimática de AdhE.

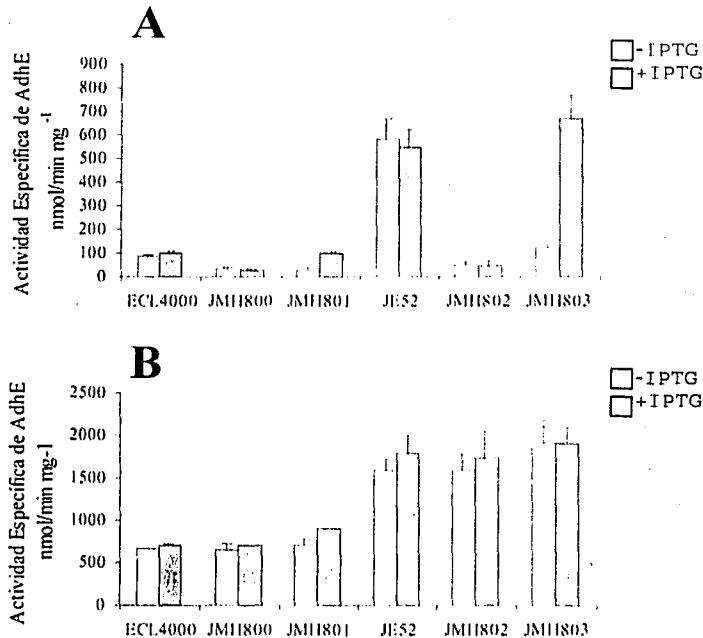
La necesidad de DnaK en las cepas JE52 y JE46 para crecer en etanol como única fuente de energía y carbono no necesariamente implica una relación entre la chaperona y AdhE, en el caso que así fuese, entonces al disminuir los niveles de DnaK en las cepas JE52 y JE46 se afectaría la actividad enzimática de AdhE.

Con base en lo anterior, se analizó la actividad de AdhE en extractos celulares provenientes de células con diferentes fondos genéticos en los cuales se hicieron combinaciones de los alelos *dnaK* y *adhE*. Las células fueron crecidas en MM suplementado con glucosa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas con y sin la inducción de DnaK en las cepas que presentaban la construcción  $P_{IPTG}dnaK$  (Fig. 3.3.).

Se observó claramente que hay mayor actividad en general de la enzima AdhE en condiciones anaeróbicas que en condiciones aeróbicas. Por otro lado, en aerobiosis únicamente las cepas que contienen el alelo  $adhE^{A267T/E568K}$  fueron capaces de mantener la actividad enzimática de AdhE con excepción de la cepa JMH802 (Fig. 3.3. A). Además, se determinó que dicha actividad, en aerobiosis, es dependiente de la presencia de DnaK ya que en la cepa JMH802 no se observó actividad aeróbica de AdhE y en la JMH803 ( $P_{IPTG}dnaK adhE^{A267T/E568K}$ ) solamente se detectó la actividad de la enzima cuando estaba presente el IPTG en el medio de cultivo.

En condiciones anaeróbicas la presencia o ausencia de DnaK no es determinante para mantener los altos niveles de actividad de AdhE (Fig. 3.3. B). Cabe señalar que las cepas que tienen el alelo  $adhE^{A267T/E568K}$  presentan mayor actividad enzimática que aquellas cepas que contienen el alelo silvestre.

Estos resultados sugieren fuertemente que la actividad aeróbica de la enzima mutante  $AdhE^{A267T/E568K}$  está vinculada a la presencia de la chaperona molecular DnaK.



**Figura 3.3. Actividad enzimática de AdhE en diferentes fondos genéticos.** Cuantificación de la actividad de AdhE en las cepas ECL4000 (silvestre), JMH800 ( $\Delta dnaK$ ), JMH801 ( $P_{IPTG} dnaK$ ), JE52 ( $adhE^{A267T/E568K}$ ), JMH802 ( $\Delta dnaK adhE^{A267T/E568K}$ ) y JMH803 ( $P_{IPTG} dnaK adhE^{A267T/E568K}$ ) en condiciones aeróbicas (A) o anaeróbicas (B), con glucosa como fuente de carbono en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras oscuras) de IPTG 1 mM.

### 3.1.3. Ensayos de coimmunoprecipitación: Interacción física entre las proteínas DnaK y AdhE

Los datos hasta ahora obtenidos apuntan a que la chaperona molecular DnaK tiene una función protectora necesaria para que la enzima  $AdhE^{A267T/E568K}$  pueda mantener su actividad en condiciones aeróbicas por lo que muy probablemente una porción considerable de esta enzima se encuentre en complejo con DnaK.

A través de ensayos de coimmunoprecipitación, los cuales fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Joaquim Ros de la Universidad de Lleida, se analizó el nivel de interacción entre AdhE y DnaK. Estos ensayos consistieron básicamente en precipitar del extracto celular a AdhE utilizando el anticuerpo anti-AdhE. De la precipitación obtenida se realizó un Western-blot para identificar a la chaperona DnaK utilizando al anticuerpo anti-DnaK, de esta manera la intensidad de la banda que se observe en el Western-blot estará en función de la interacción entre DnaK y AdhE (Fig. 3.4.).

Claramente pudimos observar que la interacción entre DnaK y AdhE es mayor en presencia de oxígeno, lo cual sugiere que el reconocimiento de DnaK por AdhE aumenta al ser dañada por MCO.

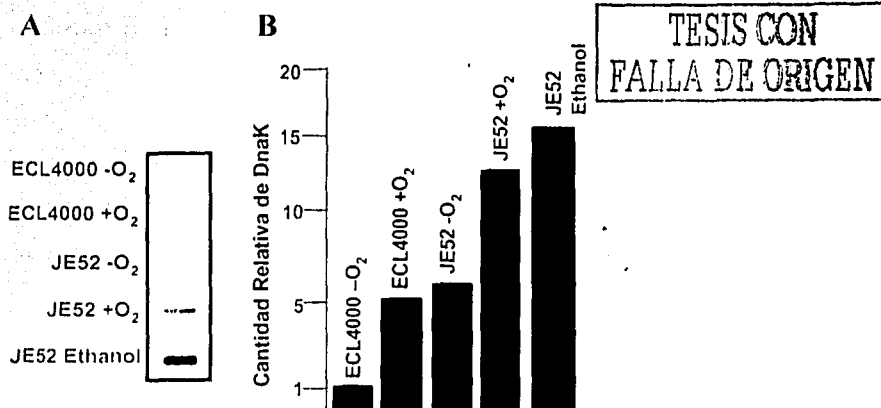


Figura 3.4. Coimmunoprecipitación de DnaK en extractos celulares. Western-blot revelado con anti-DnaK de inmunoprecipitaciones de AdhE en diferentes cepas crecidas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (A). Análisis densitométrico del Western-blot (B) a través de unidades arbitrarias (1 unidad arbitraria = intensidad de la banda ECL400 -O<sub>2</sub>)

Así mismo, se observó que en la cepa JE52 (*adhE*<sup>A267T/E568K</sup>) la interacción entre AdhE y DnaK es mayor que en la cepa ECL4000. Con esto concluimos que las substituciones de aminoácidos que se observaron en la enzima AdhE de la cepa JE52 (A267→T y E568→K) aumentaron el reconocimiento por DnaK. Además, se observa un

incremento en la interacción cuando la cepa JE52 crece en etanol como única fuente de carbono.

Con los datos obtenidos se demostró que existe una interacción física entre AdhE y DnaK, además, que dicha interacción es indispensable para que AdhE pueda tener actividad en condiciones aeróbicas, en otras palabras la chaperona molecular DnaK protege de la inactivación por oxidación a la enzima AdhE.

#### 3.1.4. Cuantificación de grupos carbonilos en el extracto proteico en ausencia de DnaK

A la chaperona DnaK se le ha descrito un papel muy importante en la respuesta al estrés calórico y en el funcionamiento normal de las células (véase el apartado 1.3), además, se ha demostrado que DnaK interacciona físicamente con un gran número de proteínas (Deuerling *et al.*, 2003), por lo que es difícil pensar que DnaK únicamente proteja de la oxidación a la enzima AdhE.

Para saber que tan general es la participación de DnaK en la protección al estrés oxidativo se realizó la cuantificación de la acumulación de grupos carbonilos, que es una modificación irreversible que sufren las proteínas por la oxidación, en presencia o ausencia de esta chaperona (Fig. 3.5.).

Al tratar las células con  $H_2O_2$  acumulan una gran cantidad de daño ocasionado por radicales libres de oxígeno. El radical  $HO^\bullet$  puede modificar irreversiblemente a algunos aminoácidos de las proteínas formando grupos carbonilo, los cuales pueden reaccionar con la 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando enlaces covalentes. De esta manera podemos tener proteínas marcadas con dinitrofenilhidrazona (DNP) que puede ser reconocida fácilmente por un anticuerpo comercial (anti-dinitrofenil) y mediante la técnica de Western-blot podemos detectar a las proteínas mayoritariamente oxidadas, basándonos en la intensidad de la banda obtenida, es decir, a mayor intensidad de la banda, mayor grado de oxidación (Levine *et al.*, 1994).



La cuantificación de grupos carbonilo se determinó en la cepa JMH0034 la cual tiene al gen *dnaK* bajo el control de un promotor inducible por IPTG. En la Figura 3.5. se observa que las células después de 30 min de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor la carbonilación de las proteínas (es decir, mayor oxidación) cuando DnaK está en menor cantidad (sin IPTG), este fenómeno es más notable después de 60 min del tratamiento.

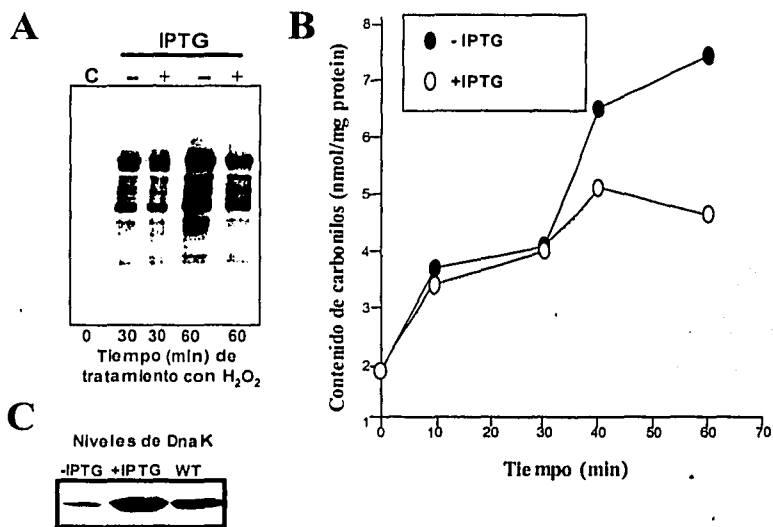


Figura 3.5. Formación de grupos carbonilo en células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Identificación de grupos carbonilos por Western-blot en la cepa JMH0034 (*P*<sub>IPTG</sub> *dnaK*) a los 30 y 60 minutos de tratamiento con 4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia (+) o ausencia (-) de IPTG (A). Cuantificación de grupos carbonilo en la cepa JMH0034 por HPLC en presencia o ausencia de IPTG (B). Western-blot del extracto celular de la cepa JMH0034 en presencia o ausencia de IPTG 1 mM y de la cepa MC4100 (silvestre) revelado con el anticuerpo anti-DnaK (C).

Claramente se pudo observar que la función protectora de DnaK durante el estrés oxidativo no se restringe únicamente a AdhE por lo que muy probablemente esta chaperona, al igual que durante el estrés térmico, tenga una participación fundamental en la respuesta al estrés oxidativo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2. Estudios sobre la participación de diferentes chaperonas moleculares en la protección contra el estrés oxidativo

Gracias a la gran cantidad de trabajos realizados en *E. coli* y en otros organismos, incluyendo eucariontes y archeas, se ha podido describir, en gran medida, la importancia que tienen diferentes chaperonas moleculares en la protección al estrés térmico. Sin embargo, se sabe muy poco sobre el papel que tienen las chaperonas moleculares en la protección al estrés oxidativo.

Hasta ahora se ha demostrado que la chaperona molecular DnaK juega un papel muy importante en la protección al estrés oxidativo. Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la relevancia de diferentes chaperonas moleculares durante éste mismo estrés.

Como una aproximación general estudiamos la formación de grupos carbonilo en las proteínas de las cepas MC4100, JGT3 ( $\Delta clpB$ ), JGT11 ( $\Delta htpG$ ), JGT17 ( $\Delta ibpAB$ ) y WM51 ( $\Delta hslO$ ) después de un tratamiento con  $H_2O_2$  (Fig. 3.6.).

Se observó que las mutantes deficientes en las chaperonas ClpB, HtpG y Hsp33, la cual es codificada por el gen *hslO*, acumulan una mayor cantidad de grupos carbonilos que la cepa silvestre MC4100 al ser tratadas con  $H_2O_2$ , lo que sugiere que dichas chaperonas pueden tener un papel protector contra la oxidación. Así mismo, si en el patrón de bandas del Western-blot de grupos carbonilos pudiéramos encontrar bandas específicas estaríamos identificando blancos específicos de las chaperonas mutadas. Sin embargo, no observamos diferencias obvias en el Western-blot, lo cual podría significar que la participación de las chaperonas estudiadas sea muy general. Aún así, no podemos descartar la posibilidad de que hubiese especificidad en las chaperonas por su sustrato, posiblemente la metodología empleada no es suficientemente sensible para observar las diferencias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

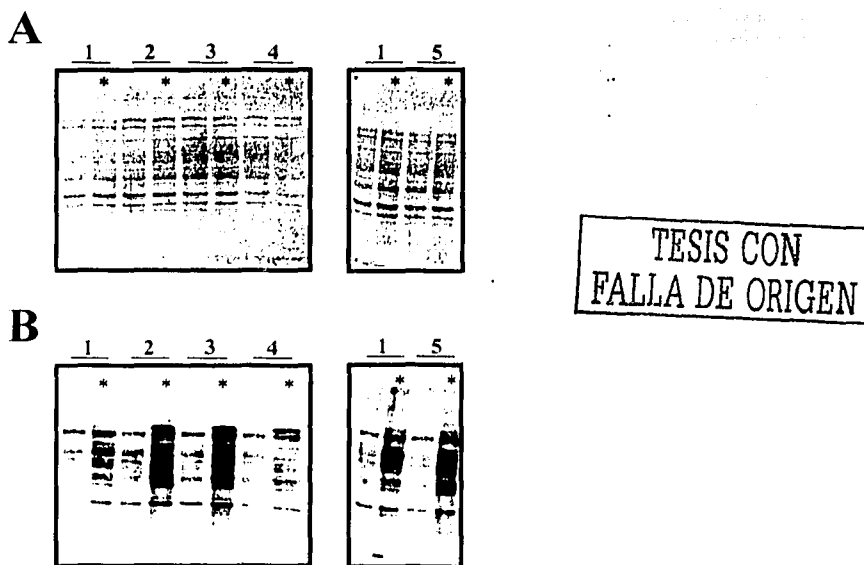


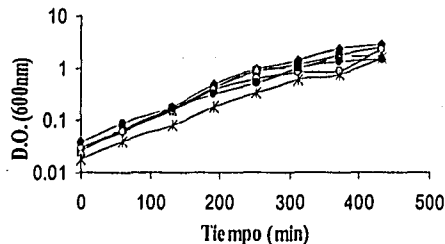
Figura 3.6. Formación de grupos carbonilo por  $H_2O_2$  en cepas deficientes de diferentes chaperonas moleculares. Tinción por Coomassie de las proteínas (A) e inmunoensayo con anti-DNP (B). Identificación de grupos carbonilos por Western-blot en las cepas MC4100 (silvestre; 1), JGT3 ( $\Delta clpB$ , 2), JGT11 ( $\Delta htpG$ , 3), JGT17 ( $\Delta ibp1$ , 4) y WM51 ( $\Delta hslO$ , 5) antes y después de un tratamiento de 60 minutos con 4mM de  $H_2O_2$  (\*).

### 3.2.1. Recuperación de un estrés oxidativo de cepas deficientes en diferentes chaperonas moleculares

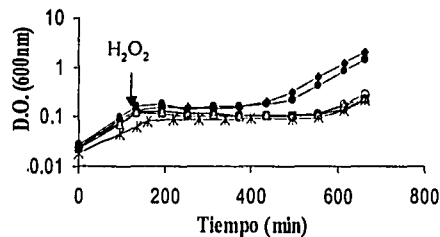
Para obtener más evidencias sobre la importancia de las diferentes chaperonas en la respuesta al estrés oxidativo realizamos curvas de recuperación al tratamiento con  $H_2O_2$  de las diferentes mutantes. De los resultados obtenidos en la Figura 3.7. se puede observar que la cepa silvestre MC4100 tardó 4 horas en recuperar el crecimiento, 1.5 horas más tarde la cepa JMH0035 ( $\Delta dnaK$ ) reanudó su crecimiento con un tiempo de generación similar a la cepa silvestre. En contraste, las cepas JGT3 ( $\Delta clpB$ ), JGT11 ( $\Delta htpG$ ), JGT17 ( $\Delta ibp1$ ) y WM51 ( $\Delta hslO$ ) tardaron 7.5 horas después del tratamiento en reestablecer su crecimiento pero a un tiempo de generación menor a la cepa silvestre,

inclusive, a un tiempo de generación menor al que tenían estas mismas cepas antes del tratamiento con excepción de la cepa JGT3.

**A**



**B**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Figura 3.7. Curva de recuperación al tratamiento con  $H_2O_2$  de mutantes deficientes en chaperonas.** Curva de crecimiento de las cepas MC4100 (silvestre; ♦), JGT3 ( $\Delta clpB$ ; ■), JGT11 ( $\Delta htpC$ ; Δ), JGT17 ( $\Delta ibpAB$ ; ★) WM51( $\Delta hslO$ ; ○) y JMH0035 ( $\Delta dnaK$ ; ●) en MM suplementado con hidrolizado de caseína 0.1% y glucosa 0.2% (A) tratadas con  $H_2O_2$  a una concentración final de 4 mM al momento que indica la flecha (B).

Esto sugiere que tanto la cepa MC4100 como la cepa JMH0035 pudieron, aparentemente, sobreponerse por completo al daño causado por el tratamiento con  $H_2O_2$ , a diferencia de las cepas JGT3, JGT11 y WM51 que aunque pueden recuperar el crecimiento, 3.5 horas después que la cepa silvestre, el tiempo de generación se observa afectado, lo cual puede deberse a que dichas cepas no pudieron corregir por completo el daño causado por  $H_2O_2$ .

3.2.2. Viabilidad de cultivos de cepas deficientes en diferentes chaperonas moleculares después de un estrés oxidativo

Al realizar ensayos de viabilidad, después de un tratamiento con  $H_2O_2$ , con las diferentes mutantes, a pesar de la clara deficiencia en el crecimiento en condiciones oxidantes (Fig. 3.7. B), sólo las cepas WM51 ( $\Delta hslO$ ) y JMH0035 ( $\Delta dnaK$ ) fueron sensibles al tratamiento en comparación a la cepa silvestre, en aproximadamente un orden de magnitud (Fig. 3.8.). A pesar de que en el experimento se observó que la cepa JGT17 ( $\Delta ibpAB$ ) es más sensible que la cepa silvestre, no podemos asegurarlo debido a que la tasa de crecimiento de la JGT17 es menor que la cepa silvestre y a pesar de que se intentó ajustar por la densidad de los cultivos sin importar el tiempo de incubación no se obtuvieron resultados confiables, al parecer se tomaba una menor cantidad de células de la cepa mutante que de la cepa silvestre, esto puede deberse a la mucosidad de las células de la cepa JGT17 y que al medir la densidad del cultivo posiblemente este no tuviese la misma cantidad de células que la cepa silvestre ya que las células son mucho mas filamentosas que las demás cepas (datos no mostrados).

Por lo anterior podemos decir que las chaperonas Hsp33 y DnaK son importantes para mantener la visibilidad de las células en altas concentraciones de  $H_2O_2$ .

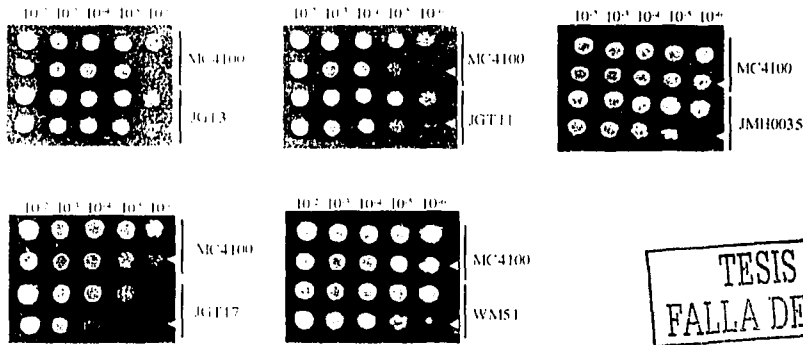


Figura 3.8. Viabilidad de mutantes deficientes en diferentes chaperonas después de un tratamiento con  $H_2O_2$ . Los ensayos de viabilidad de las cepas MC4100 (silvestre), JGT3 ( $\Delta clpB$ ), JGT11 ( $\Delta htpG$ ), JMH0035 ( $\Delta dnaK$ ), JGT17 ( $\Delta ibp1$ ) y WM51 ( $\Delta hslO$ ) fueron realizados después de un tratamiento con  $H_2O_2$  8mM por 1 hora (flechas blancas).

### 3.2.3. Búsqueda de otros componentes que participen en la defensa contra el estrés oxidativo

Como ya hemos demostrado la proteína AdhE<sup>A267T/E568K</sup> requiere la protección de la chaperona molecular DnaK para llevar a cabo su función en presencia de oxígeno. Sin embargo, se ha demostrado que DnaK puede interactuar con diferentes chaperonas para mejorar su función protectora en respuesta al estrés térmico (Goloubinoff *et al.*, 1999; Mogk *et al.*, 1999; Rüdiger *et al.*, 2001; Mogk *et al.*, 2003) por lo que muy probablemente también esté participando con otras chaperonas en la protección a la inactivación por MCO. Para comprobar lo anterior realizamos mutagénesis al azar, utilizando minitransposones, y así identificar células mutantes de la cepa JE52 que hayan perdido la capacidad de crecer en etanol como única fuente de energía y carbono en condiciones aeróbicas.

#### 3.2.3.1. Aislamiento de mutantes de la cepa JE52 incapaces de crecer en etanol

Se realizó mutagénesis al azar utilizando a los fagos  $\lambda$  modificados que llevan al transposón miniTn5 ó miniTn10 (véase Material y Métodos apartado 2.3.2.2). Después de un muestreo de 10,500 mutantes, se logró aislar 4 mutantes que habían perdido la capacidad de crecer en etanol como única fuente de energía y carbono en condiciones aeróbicas (etanol<sup>-</sup>).

La inserción de dichas mutantes fue transducida de regreso a la cepa JE52 (etanol<sup>++</sup>) monitoreando la resistencia a antibióticos, con la finalidad de corroborar que la resistencia al antibiótico co-transdujera con el fenotipo, lo cual significa que sólo hubo una inserción de un transposón en el cromosoma. Únicamente se pudo transducir 3 de las cuatro mutantes, a éstas se les fue asignado las denominaciones JMH0206, JMH0207 y JMH0208.

Una de las hipótesis sobre por qué estas mutantes habían perdido la capacidad de crecer en etanol era que la inserción del transposón hubiese sido en el gen *dnaK*,

con lo cual la enzima AdhE<sup>A267T/E568K</sup> ya no podría funcionar en aerobiosis. Sin embargo, ninguna de las mutantes mostraba problemas de crecimiento a 42°C, por lo que se descartó la posibilidad. También se consideró la posibilidad de que la inserción hubiese sido en el gen *adhE* lo cual es suficiente para que las mutantes no pudiesen utilizar al etanol.

Mediante ensayos de PCR, siguiendo la estrategia esquematizada en la Figura 3.9. se demostró que el gen *adhE* se encontraba intacto (Fig. 3.10.).

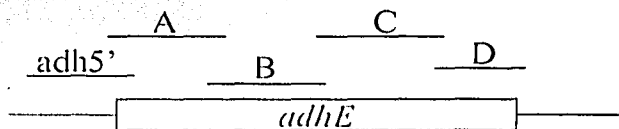


Figura 3.9. Esquema de la amplificación fragmentada del gen *adhE*. Comprobación de la integridad del gen *adhE* amplificando fragmentos contiguos y sobrelapados en sus extremos utilizando a los oligonucleótidos ADH5'-ADH3' (fragmento *adh5'*), ADH A3'-ADH A5' (fragmento A), ADH B3'-ADH B5' (fragmento B), ADH C3'-ADH C5' (fragmento C), ADH D3'-ADH D5' (fragmento D). La secuencia de los oligonucleótidos está descrita en *Material y Métodos* apartado 2.1.

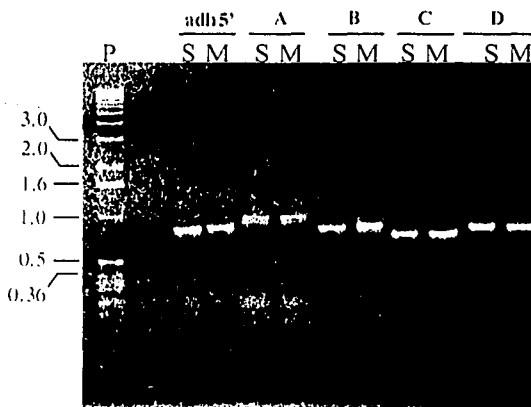


Figura 3.10. Corroboración de la integridad de gen *adhE*. Productos de PCR de los fragmentos *adh5'*, A, B, C y D del gen *adhE* descritos en la Figura 3.9. provenientes de la cepa JE52 (etanol<sup>+</sup>; S) y JMH0208 (etanol<sup>-</sup>; M). El mismo resultado fue obtenido con las mutantes JMH0206 y JMH0207 (datos no mostrados).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

---

Por lo anterior, posiblemente la inserción del transposón en una o en las tres cepas mutantes sea en un gen que codifique para una proteína que interaccione con DnaK durante la protección contra la inactivación de AdhE<sup>A267T/E568K</sup> por MCO.

Por ahora la caracterización de las mutantes se esta llevando a cabo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN**



#### 4.1. Resultados Generales

##### 4.1.1. Participación de chaperonas moleculares en la protección contra el daño ocasionado por el estrés oxidativo.

Las chaperonas moleculares son proteínas que se han encontrado en todos los organismos estudiados, lo cual refleja la gran importancia que tienen en el funcionamiento normal de las células.

Recientemente se ha dado mayor interés en relacionar a las chaperonas moleculares en la protección al estrés oxidativo. Sobre esta línea, de manera muy importante, se ha descrito a la proteína Hsp33 como una chaperona cuya actividad está regulada por su estado redox (Jakob *et al.*, 1999) y que el parecer participa en la protección al estrés oxidativo. Tal sofisticación en la regulación de la función de la chaperona ha sugerido fuertemente una participación fundamental en respuesta al estrés oxidativo.

La chaperona molecular DnaK (Hsp70) de *E. coli* además de tener una participación primordial en la respuesta al estrés térmico interviene en diferentes procesos celulares como en la biogénesis de proteínas (Deuerling *et al.*, 1999; Deuerling *et al.*, 2003), en el control de la respuesta al estrés calórico (Arsène *et al.*, 2000), secreción de proteínas (Wild *et al.*, 1992), entre otras funciones.

El presente trabajo ha contribuido en demostrar la participación de DnaK en la protección de proteínas contra el daño ocasionado por el estrés oxidativo en *E. coli*. Dicha asunción tiene como fundamentos i) que en ausencia de DnaK la oxidación de las proteínas en las células es mucho mayor cuando son expuestas a un agente oxidante como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y ii) que una enzima fermentativa como la etanol óxidoreductasa (AdhE) de *E. coli*, inactivada por MCO (Cabiscol *et al.*, 1994), a pesar de ser una de las proteínas mayoritariamente oxidadas del extracto celular (Tamarit *et al.*, 1998), puede llevar a cabo su función en presencia de oxígeno cuando es protegida por DnaK.

Posiblemente la interacción que hemos descrito entre DnaK y AdhE sea un mecanismo que los organismos que originalmente fueron anaeróbicos han empleado durante millones de años para poder adaptarse a nichos ecológicos aeróbicos. Cabe señalar que no es el único mecanismo mediante el cual una enzima puede contender contra la oxidación. Tenemos el ejemplo de la enzima FucO (Lu *et al.*, 1998), la cual a través de sustituciones de aminoácidos en su estructura primaria adquirió *per se* mayor resistencia a la inactivación por oxidación. Sin embargo, podemos sugerir que la protección de las proteínas por las chaperonas moleculares contra el daño oxidativo, haya sido en la evolución una solución inmediata para sobrellevar el cambio de una atmósfera reductora a una atmósfera oxidante, lo cual dio tiempo a que mutaciones en el DNA pudiesen seleccionarse con la finalidad de hacer proteínas más resistentes a la oxidación.

Por otro lado, pudimos observar que mutantes deficientes de ClpB, HtpG y Hsp33 al ser tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan mayor oxidación en las proteínas que su cepa isogénica (Fig. 3.6.). Las cepas deficientes de lbpAB no presentaron diferencias en los niveles de carbonilación con la sepa silvestre, lo cual correlaciona con datos reportados por Kitagawa y colaboradores (Kitagawa *et al.*, 2000) donde reportan que cepas que sobre expresan a las chaperonas lbpA e lbpB son más resistentes a O<sub>2</sub><sup>••</sup> pero no a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cabe señalar que en las mutantes  $\Delta clpB$ ,  $\Delta htpG$  y  $\Delta lbpAB$ , a diferencia de la cepa silvestre y de la mutante  $\Delta hslO$ , se observa claramente la oxidación de una proteína con un peso molecular aproximado de 96 kDa correspondiente a la enzima AdhE, sin embargo, es necesario corroborar la identidad de la proteína. Es importante señalar cualquiera que fuese la proteína en cuestión al parecer es un blanco para algunas chaperonas.

A pesar de que observamos un aumento general en la carbonilación de las proteínas del extracto celular de las mutantes utilizadas, no pudimos identificar proteínas que fuesen diferencialmente oxidadas en las diferentes mutantes e inclusive no es

posible identificar precisamente aquellas proteínas que fueron carboniladas. Quizá esto se deba a la resolución que se tiene en los geles de poliacrilamida de una dimensión.

Como trabajo a futuro se identificará la formación de grupos carbonilo por Western-blot utilizando geles de proteínas de doble dimensión, con lo cual podremos identificar aquellas proteínas que son mayoritariamente oxidadas durante el tratamiento con  $H_2O_2$  u otros agentes oxidantes y aquellas proteínas que son más oxidadas en ausencia de alguna chaperona.

Una observación interesante es el hecho que las mutantes  $\Delta clpB$ ,  $\Delta htpG$  y  $\Delta hslO$  al ser tratadas con  $H_2O_2$  no son capaces de recuperar la tasa de crecimiento anterior al tratamiento, en contraste a la cepa  $\Delta dnaK$ , cuya mutación en teoría tendría mayores repercusiones en la protección a la oxidación y en funciones celulares, sorprendentemente tiene una recuperación más rápida que las otras mutantes además de reestablecer la tasa de crecimiento anterior al tratamiento. Posiblemente esto se deba a que una mutante  $\Delta dnaK$  puede adquirir mutaciones supresoras que le permitan sobrellevar la falta de DnaK (como la sobre expresión de GroEL), posiblemente esta mutante ya tenga alguna supresión.

A pesar del retraso en el restablecimiento del crecimiento de las mutantes observado en la figura 3.6, únicamente las cepas deficientes en DnaK y Hsp33 fueron más sensibles al  $H_2O_2$ . Posiblemente DnaK y Hsp33 protejan específicamente del estrés oxidativo a proteínas importantes en la viabilidad de las células.

Con base en lo anteriormente mencionado podemos decir que, además de DnaK, las chaperonas ClpB, HtpG y Hsp33 tienen un papel de protección durante el estrés oxidativo.

La teoría más aceptada sobre el envejecimiento es la teoría de la acumulación del daño celular ocasionado por procesos oxidativos. Existen diferentes observaciones que sustentan dicha teoría, una de ellas es el hecho que la única manipulación

experimental que retarda el envejecimiento en roedores y primates es la restricción calórica, la explicación de dicho fenómeno es que en estas condiciones disminuye la oxidación a nivel de proteínas, DNA y lípidos de membrana celular (Youngman *et al.*, 1992). Aún en bacterias se ha demostrado que el nivel de oxidación de las proteínas correlaciona con el tiempo transcurrido en la fase estacionaria en *E. coli* y que en este estadio, en respuesta a la oxidación, son expresadas diferentes proteínas entre las que destaca DnaK (Dukan y Nystrom, 1998). Así que muy probablemente en un cultivo senescente de *E. coli* la participación de las chaperonas en la protección contra la oxidación sea determinante en la viabilidad de las células en dicho cultivo. Si esto fuera así, cultivos senescentes de mutantes en diferentes chaperonas presentarían posiblemente menor viabilidad que una cepa silvestre. De esta manera sería posible identificar aquellas chaperonas que son requeridas en cultivos viejos de *E. coli*.

Por último, a través de la inserción al azar de minitransposones, se logró obtener mutantes de la cepa JE52 (etanol<sup>++</sup>) que han perdido la capacidad de utilizar al etanol como única fuente de energía y carbono (cepas etanol<sup>-</sup>). Esta selección se realizó pensando en identificar alguna proteína que pudiera participar, junto con DnaK, en la protección de la actividad aeróbica de AdhE<sup>A267T/E568K</sup>. Las mutaciones responsables no se encuentran en gen *dnaK* o *adhE*, ya que ninguna de las mutantes presenta problemas de crecimiento a 42°C y, por otro lado, demostramos que el gen *adhE* no ha sido interrumpido por la inserción del transposón (Fig. 3.10.). Sin embargo, no podemos dejar a un lado la posibilidad de que la cantidad de la enzima AdhE sea menor en las mutantes obtenidas o que su actividad esté afectada.

Para continuar con la caracterización de las mutantes, se identificará al gen afectado por la inserción del transposón a través de PCR-Inverso. También se determinará cantidad de AdhE mediante ensayos de Western-blot y por último se analizará si la actividad de AdhE se encuentra afectada en las mutantes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO 5. REFERENCIAS





1. Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers-Eichhorn, L., Cacciuttolo, M. A., Akman, S. A. & Rao, G. (1995). Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med* **19**, 897-902.
2. Aristarkhov, A., Mikulskis, A., Belasco, J. G. & Lin, E. C. (1996). Translation of the *adhE* transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 4327-4332.
3. Arsène, F., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **10**, 3-9.
4. Barbirz, S., Jakob, U. & Glocker, M. O. (2000). Mass spectrometry unravels disulfide bond formation as the mechanism that activates a molecular chaperone. *J Bacteriol* **275**, 18759-18766.
5. Bardwell, J. C. & Craig, E. A. (1988). Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol* **170**, 2977-2983.
6. Blattner, F. R., Plunkett, G. 3., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.
7. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586.
8. Cabiscol, E., Aguilar, J. & Ros, J. (1994). Metal-catalyzed oxidation of Fe<sup>2+</sup> dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* **269**, 6592-6597.
9. Chen, Y. M. & Lin, E. C. (1991). Regulation of the *adhE* gene, which encodes ethanol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 8009-8013.
10. Chuang, S. E. & Blattner, F. R. (1993). Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 5242-5252.
11. Clark, D. & Cronan, J. E. Jr. (1980). *Escherichia coli* mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. *J Bacteriol* **141**, 177-183.
12. Clark, D. P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **5**, 223-234.

13. **Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Lunec, J. (2003).** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**, 195-214.
14. **D'Mello, R., Hill, S. & Poole, R. K. (1995).** The oxygen affinity of cytochrome *bo'* in *Escherichia coli* determined by the deoxygenation of oxyleghemoglobin and oxymyoglobin: Km values for oxygen are in the submicromolar range. *J Bacteriol* **177**, 867-870.
15. **Deuerling, E., Patzelt, H., Vorderwulbecke, S., Rauch, T., Kramer, G., Schaffitzel, E., Mogk, A., Schulze-Specking, A., Langen, H. & Bukau, B. (2003).** Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol Microbiol* **47**, 1317-1328.
16. **Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. & Bukau, B. (1999).** Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**, 693-696.
17. **Ding, H., Hidalgo, E. & Demple, B. (1996).** The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem* **271**, 33173-33175.
18. **Driessen, A. J., Fekkes, P. & van der Wolk, J. P. (1998).** The Sec system. *Curr Opin Microbiol* **1**, 216-222.
19. **Dukan, S. & Nystrom, T. (1998).** Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev* **12**, 3431-3441.
20. **Dukan, S. & Nystrom, T. (1999).** Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **274**, 26027-26032.
21. **Echave, P., Esparza-Ceron, M. A., Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., Membrillo-Hernández, J. & Lin, E. C. (2002).** DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4626-4631.
22. **Fayet, O., Ziegelhoffer, T. & Georgopoulos, C. (1989).** The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**, 1379-1385.
23. **Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. & Horwich, A. L. (1994).** Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**, 557-559.
24. **Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (1999).** Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13732-13737.

25. **Graf, P. C. & Jakob, U. (2002).** Redox-regulated molecular chaperones. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1624-1631.
26. **Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1999).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Science Publications.
27. **Hayes, S. A. & Dice, J. F. (1996).** Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* **132**, 255-258.
28. **Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. & Bukau, B. (1996).** *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4437-4441.
29. **Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. (1999).** Chaperone activity with a redox switch. *Cell* **96**, 341-351.
30. **Jiang, X., Diwa, A. & Belasco, J. G. (2000).** Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol* **182**, 2468-2475.
31. **Kaga, N., Umitsuki, G., Nagai, K. & Wachi, M. (2001).** RNase G-dependent degradation of the *eno* mRNA encoding a glycolysis enzyme enolase in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 2216-2220.
32. **Karzai, A. W. & McMacken, R. (1996).** A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J Biol Chem* **271**, 11236-11246.
33. **Kelley, W. L. (1998).** The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* **23**, 222-227.
34. **Kessler, D., Herth, W. & Knappe, J. (1992).** Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 18073-18079.
35. **Kim, K. I., Cheong, G. W., Park, S. C., Ha, J. S., Woo, K. M., Choi, S. J. & Chung, C. H. (2000).** Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **303**, 655-666.
36. **Kitagawa, M., Matsumura, Y. & Tsuchido, T. (2000).** Small heat shock proteins, lbpA and lbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 165-171.
37. **Kitagawa, M., Miyakawa, M., Matsumura, Y. & Tsuchido, T. (2002).** *Escherichia coli* small heat shock proteins, lbpA and lbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. *Eur J Biochem* **269**, 2907-2917.

38. Kleckner, N., Bender, J. & Gottesman, S. (1991). Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol* **204**, 139-180.
39. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
40. Lengeler, J. W., Drews, G. y Schlegel, H. G. (1999). *Biology of the Prokaryotes*. Lengeler, J. W., Drews, G. y Schlegel, H. G. (eds). Thieme.
41. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**, 346-357.
42. Li, Z., Pandit, S. & Deutscher, M. P. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J* **18**, 2878-2885.
43. Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. & Sparling, R. (1998). Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**, 707-717.
44. Lu, Z., Cabisco, E., Obradors, N., Tamarit, J., Ros, J., Aguilar, J. & Lin, E. C. (1998). Evolution of an *Escherichia coli* protein with increased resistance to oxidative stress. *J Bacteriol* **273**, 8308-8316.
45. Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**, 178-201.
46. Maurizi, M. R. (2001). The function of chaperones and proteases in protein quality control and intracellular protein degradation. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press, pág. 205-234.
47. Membrillo-Hernández, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J. & Lin, E. C. (2000). Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem* **275**, 33869-33875.
48. Membrillo-Hernández, J., Kim, S. O., Cook, G. M. & Poole, R. K. (1997). Paraquat regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by sigma S. *J Bacteriol* **179**, 3164-3170.
49. Membrillo-Hernández, J., Kwon, O., De Wulf, P., Finkel, S. E. & Lin, E. C. (1999). Regulation of *adhE* (encoding ethanol oxidoreductase) by the Fis protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 7390-7393.
50. Membrillo-Hernández, J. & Lin, E. C. (1999). Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: transcription

- from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS. *J Bacteriol* **181**, 7571-7579.
51. **Mikulskis, A., Aristarkhov, A. & Lin, E. C. (1997).** Regulation of expression of the ethanol dehydrogenase gene (*adhE*) in *Escherichia coli* by catabolite repressor activator protein Cra. *J Bacteriol* **179**, 7129-7134.
  52. **Miller, P. F. & Sulavik, M. C. (1996).** Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**, 441-448.
  53. **Mogk, A., Bukau, B. y Deuerling, E. (2001).** Cellular Functions of Cytosolic *Escherichia coli* chaperones. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press, pág. 1-34.
  54. **Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K. L., Schonfeld, H. J., Vierling, E. & Bukau, B. (2003).** Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem* **278**, 31033-31042.
  55. **Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Roder, D., Langen, H. & Bukau, B. (1999).** Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* **18**, 6934-6949.
  56. **Nunoshiba, T., deRojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. & Demple, B. (1993).** Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9993-9997.
  57. **Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. & Reinstein, J. (1997).** GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**, 3417-3422.
  58. **Pomposiello, P. J., Bennik, M. H. & Demple, B. (2001).** Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**, 3890-3902.
  59. **Poole, R. K., Anjum, M. F., Membrillo-Hernández, J., Kim, S. O., Hughes, M. N. & Stewart, V. (1996).** Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of *hmp* (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **178**, 5487-5492.
  60. **Raman, B., Siva Kumar, L. V., Ramakrishna, T. & Mohan Rao, C. (2001).** Redox-regulated chaperone function and conformational changes of *Escherichia coli* Hsp33. *FEBS Lett* **489**, 19-24.

61. **Ranson, N. A., White, H. E. & Saibil, H. R. (1998).** Chaperonins. *Biochem J* **333**, 233-242.
62. **Richter, C. (1987).** Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* **44**, 175-189.
63. **Robertson, H. D., Webster, R. E. & Zinder, N. D. (1968).** Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **243**, 82-91.
64. **Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1997).** Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* **16**, 1501-1507.
65. **Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (2001).** Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *EMBO J* **20**, 1042-1050.
66. **Rye, H. S., Roseman, A. M., Chen, S., Furtak, K., Fenton, W. A., Saibil, H. R. & Horwich, A. L. (1999).** GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* **97**, 325-338.
67. **Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1996).** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 289-96.
68. **Serres, M. H., Gopal, S., Nahum, L. A., Liang, P., Gaasterland, T. & Riley, M. (2001).** A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0035.1-0035.7.
69. **Slepenkov, S. V. & Witt, S. N. (2002).** The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol Microbiol* **45**, 1197-1206.
70. **Song, J. y Morimoto, R. I. (2001).** Hsp70 chaperones net works: the role of regulatory co-chaperones in coordinating stress responses with growth and death. In *Molecular Chaperones in the Cell*. Lund, P. (ed). Oxford: Oxford University Press, pág. 142-163.
71. **Spence, J. & Georgopoulos, C. (1989).** Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG. *J Biol Chem* **264**, 4398-4403.
72. **Spiro, S. & Guest, J. R. (1991).** Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* **16**, 310-314.
73. **Stadtman, E. R. (1993).** Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **62**, 797-821.

74. **Storz, G., Tartaglia, L. A. & Ames, B. N. (1990).** Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**, 189-194.
75. **Storz, G. y Zheng, M. (2003).** Oxidative Stress. In *Bacterial Stress Responses*. Storz, G. y Hengge-Aronis, R. (eds). Washington, D.C.: AMS Press, pág. 47-59.
76. **Tamarit, J., Cabisco, E. & Ros, J. (1998).** Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Bacteriol* **273**, 3027-3032.
77. **Thomas, J. G. & Baneyx, F. (1998).** Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In vivo. *J Bacteriol* **180**, 5165-5172.
78. **Umitsuki, G., Wachi, M., Takada, A., Hikichi, T. & Nagai, K. (2001).** Involvement of RNase G in in vivo mRNA metabolism in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **6**, 403-410.
79. **Wachi, M., Kaga, N., Umitsuki, G., Clark, D. P. & Nagai, K. (2001).** A novel RNase G mutant that is defective in degradation of adhE mRNA but proficient in the processing of 16S rRNA precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1301-1306.
80. **Wild, J., Altman, E., Yura, T. & Gross, C. A. (1992).** DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 1165-1172.
81. **Wu, J. & Weiss, B. (1992).** Two-stage induction of the soxRS (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 3915-3920.
82. **Youngman, L. D., Park, J. Y. & Ames, B. N. (1992).** Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9112-9116.
83. **Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. (1998).** Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**, 1718-1721.





## **CAPÍTULO 6. APÉNDICE**

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

# DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*

Pedro Echave\*, M. Angel Esparza-Cerón†, Elisa Cabiscol\*, Jordi Tamarit\*, Joaquim Ros\*, Jorge Membrillo-Hernández†‡, and E. C. C. Lin§

†Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, 04510 Mexico City, Mexico; \*Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, 25198 Lleida, Spain; and ‡Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115

Edited by Susan Gottesman, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved February 12, 2002 (received for review September 17, 2001)

The *adhE* gene of *Escherichia coli* encodes a multifunctional ethanol oxidoreductase (AdhE) that catalyzes successive reductions of acetyl-CoA to acetaldehyde and then to ethanol reversibly at the expense of NADH. Mutant JE52, serially selected for acquired and improved ability to grow aerobically on ethanol, synthesized an AdhE<sup>A267I/E568K</sup> with two amino acid substitutions that sequentially conferred improved catalytic properties and stability. Here we show that the aerobic growth ability on ethanol depends also on protection of the mutant AdhE against metal-catalyzed oxidation by the chaperone DnaK (a member of the Hsp70 family). No DnaK protection of the enzyme is evident during anaerobic growth on glucose. Synthesis of DnaK also protected *E. coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killing under conditions when functional AdhE is not required. Our results therefore suggest that, in addition to the known role of protecting cells against heat stress, DnaK also protects numerous kinds of proteins from oxidative damage.

enzyme evolution | Hsp70 chaperone

**E**thanol oxidoreductase (AdhE) of *Escherichia coli* is a multifunctional enzyme that catalyzes fermentative production of ethanol by two sequential NADH-dependent reductions of acetyl-CoA, as well as deactivation of pyruvate formate-lyase, which cleaves pyruvate to acetyl-CoA and formate. This large protein of 891 aa apparently emerged as a result of gene fusion. The NH<sub>2</sub>-terminal region of this protein is highly homologous to the family of aldehyde:NAD<sup>+</sup> oxidoreductases, whereas the COOH-terminal region is homologous to the family of Fe<sup>2+</sup>-dependent alcohol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductases. The single Fe<sup>2+</sup>-bound to the alcohol oxidoreductase moiety of the AdhE protomer is also required for the deactivase activity (1–4). The estimated 3 × 10<sup>4</sup> AdhE molecules in an anaerobically grown cell are assembled into helical rod-like structures, or spiroosomes, most of which contain 20–60 protomers. Residues 1–449 and 763–890 of AdhE are involved in its polymerization and may also be responsible for the propensity of the protein to aggregate amorphyously. The biological significance of spiroosomes, however, remains enigmatic (3, 5, 6).

Despite the reversibility of the two NADH-coupled reactions catalyzed by AdhE, wild-type *E. coli* is unable to grow on ethanol as a sole source of carbon and energy, because the *adhE* gene is transcribed aerobically at lowered levels (7–9) and the half-life of AdhE activity is shortened during aerobic metabolism by metal-catalyzed oxidation (MCO). During this process, the hydroxyl radicals locally generated by the Fe<sup>2+</sup>-bound to AdhE covalently attack the amino acid side chains near the active site (10, 11).

Mutants of *E. coli* capable of aerobic growth on ethanol as sole carbon and energy source have been isolated and characterized

(7, 12, 13). All 16 independent first-stage mutants studied by us, typified by JE46, grew on ethanol with a doubling time of 240 min at 37°C and synthesized an AdhE with an Ala-267 → Thr substitution in the acetaldehyde:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase domain (AdhE:<sup>A267T</sup>). Selection of each mutant for improved growth rate on ethanol resulted in a second-stage mutant. All of these second-stage mutants, typified by JE52, grow on ethanol with a doubling time of 90 min and synthesize a mutant protein with a second amino acid change, a Glu-568 → Lys substitution in the ethanol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase domain (AdhE:<sup>A267T/E568K</sup>). Neither the first- nor the second-stage mutants harbor mutations that affect transcriptional control of *adhE* (12).

AdhE:<sup>A267T</sup> catalyzes the CoA-dependent dehydrogenation of acetaldehyde with an increased  $V_{max}$ . Apparently when catalyzing the two sequential reactions in a direction opposite to that of the physiological one, acetyl-CoA formation becomes rate-limiting for wild-type AdhE. The tradeoff for improving the  $V_{max}$  by AdhE:<sup>A267T</sup> is decreased thermal enzyme stability and increased sensitivity to MCO damage. The second amino acid substitution in AdhE:<sup>A267T/E568K</sup> partially restored protein stability and resistance to MCO damage, without further improvement of catalytic efficiency in substrate oxidation (12).

Clues that the altered properties of wild-type and mutant AdhE molecules observed *in vitro* may not in themselves be sufficient to account for the growth abilities of mutants JE46 and JE52 came from an interesting link between AdhE and the molecular chaperone DnaK (Hsp70). DnaK in conjunction with ClpB (Hsp104) has been shown to counteract the aggregation of thermolabile proteins under heat stress, and prominent among these is AdhE (14, 15). Upon inspection, we identified 16 DnaK-binding motifs in AdhE, based on the sequence proposed by Bukau and collaborators (14, 15). It thus seems possible that the functional integrity of the mutant AdhE proteins *in vivo* depends not only on their own properties but also on intervention by DnaK. In this study we address such a possibility.

## Materials and Methods

**Chemicals and Reagent Materials.** Hydrogen peroxide, NAD, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), and *t*-butyl hydroperoxide were purchased from Sigma. Acrylamide/diacrylamide solu-

This paper was submitted directly (Track III) to the PNAS office.

Abbreviations: AdhE, ethanol oxidoreductase encoded by the *adhE* gene; MCO, metal catalyzed oxidation; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside.

‡To whom reprint requests should be addressed. E-mail: polyst@biomedicas.unam.mx

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

tion was supplied by Bio-Rad. Poly(vinylidene difluoride) membranes were from Millipore. The chemiluminescence detection kit (Western Light) was from Tropix (Bedford, MA).

**Strains and Culture Conditions.** The merodiploid strain *E. coli* ECL4000 [MC4100 *adhE*<sup>+</sup>  $\Phi$ (*adhE-lacZ*)] was used as the wild-type parental strain (12, 16). A null *adhE::kan* strain (ECL4002) was used as a control for coimmunoprecipitation experiments to demonstrate physical interaction of the enzyme with DnaK. The selection of mutant strains JE46 and JE52 with acquired ability to grow on ethanol as sole carbon and energy source was described (12). An *E. coli* strain bearing the chromosomal locus  $P_{lac}::dnaK J'$ -*cat-lacI*<sup>+</sup> (hereafter simply referred to as  $P_{lac}::dnaKJ$ ) was provided by B. Bukau (17). An *E. coli* strain bearing the  $\Delta dnaK52::Cm^r$  locus (hereafter simply referred to as  $\Delta dnaK$ ), also provided by B. Bukau, has a deletion of 933 bp from the 5' end of *dnaK* but a functional *dnaJ* (18, 19). The plasmid pBN15 ( $P_{lac}::dnaK J'$ -*lacI'*-*bla'*) was provided by P. Blum (20). The chromosomal genetic loci and the plasmid were transferred to our experimental strains by following standard genetic procedures (21).

Minimal medium with 0.2% glucose and/or 2% ethanol as carbon and energy source was supplemented with 0.1% casein acid hydrolysate (21, 22). Culture optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) was determined in a DU640 Beckman spectrophotometer. Aerobic cultures of 10 ml were grown at 30°C with shaking (200 rpm) in 250-ml flasks. Anaerobic cultures were grown at 30°C in 10-ml test tubes filled to the brim. The BBL Gas-Pack system was used for anaerobic growth on solid media at 30°C. When used, IPTG was added at 1 mM, and ampicillin at 200  $\mu$ g/ml.

**Ethanol Oxidoreductase Assays.** Cells were disrupted by sonication in an ice bath, and the centrifuged extracts were assayed for enzyme activity at 25°C as described (22). The assay mixture (1 ml) consisted of 1.6 M ethanol, 0.3 M potassium carbonate buffer (pH 10), and 0.60 mM NAD. The formation of NADH upon enzyme addition was monitored spectrophotometrically at 340 nm.

**Coimmunoprecipitation Assays and Western Blot Analysis.** Cells harvested at midexponential phase by centrifugation were resuspended in ice-cold immunoprecipitation buffer consisting of 10 mM HEPES-KOH at pH 7.9, 125 mM NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, and 1  $\mu$ M pepstatin A (all of the reagents were from Sigma). After disruption of the cells by sonication, the supernatant fraction was collected and the protein concentration was adjusted to 2  $\mu$ g/ $\mu$ l with the same ice-cold buffer. One microgram of monoclonal anti-DnaK (StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada) or polyclonal anti-AdhE antibodies (12) was added to 250  $\mu$ l of cell extract and incubated for 60 min at 4°C. Protein A Sepharose CL-4B beads (10  $\mu$ l; Amersham Pharmacia) were then added and the incubation was continued for 90 min at 4°C with gentle shaking. In control experiments, antibodies were omitted. Proteins bound to protein A Sepharose were eluted four times with the ice-cold immunoprecipitation buffer and loaded onto an SDS/9% polyacrylamide gel. The gel was subjected to Western blot analysis with anti-DnaK or anti-AdhE antibodies as described (11). Quantification of AdhE in extracts of cells grown aerobically or anaerobically was performed by Western blot analysis using anti-AdhE antibodies (12). The intensity of the bands was determined by using a Lumi Imager (Boehringer Mannheim).

**Protein Derivatization and Immunodetection of Oxidatively Damaged Proteins.** Oxidized proteins in cell extracts were revealed immunohistochemically by their carbonyl content (23) after derivatization

with dinitrophenylhydrazine (11). Immunodetection was performed according to the instructions in the Tropix kit. The anti-2,4-dinitrophenyl antibodies were supplied by Dako and used at a 1:2000 dilution. The secondary antibody was a goat anti-rabbit antibody conjugated with alkaline phosphatase (Tropix) used at a 1:25,000 dilution.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment.** JM1801 cells ( $P_{IPTG}::dnaKJ/\Delta dnaKJ$ ) were grown aerobically at 30°C on glucose in the presence or absence of 1 mM IPTG. At midexponential phase of growth ( $OD_{600}$  0.6,  $\approx 1 \times 10^8$  cells ml<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to give a concentration of 8.8 mM. Samples of 1 ml were then pipetted into each of nine Eppendorf tubes placed in a water bath at 30°C. At the desired time, a tube was withdrawn and the bacterial suspension was serially diluted with 10 mM MgSO<sub>4</sub> and then plated in triplicate on glucose agar for viable count.

## Results

**DnaK Dependence for Aerobic Growth on Ethanol by Strains JE46 and JE52.** To determine whether the chaperone influences the *in vivo* stability of AdhE<sup>A267T</sup> and AdhE<sup>A267T/E568K</sup>, we first replaced the *dnaKJ* operon on the chromosome of the mutants JE46 and JE52 by  $P_{IPTG}$  transduction of an IPTG-inducible *dnaKJ* operon to yield JM1805 ( $P_{IPTG}::dnaKJ$  *adhE*<sup>A267T</sup>) and JM1803 ( $P_{IPTG}::dnaKJ$  *adhE*<sup>A267T/E568K</sup>), respectively. These strains were then tested for growth on glucose or ethanol agar in the presence or absence of IPTG. Like the wild-type parent ECL4000, the transductants JM1805 and JM1803 grew aerobically or anaerobically on glucose irrespective of the presence or absence of IPTG. By contrast, the transductants grew aerobically on ethanol only when their  $P_{IPTG}::dnaKJ$  construct was induced by IPTG. A control experiment showed that ethanol, at the concentration used, did not inhibit aerobic or anaerobic growth on glucose (Fig. 1). It should be added that transformation of the wild-type strain ECL4000 with the plasmid pBN15 bearing  $P_{lac}::dnaKJ$  (20) did not confer aerobic growth ability on ethanol even when DnaK was induced by IPTG (data not shown). Thus, it seems that DnaK stabilizes AdhE<sup>A267T</sup> and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> and that, even if the wild-type enzyme is also stabilized, its specific activity remains insufficient to support growth on ethanol. Because the results from both mutant strains were essentially the same, further studies focused on mutant JE52 and its enzyme AdhE<sup>A267T/E568K</sup>.

**DnaK Protection of AdhE and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> Specific Activity Occurs During Aerobic but Not Anaerobic Growth.** We next assayed ethanol oxidoreductase activity level in extracts of cells with various combinations of *adhE* and *dnaK* alleles grown under different conditions. Data in Table 1 show that under anaerobic growth conditions, activity of neither the wild-type nor the mutant enzyme protein needed DnaK. Chromosomal deletion of *dnaK*, however, lowered the aerobic activity level of the wild-type AdhE by 65–70% (strain ECL4000 compared with strain JM1800). By contrast, the same deletion lowered the aerobic AdhE<sup>A267T/E568K</sup> activity level by 90% (strain JE52 compared with strain JM1802). As expected, after both  $\Delta dnaK$  strains were transduced with the  $P_{IPTG}::dnaKJ$  construct, induction by IPTG restored the aerobic AdhE and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> activity levels to those observed in the *dnaK*<sup>+</sup> background. IPTG was without effect in the parental nontransduced  $\Delta dnaK$  strains. The 5- to 6-fold increase of the ethanol oxidoreductase specific activity of AdhE<sup>A267T/E568K</sup> over that of AdhE in extracts of aerobically grown cells reflects the consequence of structural change of the protein and not the rate of gene transcription (12).

**Protection of Preformed AdhE by DnaK after Shifting from Anaerobic to Aerobic Growth Conditions.** The results from the aerobic growth experiments could reflect either the protection of AdhE from

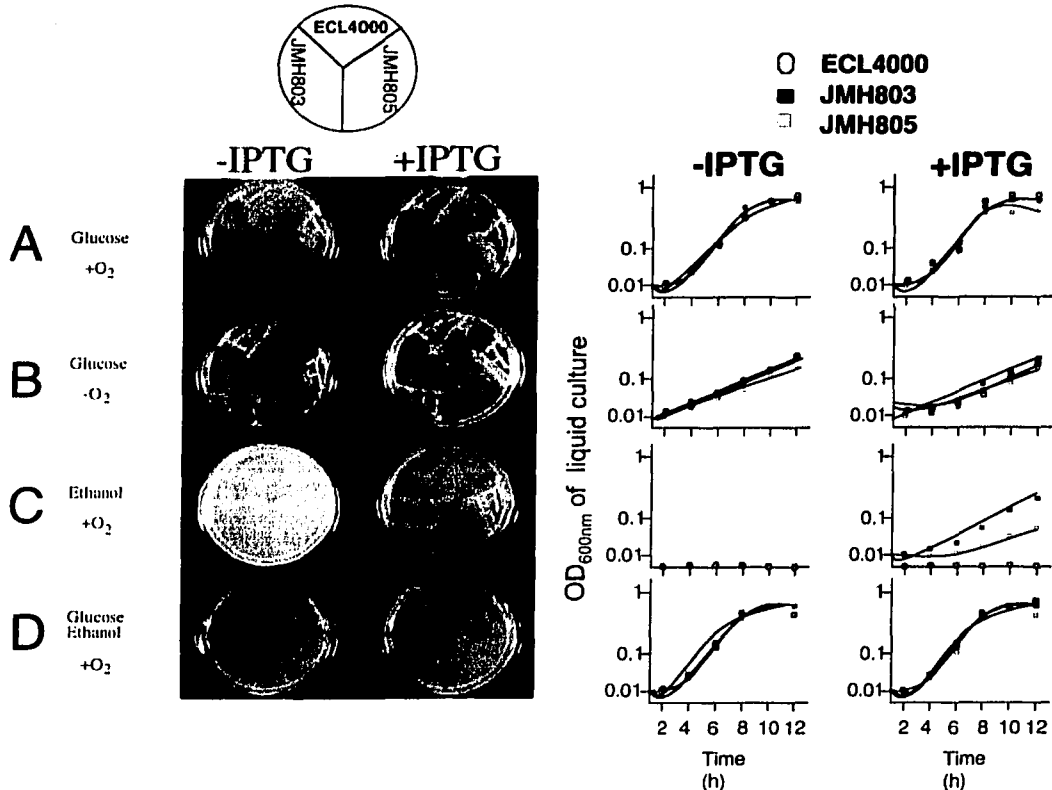


Fig. 1. Growth test of wild-type and various ethanol-mutant strains on different media and culture conditions. (Left) Cells of ECL4000 (*adhE*<sup>+</sup>), JMH803 (*P<sub>IPTG</sub>dnaK adhE<sup>A267T/E568K</sup>*), and JMH805 (*P<sub>IPTG</sub>dnaK adhE<sup>A267T</sup>*) were seeded on agar containing different carbon sources in minimal medium, with or without IPTG. Plates containing glucose agar were incubated aerobically (A) or anaerobically (B). Plates containing ethanol agar (C) or ethanol plus glucose agar (D) were incubated only aerobically. The photography was taken after 48 h. (Right) Under conditions corresponding A to D, growth of ECL4000 (○), JMH803 (■), and JMH805 (□) cells in liquid medium was monitored.

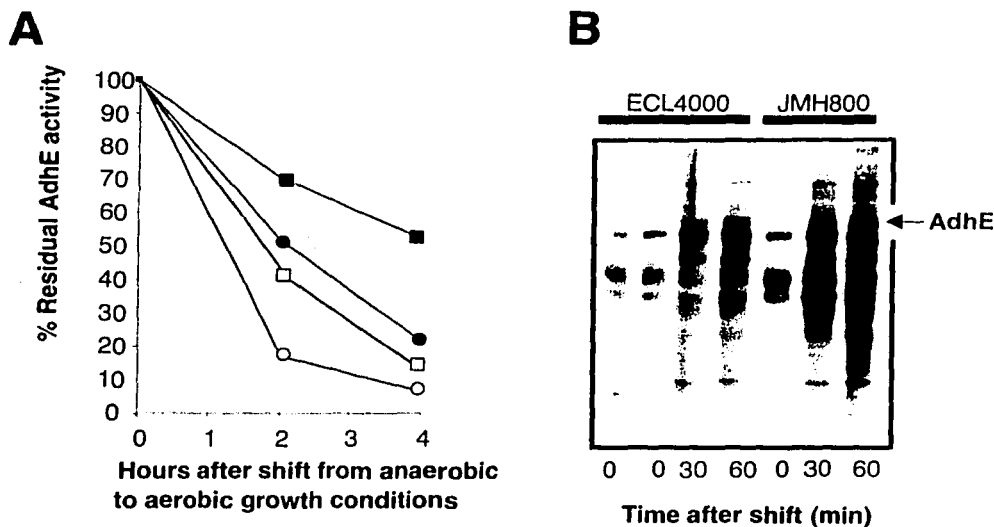
inactivation by DnaK or the promotion of the synthesis and maturation of the enzyme by the chaperone. To distinguish between these two possibilities, cells synthesizing AdhE and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> in the presence or absence of DnaK were first

grown anaerobically on glucose. Exponentially growing cultures were then transferred to a large flask for aerobic incubation (further transcription of *adhE* repressed). After the shift, samples were withdrawn at different times for assay of the specific

Table 1. AdhE activity levels of different strains grown aerobically or anaerobically in glucose medium in the presence or absence of IPTG to induce DnaK

Strain	Derived from	Relevant genotype*	Ethanol oxidoreductase specific activity, nmol/min per mg			
			Aerobic		Anaerobic	
			-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG
ECL4000	MC4100	<i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR attB::Φ(adhE-lacZ)</i>	86 ± 10	98 ± 12	660 ± 7	700 ± 20
JMH800	ECL4000	<i>ΔdnaK adhE<sup>+</sup></i>	31 ± 6	28 ± 08	640 ± 90	700 ± 10
JMH801	ECL4000	<i>P<sub>IPTG</sub>dnaKJ adhE<sup>+</sup></i>	29 ± 10	97 ± 10	711 ± 70	900 ± 10
JES2	ECL4000	<i>dnaK<sup>+</sup> adhE<sup>A267T/E568K</sup></i>	580 ± 90	550 ± 70	1,600 ± 130	1,800 ± 200
JMH802	JES2	<i>ΔdnaK adhE<sup>A267T/E568K</sup></i>	49 ± 12	50 ± 16	1,600 ± 180	1,750 ± 300
JMH803	JES2	<i>P<sub>IPTG</sub>dnaKJ adhE<sup>A267T/E568K</sup></i>	120 ± 11	670 ± 100	1,900 ± 260	1,900 ± 200

\*For detailed description of *dnaK* alleles see Materials and Methods.



**Fig. 2.** Loss of specific ethanol oxidoreductase activity and carbonyl-content analysis in cells with or without DnaK, after a shift from anaerobic to aerobic growth conditions. Cultures of various strains, grown anaerobically until the  $OD_{600}$  reached 0.7 were transferred to flasks for aerobic incubation (see *Materials and Methods*). Samples were withdrawn from aerobic cultures at indicated times for analysis. (A) Specific ethanol oxidoreductase activity in cell extracts of cells: ECL4000 (*adhE<sup>+</sup> dnaK<sup>+</sup>*; ■), JM1800 (*adhE<sup>+</sup> ΔdnaK*; ●), JE52 (*adhE<sup>A267T/E568K</sup> dnaK<sup>+</sup>*; □), and JM1800 (*adhE<sup>+</sup> ΔdnaK*; ○). Data from each strain were obtained from at least three independent cultures, with a variation of less than 15%. Results from a typical experiment are shown. (B) Carbonyl-content analysis of strain ECL4000 (*adhE<sup>+</sup> dnaK<sup>+</sup>*) and its isogenic JM1800 (*adhE<sup>+</sup> ΔdnaK*) mutant at 30 or 60 min after the shift to aerobic conditions. Location of AdhE protein is shown by an arrow.

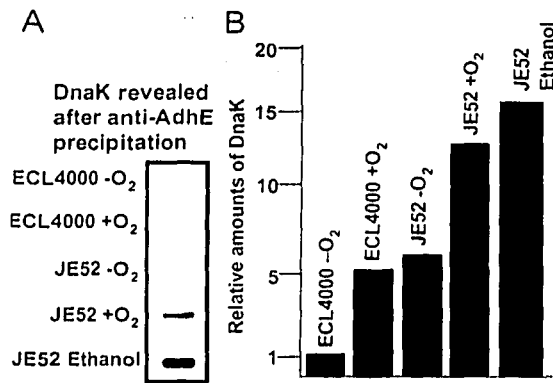
activity of ethanol oxidoreductase. As shown in Fig. 2A, the specific activity of AdhE<sup>A267T/E568K</sup> dropped more rapidly than that of AdhE. Lack of DnaK accelerated the activity loss of both wild-type and mutant enzymes. We also monitored the change in carbonyl content of cellular proteins in *dnaK<sup>+</sup>* and *ΔdnaK* cells 30 and 60 min after the shift from anaerobic to aerobic growth conditions. As shown in Fig. 2B, carbonylation of proteins is consistently higher in *ΔdnaK* cells than in the isogenic *dnaK<sup>+</sup>* cells. Moreover, the percent residual enzyme activity after 60 min of aerobic exposure is consistently lower for AdhE<sup>A267T/E568K</sup> than for AdhE. It should be mentioned that the growth rate of *dnaK<sup>+</sup>* and *ΔdnaK* cells was not detectably different under the experimental conditions (data not shown). Thus, DnaK protects the preformed AdhE against MCO and the growth rate of the *ΔdnaK* mutant is not an issue.

**Amount of the AdhE Protein and Enzyme Activity Units in *dnaK<sup>+</sup>* and *ΔdnaK* Strains.** Because DnaK may protect AdhE from degradation, and from inactivation, the amounts of the AdhE protein in extracts of aerobically or anaerobically grown cells of ECL4000 (*adhE<sup>+</sup> dnaK<sup>+</sup>*), JM1800 (*adhE<sup>+</sup> ΔdnaK*), JE52 (*adhE<sup>A267T/E568K</sup> dnaK<sup>+</sup>*), and JM1802 (*adhE<sup>A267T/E568K</sup> ΔdnaK*) were also compared. Aerobic cultures growing on glucose were harvested during exponential phase ( $OD_{600} = 0.3$ ), whereas the corresponding anaerobic cultures were harvested when fully grown. The AdhE protein content was then analyzed by Western blot with polyclonal anti-AdhE antibodies. In aerobically grown cells, the lack of DnaK lowered the AdhE or AdhE<sup>A267T/E568K</sup> content by about 40%. In anaerobically grown cells, no DnaK-associated difference in AdhE or AdhE<sup>A267T/E568K</sup> content was observed (data not shown).

When the aerobic levels of ethanol oxidoreductase activity were assayed, the lack of DnaK lowered the AdhE and the AdhE<sup>A267T/E568K</sup> specific activities by 3.3- and 10-fold, respec-

tively (Table 1). The more rapid rate of MCO enzyme inactivation than the disappearance of the protein has also been reported for other Fe<sup>2+</sup>-dependent enzymes such as glycerol oxidoreductase (24, 25).

**Physical Interaction of AdhE and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> with DnaK.** If protection of AdhE by DnaK is stoichiometric or processive, a significant portion of AdhE should exist as a DnaK complex. We therefore assayed the amount of DnaK associated with AdhE by coimmunoprecipitation experiments with extracts of aerobically or anaerobically grown ECL4000 or JE52 strains. Fig. 3 shows the results of one such experiment in which anti-AdhE antibodies were first used for the precipitation, and subsequently, the amount DnaK associated with the precipitate was revealed by Western analysis using anti-DnaK antibodies. Wild-type AdhE showed negligible association with DnaK when extracted from cells grown anaerobically on glucose, whereas significant association was observed when the cells were grown aerobically on the same medium. The actual difference in the association should be even more striking, if one considers that anaerobically grown cells are expected to synthesize about 10 times more AdhE protein than aerobically grown cells (8). In AdhE<sup>A267T/E568K</sup>, coimmunoprecipitation experiments showed a clear association with DnaK even when cells were grown anaerobically. This association increased almost 2-fold when the cells were grown aerobically, whether on glucose or ethanol. Consistent results were obtained when anti-DnaK antibodies were first used for the precipitation, and the amount of AdhE associated with the precipitate was determined subsequently (data not shown). As a control we used cell extracts from an *adhE*-null mutant strain. No significant coimmunoprecipitation of AdhE and DnaK was observed (data not shown). The results collectively indicate that (i) MCO damage of both wild-type and mutant AdhE molecules



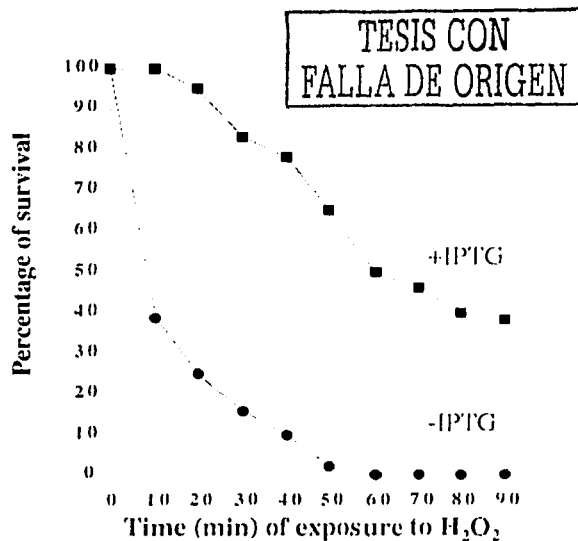
**Fig. 3.** Coimmunoprecipitation of AdhE with DnaK in crude extracts of cells grown under different culture conditions. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-AdhE antibodies as described in *Materials and Methods*. The precipitated fraction was subjected to SDS/PAGE, and the amount of DnaK present in this fraction (i.e., coimmunoprecipitating with AdhE) was determined by Western blotting with anti-DnaK antibodies. (A) Western blot with anti-DnaK antibodies on cell extracts immunoprecipitated with anti-AdhE antibodies. In order from top to bottom, the samples were from strain ECL4000 (AdhE<sup>-</sup>) grown on glucose anaerobically (-O<sub>2</sub>) or aerobically (+O<sub>2</sub>), strain JE52 (AdhE<sup>A267T/E568K</sup>) grown on glucose anaerobically (-O<sub>2</sub>) or aerobically (+O<sub>2</sub>), and strain JE52 grown on ethanol anaerobically. (B) Densitometry analysis of the Western blot. One arbitrary unit corresponds to the intensity of the signal given by the sample from wild-type cells grown under anaerobic conditions.

is correlated with increased attraction for DnaK, and (ii) even undamaged AdhE<sup>A267T/E568K</sup> significantly attracts DnaK.

**Cell Viability During Oxidative Stress in the Presence or Absence of DnaK.** Because it seems unlikely that the protection by DnaK against MCO is limited to AdhE (see also Fig. 2B), we tested the importance of DnaK to cell survival when exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cultures of JM1801 cells (*P<sub>trcA</sub>/dnaKJ/ΔdnaKJ*) were grown aerobically in the presence or absence of IPTG and then challenged with 8.8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As shown in Fig. 4, cells induced in DnaK were more resistant than those that were not. Because aerobic growth on glucose does not require AdhE activity, the results indicate that DnaK plays a broad protective role against protein oxidation, although a role of shielding other macromolecular targets is not excluded.

## Discussion

DnaK (Hsp70) has been regarded as a molecular chaperone that facilitates protein folding as well as assembly and disassembly of oligomeric protein complexes (26). The function of DnaK seems to be vital because its homologues have been found in all organisms. Biochemical data implicate the Hsp70 family of proteins in an even wider range of functions, including initiation of replication of bacteriophage  $\lambda$  DNA, protein secretion, clathrin uncoating followed by lysosomal protein degradation, and nascent peptide protection (17). Genetic evidence indicates that the Hsp70 proteins are important for cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *E. coli*, especially under stressful conditions such as high temperature (26). The heat shock modulon significantly is also turned on by several kinds of oxidative stress (27–29). Chaperones preferentially bind stretches of hydrophobic amino acids that are usually buried in folded mature proteins. The inaccessibility of the buried regions in part accounts for the failure of DnaK to bind efficiently to most functional proteins.



**Fig. 4.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity of JM1801 (*P<sub>trcA</sub>/dnaKJ*) cells induced or not induced in DnaK. Exponential cultures growing aerobically on glucose and casein amino acid hydrolysate were exposed to 8.8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and cell survival was monitored at various times. Each point is a mean value based on determination of four independent culture suspensions. Error bars indicate SD.

Some mature proteins, however, do bind DnaK, and a correlation exists between the weak affinity of these proteins for DnaK and their lack of affinity for hydrophobic-interaction chromatography adsorbents. This correlation is consistent with the idea that DnaK interacts with the exposed hydrophobic groups of the substrate proteins (15).

Five salient findings stand out from the present study. (i) DnaK has a protective effect on AdhE activity under aerobic but not anaerobic conditions. (ii) Under anaerobic conditions, AdhE<sup>A267T/E568K</sup> interacts more extensively with DnaK than does AdhE, even though a protective effect was not observed. (iii) AdhE<sup>A267T/E568K</sup> not only is more sensitive than AdhE to MCO inactivation [as reported for the purified enzymes (12)] but also is more dependent on DnaK stabilization than the wild-type enzyme. (iv) DnaK does not protect against degradation of the AdhE protein after its MCO inactivation. (v) Most importantly, DnaK protects a broad spectrum of proteins against irreversible oxidative damage.

A simple unifying working hypothesis for DnaK protection of AdhE against irreversible MCO damages can be described as follows: (i) A minor fraction of AdhE exists in a partially unraveled conformation that exposes its DnaK-binding domains, a conformation that also renders the protein vulnerable to MCO during aerobic metabolism. (ii) The fraction of the unraveled protein, magnified in AdhE<sup>A267T/E568K</sup>, increases with temperature. (iii) DnaK counteracts the heat- or mutation-induced unraveling of AdhE and AdhE<sup>A267T/E568K</sup> by recognizing the exposed binding sites and driving their conformation back into the properly folded form at the expense of energy derived from ATP. Such a model would collaterally link the heat-chaperone role of DnaK with its protective role of proteins against MCO and may apply to many other cellular proteins as well. Unfortunately, because mutants lacking DnaK are temperature-sensitive for growth, protection of heat denaturation of AdhE by the chaperone cannot be readily tested. The proposed model may have to be revised or elaborated as more information becomes available. For instance, it is possible that the oxidation

of a single subunit of the multimer (oligomer or spirosome) attracts DnaK to protect the rest of the subunits.

Studies in the literature on protective mechanisms against oxidative damage have been heavily focused on induction of enzymes that catalytically destroy reactive oxygen species. Although such defense systems can be built up rapidly, the protection conferred can never be complete, and the covalent damages inflicted are irreversible (with the exception of oxidized methionine or disulfide bridge formation). Therefore, it should not be surprising that a supplemental chaperone defense mechanism has also evolved. We have reported that AdhE and DnaK in *E. coli* are two of the proteins most prone to be damaged by MCO, as indicated by their carbonyl content (10, 11). It is tempting to speculate that the physical interaction of DnaK with its protein substrate renders the chaperone itself vulnerable, particularly if metal ions are present locally (30). Because many proteins have acquired multiple functions during the course of evolution, it is conceivable that during the transitions from dark anaerobiosis to photosynthetic life and then to aerobic metabolism, DnaK has expanded its role from preventing thermal denaturation and aggregation of proteins to include their protection against oxidative damage. It is also possible that in each of these roles, DnaK is partnered with a different set of other proteins. In this regard, we have tested a *clpB* mutant strain and observed that ClpB is dispensable for the aerobic AdhE activity (data not shown).

Our studies have also revealed an unexpected aspect of biochemical evolution. DnaK enabled AdhE<sup>A267T</sup> and AdhE<sup>A267T/E268S</sup> to realize their acquired potential function. This is not a unique example. Recruitment of the mutated fermentative 1-1,2-propanediol:NAID<sup>+</sup> 1-oxidoreductase of *E. coli* (encoded by *hucO*) for aerobic utilization of propanediol (ref. 31 and references therein) also required DnaK (J.M.-H., unpublished data). Similarly, Hse66 (a DnaK homologue encoded by *hucI*) was reported to be necessary for protecting the

dehydrogenase responsible for the acquired ability of a *Pseudomonas aeruginosa* mutant to grow aerobically on ethanol and other short-chain alcohols (32). When we checked whether the Hse66 homologue in *E. coli* has a safeguarding role for wild-type and mutant AdhE proteins against oxidative inactivation, no effect was found (data not shown).

All three examples illustrate the importance of bracing the transitional structures during the selection before they can be stabilized by additional amino acid substitutions. Chaperone systems therefore can widen the evolutionary opportunity for proteins to acquire novel functions. The protection against MCO by chaperones may have implications in eukaryotic biology as well. For instance, indirect evidence relates the production of free radicals and aging with the presence of Hsp70 (the DnaK homologue). The induction of *hsp70* expression is reduced to approximately 50% with age in a variety of tissues from rats, as well as mononuclear cells from human subjects (33). Studies in *Drosophila* showed that the expression of *hsp70* decreases with aging and that the lack of Hsp70 is correlated with increased accumulation of damaged proteins (34).

We thank Dr. B. Bukau and P. Blum for the kind gifts of strains used in this study. This work was supported by Grants J33369-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) and IN205200 from the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Universidad Nacional Autónoma de México (to J.M.-H.); PI97-1456 from the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica and the Comissionat per Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya and Ajuntament de Lleida, Spain (to J.R.); and GM40993 from the National Institute of General Medical Sciences, National Institutes of Health, U.S. Public Health Service (to E.C.C.L.). P.E. is a recipient of a Ph.D. scholarship from the Ministerio de Educación y Cultura (Spain). J.T. is a recipient of a postdoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (Spain). J.M.-H. acknowledges technical support from Marisela Aguirre-Ramírez and M. Paéz-Silva.

- Cunningham, P. R. & Clark, D. P. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **205**, 487-493.
- Goodlove, P. E., Cunningham, P. R., Parker, J. & Clark, D. P. (1989) *Gene* **85**, 209-214.
- Kessler, D., Herth, W. & Knappe, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18073-18079.
- Kessler, D., Fehreicht, I. & Knappe, J. (1991) *FEBS Lett.* **281**, 59-63.
- Matayoshi, S., Oda, H. & Sarau, G. (1989) *J. Gen. Microbiol.* **135**, 525-529.
- Knappe, J. & Sawers, G. (1990) *FEMS Microbiol. Rev.* **4**, 383-398.
- Clark, D. P. & Cronan, J. E. (1980) *J. Bacteriol.* **144**, 179-184.
- Chen, Y. M. & Lin, E. C. C. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 8009-8013.
- Leonado, M. R., Cunningham, P. R. & Clark, D. P. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 870-878.
- Cabisco, E. L., Aguilar, J. & Ros, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6592-6597.
- Amari, E., Cabisco, E. & Ros, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3027-3032.
- Membrillo-Hernández, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J. & Lin, E. C. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33869-33875.
- Holland-Staley, C. A., Lee, K., Clark, D. P. & Cunningham, P. R. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 6039-6054.
- Rudiger, S., Germeroth, E., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1997) *EMBO J.* **16**, 1501-1507.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Röder, S., Langen, H. & Bukau, B. (1999) *EMBO J.* **18**, 6934-6949.
- Ussalaban, M. J. (1976) *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555.
- Denoncin, F., Schulze Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. & Bukau, B. (1999) *Nature (London)* **400**, 693-697.
- Bukau, B. & Walker, G. C. (1990) *EMBO J.* **9**, 4027-4036.
- Pack, K.-H. & Walker, G. C. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 283-290.
- Rockbrand, D., Liveis, K., Austin, T., Kaiser, R., Debra, J., Burgess, R. & Blum, P. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 846-854.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- Membrillo-Hernández, J. & Lin, E. C. C. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 7571-7579.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Schacter, E. (1994) *Methods Enzymol.* **233**, 346-357.
- Ruch, F. E., Lin, E. C. C., Kowitz, J. D., Tang, C.-T. & Goldberg, A. L. (1980) *J. Bacteriol.* **141**, 1077-1085.
- Chevalier, M., Lin, E. C. C. & Levine, R. L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 40-46.
- Bukau, B. & Walker, G. C. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 2337-2346.
- Estruch, F. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 469-486.
- Pappolla, M. A., Sos, M., Omar, R. A. & Sambamurti, K. (1996) *Mol. Chem. Neurobiol.* **28**, 21-34.
- Dukan, S. & Nystrom, T. (1998) *Genes Dev.* **12**, 3431-3441.
- Dean, R. T., Gieseg, S. & Davies, M. J. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 437-441.
- Lin, Z., Cabisco, E., Obradors, N., Tamarit, J., Ros, J., Aguilar, J. & Lin, E. C. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8308-8316.
- Campos-García, J., Ordoñez, L. G. & Soberón-Chávez, G. (2000) *Microbiology* **146**, 1429-1435.
- Heydari, A. R., Wu, B., Takahashi, R., Strong, R. & Richardson A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2909-2918.
- Wheeler, J., Bieschke, E. T. & Tower, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10408-10412.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

6