

0308/

11
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**IDENTIFICACION DE FACTORES
HOMOLOGOS A SIGMA 32 Y
ANALISIS COMPARATIVO DE LA
REGION PROMOTORA DEL
GENE *rpoH* EN LAS BACTERIAS
ENTERICAS**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

presenta

JESUS RAMIREZ SANTOS

Cd Universitaria

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

**Dedico este trabajo a mis hijos Jesús Fernando y Sebastian, y a mi
esposa M. Carmen**

A mi familia Ramírez-Santos y sus agregados.

Agradecimientos:

Mis agradecimientos más profundos a la Dra. M. Carmen Gómez Eichelmann por haberme dado la oportunidad de mirar más allá, por todo su apoyo, por su confianza, por sus enseñanzas pero sobre todo por su paciencia conmigo.

A los miembros del jurado por la lectura y corrección de este trabajo: Dra. Ma. Elena Alvarez, Dra. M. Carmen Gómez, Dra. Rosa Laura Camarena, Dra. Gloria Soberón, Dr. Jesús Aguirre, Dr. Roberto Coria, y Dr. Lorenzo Segovia.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio, y del Instituto de Investigaciones Biomédicas: Rafael Camacho, Teresa Lara, Juan Castro, Judith Hernández, Gloria Solis, Tania del Rio, Alejandra Núñez, Olga Medina y Laura Vargas por sus opiniones y críticas para mejorar constantemente mi trabajo, y porque hicieron aún más agradables las jornadas.

Al equipo pesado del laboratorio de la Dra. M. Carmen Gómez: Don Mike e Irma.

Mis agradecimientos a Jorge Membrillo, Marcela Lizano, Alejandro Padilla, Luis Servin, Araceli Huerta, Julio Collado y Martin García por el apoyo que me brindaron en el momento preciso.

A los artistas del sótano José Avilés y Enrique Vázquez.

A Eva y Bety .

A PADEP por el apoyo 030366.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Universidad Autónoma de México.

GRACIAS AL PUEBLO MEXICANO.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCION	1
I) La respuesta al estrés.	1
II) La respuesta celular al estrés por calor.	3
<i>El efecto del estrés de calor sobre la estructura celular.</i>	
<i>Estímulos diferentes del calor inducen la síntesis de las proteínas de estrés de calor.</i>	
III) La respuesta al estrés por calor en <i>Escherichia coli</i>.	6
<i>El regulón de σ^F de respuesta extracitoplásmica.</i>	
<i>El regulón σ^{32} de respuesta citoplásmica.</i>	
<i>El gene <i>rpoH</i>, regulador transcripcional del regulón σ^{32}.</i>	
IV) La respuesta al estrés por calor en las bacterias.	31
V) EL gene <i>rpoH</i> en otras bacterias y la regulación de su expresión.	35
JUSTIFICACION	42
OBJETIVOS	43
RESULTADOS	44
I. Identificación de factores similares a σ^{32} y del arreglo genético <i>ftsX-rpoH</i> en bacterias entéricas.	
• <i>Identificación de factores similares a σ^{32} en diferentes bacterias entéricas.</i>	
• <i>Identificación del arreglo <i>ftsX-rpoH</i> en diferentes bacterias entéricas.</i>	
II. Conservación de los elementos reguladores en la región promotora del gene <i>rpoH</i> en bacterias entéricas.	
• <i>Comparación de la región reguladora de los genes homólogos de <i>rpoH</i>.</i>	

- *Relación filogenética entre las regiones reguladoras de los genes rpoH*

ANEXOS	46
DISCUSION GENERAL	50
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56

RESUMEN

En las bacterias, la respuesta al estrés por calor (EC) ha sido estudiada principalmente en *Escherichia coli*. En esta bacteria la mayoría de los genes que codifican para las proteínas de EC están reguladas por el factor σ^{32} , codificado por el gene *rpoH*. La región reguladora de *rpoH* contiene cuatro promotores: los promotores P1, P4 y P5 son dependientes de σ^{70} y P3 está regulado por σ^E . Además, contiene dos sitios de unión para CRP, dos sitios para DnaA y un sitio de unión para CytR. El promotor P1 está dentro de la región codificadora y del terminador de la transcripción del operón *ftsYEX*.

La presencia de genes *rpoH* y factores similares a σ^{32} ha sido determinada en algunas especies de las subdivisiones α y γ de las proteobacterias.

En el presente trabajo se identificaron factores similares a σ^{32} en 17 cepas de origen clínico pertenecientes a *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Erwinia* y *Proteus*. La presencia del arreglo genético *ftsX-rpoH* también se identificó en los géneros anteriores, con excepción de *Proteus*.

Los resultados anteriores sugieren que σ^{32} y el arreglo *ftsX-rpoH* podrían estar presentes en todas las bacterias entéricas.

Se realizó la clonación, la secuenciación y el análisis comparativo de la región reguladora de siete genes *rpoH* identificados y tres disponibles en la base de datos del GenBank, de bacterias entéricas. Los resultados muestran la presencia de secuencias similares a los cuatro promotores, a los sitios de unión de las proteínas DnaA, CRP y CytR en las bacterias estrechamente relacionadas a *E. coli* K12: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. En las especies anteriores, se identificó una secuencia similar al sitio de unión para la proteína AraC y el traslape entre el posible terminador de *ftsX* y el promotor P1 de *rpoH*. El traslape también se identificó en *Yersinia enterocolitica*. Secuencias similares a los sitios de unión de proteínas de *E. coli* no se identificaron en *Y. Enterocolitica*, *Erwinia amylovora* y *Proteus mirabilis*.

El análisis comparativo y el estudio filogenético de la región reguladora de *rpoH* de las diferentes bacterias entéricas, sugieren que el patrón de transcripción de este gene varía ligeramente entre las bacterias estrechamente relacionadas a *E. coli* K12; sin embargo, este esquema podría mostrar grandes diferencias en las bacterias evolutivamente más distantes.

ABSTRACT

The regulation of the heat shock response in bacteria has been studied mainly in *Escherichia coli*. In this bacterium, most heat shock genes are under the control of a factor sigma, σ^{32} , encoded by *rpoH*. This gene has four promoters: three σ^{70} promoters, P1, P4 and P5, and P3 controlled by σ^E . In addition, contains two cAMP receptor protein (CRP), two DnaA and one CytR boxes. P1 overlaps the terminator of the cell division *ftsYEX*.

The presence of *rpoH* genes and σ^{32} -like factors has been determined in several species of the α and γ subdivisions of the proteobacteria.

In this work, the presence of σ^{32} -like factors was determined in seventeen strains of the enteric bacteria, including *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Serratia*, *Erwinia* and *Proteus*. The presence of the *ftsX-rpoH* arrangement was detected in the same bacteria with exception *Proteus*.

The results reported here suggest that σ^{32} -like factors and *ftsX-rpoH* arrangement could be present in all enteric bacteria.

The regulatory region of seven *rpoH* homologs was cloned and sequenced, and compared with three sequences from enteric bacteria available on GenBank. Sequences similar to the four promoters, to the boxes DnaA, CRP and CytR present in *E. coli* K12, were identified in sequences of closely related bacteria such as: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. In all these bacteria, an AraC box was also identified and the promoter P1 overlaps a putative *ftsYEX* transcription terminator. This overlap is also present in *Yersinia enterocolitica*. Sequences similar to the regulatory boxes were not identified in *Y. enterocolitica*, *Erwinia amylovora* and *Proteus mirabilis*.

The sequence analysis and phylogenetic study of the *rpoH* regulatory region of different enteric bacteria suggest that the pattern of transcription regulation of this gene varies slightly among bacteria closely related to *E. coli* K12; however, this pattern could show greater differences in the more distant bacteria.

INTRODUCCION

1) LA RESPUESTA AL ESTRÉS.

En un ambiente dinámico los organismos están sujetos a condiciones de estrés (factores bióticos o abióticos que perturban el funcionamiento normal de un sistema biológico de manera potencialmente perjudicial), que estimulan respuestas de tipo adaptativo a largo, mediano y corto plazo. El estado alterado del sistema biológico puede considerarse como un estado de estrés o bajo condición de estrés (un estado de desequilibrio). Las respuestas a este estado comprenden cambios globales a nivel de todo el organismo o célula; aquí se incluyen cambios genéticos, bioquímicos, celulares, histológicos, fisiológicos, y etológicos. Cuando el estímulo de estrés se detecta, el organismo responde con cambios en los procesos metabólicos para ajustarse a las nuevas condiciones. Estos cambios involucran principalmente procesos de síntesis o degradación de moléculas que pueden ocurrir en pocos minutos. Los organismos que responden a los efectos del estrés a través de una recuperación parcial o total, se considera que muestran adaptación; en este caso los organismos restablecen su homeostasis y por lo tanto pueden adquirir una resistencia incrementada al estrés. La resistencia al estrés capacita a los organismos para sobrevivir y reproducirse bajo condiciones adversas.

Las bacterias son capaces de adaptarse a un intervalo amplio de condiciones ambientales para sobrevivir. Generalmente, en los ambientes naturales los nutrientes son limitados, por lo que las bacterias necesitan protegerse hasta que los niveles de nutrientes estén disponibles para crecer y reproducirse. Los

ambientes también varían en su cantidad de agua, en la temperatura o en la concentración de solutos, por lo que las bacterias necesitan ser capaces de ajustarse a la desecación, a los cambios de temperatura y a diferencias en la osmolaridad. La mera sobrevivencia no es suficiente para que las especies prevalezcan, ya que las especies compiten entre sí en un mismo ambiente. La competencia efectiva significa que deben ser capaces de crecer con nutrientes escasos y diferentes compuestos disponibles para usarlos como fuente de carbono y de energía. Las condiciones no solamente pueden variar, sino que pueden cambiar violentamente.

Las bacterias deben ajustar la tasa de síntesis y de degradación de sus constituyentes celulares de manera rápida y coordinada en respuesta a los cambios en las condiciones de crecimiento. Para adaptarse a los efectos producidos por cambios mayores en el ambiente, las bacterias tienen sistemas que detectan estos cambios y responden activando o reprimiendo simultáneamente a grupos específicos de genes. Estos sistemas llamados Sistemas Globales de Regulación (SGR) se componen de genes individuales, operones y regulones. Un regulón es un grupo de genes que codifican para moléculas con funciones diferentes y responden a un regulador común. El regulador generalmente es una proteína que induce o reprime la transcripción de los genes a través de la unión específica en la región reguladora de los genes. Con frecuencia en un SGR, una o más proteínas reguladoras controlan a un gran número de genes individuales, operones y regulones (Snyder y Champness, 1997).

II) LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS POR CALOR.

La temperatura influye en la síntesis, estabilidad y actividad de las enzimas. Los cambios de temperatura con frecuencia tienen efectos sustanciales sobre las constantes de equilibrio de las reacciones bioquímicas, especialmente aquellas involucradas en la formación de uniones químicas no covalentes. Toda la diversidad de estructuras biológicas estabilizadas por uniones químicas débiles comparte una propiedad común de cambio durante su actividad. Por lo tanto, las respuestas a nuevos ambientes térmicos pueden estar acompañadas por cambios mínimos en las estructuras de las proteínas, al menos cuando el cambio de temperatura es pequeño (Somero, 1995).

Cuando las células, desde las bacterias hasta los humanos, son expuestas de manera brusca a temperaturas elevadas o estrés de calor (EC), se induce rápida y transitoriamente la síntesis de un grupo altamente conservado y específico de proteínas conocidas como proteínas de estrés calórico (PEC) (Bukau, 1993; Mager y De Kruijff, 1995). Por ejemplo, en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, que normalmente crece a 25°C, las PEC son inducidas cuando la temperatura aumenta a 29-38°C, dando una respuesta máxima a 36-37°C en 4 minutos (Parsell y Lindquist, 1994). Después de un período de adaptación, la tasa de síntesis de las PEC disminuye y alcanza un nivel nuevo, superior al presente antes del estrés. El nuevo nivel de síntesis de las PEC depende de la temperatura de inducción; mientras mayor sea la diferencia entre la temperatura normal de crecimiento y la temperatura del EC, mayor será el nuevo nivel de síntesis de las PEC (Lindquist, 1986). Cuando las células u organismos retoman a las

temperaturas normales, la síntesis normal de proteínas se recupera gradualmente. En otros organismos, la inducción de las PEC es igualmente rápida, pero la temperatura de inducción máxima varía, ya que esto depende del intervalo de temperatura en el cual los organismos crecen. En organismos que crecen en intervalos amplios de temperatura, la respuesta máxima se alcanza entre 10 y 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento, mientras en organismos que crecen en un intervalo de temperatura restringido, la respuesta máxima ocurre alrededor de 5°C arriba de la temperatura óptima (Lindquist, 1986).

La respuesta universal al EC y la conservación de las PEC sugiere que ambas podrían tener una función general durante el reto celular a temperaturas elevadas.

El efecto del estrés de calor sobre la estructura celular.

Además de la inducción de las PEC, el EC modifica la composición o arreglo de otras estructuras celulares. El estado altamente ordenado y en permanente cambio de la membrana citoplasmática puede hacerla particularmente sensible a los efectos del calor. Se sabe que en las bacterias ocurren cambios en la fluidez de la membrana plasmática debido al reacomodo en la distribución de los ácidos grasos durante el estímulo de calor; efectos similares han sido observados en las membranas de los cloroplastos. En función de la intensidad de estrés de calor también se ven afectadas estructuras subcelulares como el núcleo, la organización de los ribosomas en polisomas y del citoesqueleto (Neumann y Nover, 1991).

Estímulos diferentes del calor inducen la síntesis de las proteínas de estrés por calor.

La resistencia al estrés ambiental puede involucrar mecanismos que son altamente específicos para un tipo de estrés o pueden cubrir varios tipos de estrés y tener una base fisiológica y bioquímica común.

Además del calor, otros estímulos son capaces de inducir la síntesis de todas o algunas de las PEC. Estos estímulos incluyen factores fisico-químicos (pH, cambios en osmolaridad, radiación ultravioleta), sustancias peligrosas para el metabolismo (etanol, metales pesados, antibióticos y sustancias que dañan al DNA) y procesos metabólicos complejos (escases de nutrientes como carbono y nitrógeno, estrés oxidativo e infecciones virales) (Nover, 1991; Bukau, 1993). La inducción de las PEC por estos estímulos varía con respecto a su cinética, a su nivel de inducción y a la especificidad de las PEC que inducen. El inductor más potente de las PEC es el calor mismo; los otros estímulos inducen sólo parcialmente un grupo de éstas proteínas. Las bases bioquímicas de la inducción de esta respuesta por otros estímulos es todavía desconocida, aunque los datos experimentales apoyan la propuesta de que la generación de los cambios en la configuración de las proteínas inducidos por éstos estímulos es la señal que media la respuesta común. Sin embargo, no se excluye que otros componentes celulares (la membrana, ácidos nucleicos y ribosomas), sean las señales para responder al estímulo. Lo anterior sugiere que el incremento en la síntesis de las PEC podría ser un mecanismo general de resistencia a diferentes estímulos (VanBogelen y Neidhardt, 1990; Bukau, 1993; Mager y De Kruijff, 1995).

III) LA RESPUESTA AL ESTRES POR CALOR EN *Escherichia coli*.

La respuesta al EC en las bacterias fue descubierta en *E. coli* en 1978 por los grupos de F. Neidhardt y T. Yura de manera independiente (Lemaux et al. 1978; Yamamori et al. 1978). Ambos grupos observaron el incremento de la síntesis de un grupo pequeño de proteínas ante el incremento de la temperatura. El EC incrementó transitoriamente entre 10 y 20 veces el nivel de este grupo de proteínas, las PEC.

La expresión de las proteínas de EC está regulada a nivel de la transcripción de los genes que codifican a las PEC. En 1975, S. Cooper y R. Ruettinger dieron el primer paso en el descubrimiento de la regulación de la respuesta al EC en *E. coli*. Ellos aislaron una cepa mutante de *E. coli* afectada en la síntesis de una proteína esencial para el crecimiento a temperatura alta (GroE). El análisis posterior de la cepa mostró que la mutación afectó el incremento de la síntesis de muchas proteínas (ahora conocidas como las PEC), después de la inducción con calor; esto indicó que la mutación afectó a un regulador global de la respuesta al EC. La caracterización del gene reveló la secuencia del primer factor sigma alternativo identificado en *E. coli*. Este gene regulador llamado *htpR* y renombrado como *rpoH*, codifica al factor σ^{32} , regulador positivo de la respuesta al EC (Landick et al. 1984; Yura et al. 1984). Este factor dirige la unión e iniciación específica de la RNA polimerasa a los promotores específicos de los genes de EC.

Actualmente se sabe que en *E. coli* el grupo de genes de respuesta al EC conforman el SGR para EC o estimulación de EC. Este SGR está integrado por dos regulones definidos por factores sigma alternativos y que coordinan la expresión

de alrededor de 40 genes dispersos en el cromosoma de *E. coli* y que codifican a las PEC (Tabla 1). El regulón de σ^E regula la respuesta extracitoplásmica y el regulón σ^{32} regula la respuesta citoplásmica (Yura et al. 1993; Gross, 1996). Entre ambos regulones, existe una conexión metabólica que determina una relación de continuidad y coordinación en la respuesta al EC e induce a las PEC (Yura et al. 1993; Gross, 1996).

El regulón de σ^E de respuesta extracitoplásmica.

La existencia del factor σ^E fue propuesta originalmente en los estudios de transcripción del gene *rpoH*. Durante los ensayos de transcripción *in vitro* de *rpoH*, se aisló un factor sigma de 24 kDa el cual permitió la transcripción preferencial del promotor P3 de *rpoH*; este promotor no es reconocido por σ^{70} (Erickson et al. 1987; Erickson y Gross, 1989; Wang y Kaguni, 1989). La respuesta dependiente del regulón σ^E es inducida específicamente por estímulos extracitoplásmicos (espacio periplásmico). La sobreproducción de las proteínas de la membrana externa OmpX, OmpK, OmpC y OmpF, así como de AsnB, PBP2 y DsbD, induce la respuesta dependiente de σ^E (Meccas et al. 1993; Missiakas y Raina, 1998).

Las mutaciones en los genes *dsbA/B/C/D/G*, *surA* y *fkpA*, cuyos productos son requeridos para el plegamiento correcto de las proteínas del periplasma, también incrementan la respuesta dependiente de σ^E (Missiakas et al. 1996; Missiakas y Raina, 1997; Missiakas y Raina, 1998). Otro gene con efecto similar es *htrM*; las mutaciones en este gene resultan en una expresión alterada de los lipopolisacáridos (Missiakas et al. 1996). En cambio, las señales generadas en el

citoplasma con mutantes en *secB*, las cuales no son capaces de transportar a las proteínas precursoras de las OMPs, no son capaces de inducir a σ^E . Por el contrario en estas cepas la actividad de σ^E disminuye (Mecsas et al. 1993).

TABLA 1. LAS PROTEINAS DE ESTRES DE CALOR DE *Escherichia coli* K12.

REGULON σ^{32}		REGULON σ^E
CHAPERONAS	REGULADORES	PROTEASAS
DnaK	HtpY	DegP
DnaJ	σ^{70}	REGULADORES
ClpX	HtrC	σ^E
HtpG	ENZIMAS METABOLICAS	σ^{32}
GrpE	GADPH	RseA
IbpB (HtpE, HslS)	HtrM (RfaD).	RseB
IbpA (HtpN, HslT)	FUNCION DESCONOCIDA	RseC
GroE	HslA	
PROTEASAS	HslC	
Lon	HslK	
ClpP	HtpX	
ClpX	FtsJ	
ClpA	HslO	
ClpB	HslP	
FtsH (HflB)	HslW	
HslV (HtpO)	HslX	
HslU (HtpI)	HslY	
	HslZ	

Tabla modificada de Missiakas et al. 1996.

Las observaciones anteriores muestran que la señal de inducción del regulón σ^E se genera por la acumulación extracitoplásmica de proteínas inmaduras o plegadas anormalmente (Figura 1).

El regulón σ^E de respuesta extracitoplásmica, está formado por al menos 6 genes: *degP*, *rpoE*, *rseA*, *rseB*, *rseC* y *rpoH*; aunque la sobreexpresión de σ^E induce la expresión de por lo menos 10 proteínas (Erickson y Gross, 1989; Lipinska et al. 1989; De las Peñas et al. 1997).

- *El gene degP y la proteasa DegP.*

El gene *degP* está bajo el control exclusivo de σ^E . Este gene es esencial para el crecimiento de *E. coli* a temperaturas superiores a los 40°C. *degP* codifica a la serin-proteasa DegP de 48 kDa, de localización y de actividad periplásmica. Sus sustratos incluyen proteínas periplásmicas anormales (Lipinska et al. 1990).

- *El gene rpoE y la autoregulación positiva del regulón σ^E .*

rpoE es el gene que codifica para el factor σ^{24} o σ^E . Esta proteína de 24 kDa fue denominada σ^{24} por Wang y Kaguni, y σ^E por Erickson y Gross, en 1989. El gene *rpoE* contiene dos promotores reconocidos por factores sigmas diferentes. El promotor proximal P2, tiene los sitios -35 (GAAGTT) y -10 (TCTAA) con una alta homología al promotor P3 de *rpoH* y al promotor de *degP*, los cuales son reconocidos por σ^E (Rouviere et al. 1995) (Tabla 2); por lo tanto *rpoE* se autoregula. La actividad transcripcional de este promotor es muy alta y sostenida durante un reto de temperatura de 30 a 50°C (Raina et al. 1995; Rouviere et al.

1995); este comportamiento explica la actividad del regulón σ^{32} a temperaturas altas. El sitio de inicio de transcripción del promotor P1 no muestra homología clara con los promotores reconocidos por σ^{70} , σ^{32} o σ^E , y tampoco es transcrito por las holoenzimas $E\sigma^{70}$, $E\sigma^{32}$ o $E\sigma^E$. El mRNA proveniente de este promotor disminuye cuando se incrementa la temperatura. Por lo tanto la regulación de *rpoE* a temperaturas elevadas depende solamente de su autoregulación. Es posible que para la transcripción de este promotor, se requiera de elementos adicionales (De las Peñas et al. 1997).

TABLA 2. LAS SECUENCIAS CONSENSO DE LOS PROMOTORES PARA LAS HOLOENZIMAS DE LA RNA POLIMERASA DE *E. coli*.

HOLOENZIMA	SITIO -35	ESPACIADOR	SITIO -10
$E\sigma^{70}$	TTGACA	16-18 pb	TATAAT
$E\sigma^{32}$	CTTGAA	13-15 pb	CCCCATNT
$E\sigma^E$	GAACTT	16 pb	TCTGA

Tabla modificada de Missiakas et al. 1996.

El factor σ^E reconoce específicamente a los promotores de los genes del regulón σ^E . Las secuencias de los sitios -35 y -10 de los promotores reconocidos por este factor son completamente diferentes a las secuencias de los promotores para los demás factores sigma conocidos. El sitio -35 (GAACTT) y el sitio -10 (TCTGA) son reconocidos específicamente por la holoenzima $E\sigma^E$ (Tabla 2) (Erickson y Gross, 1989; Wang y Kaguni, 1989).

- *El operón rpoE rseABC y el mecanismo negativo de regulación del regulón σ^E .*

El análisis de la secuencia y de la transcripción del locus *rpoE* muestra que este gene está organizado en un operón con los genes *rseABC* (de "regulator of sigma E"), que codifican a tres proteínas, de peso molecular pequeño, involucradas en la actividad de σ^E . *rseA* codifica para la proteína RseA de 27 kDa de actividad anti σ^E , de ubicación en membrana interna y con un dominio transmembranal único. El análisis topológico de RseA sugiere que el extremo N-terminal está localizado en el citoplasma y el dominio C-terminal en el periplasma. Se propone que RseA se une directamente a σ^E presente en el citoplasma a través del dominio N-terminal y de esta manera inhibe su actividad transcripcional (Figura 1). La actividad de σ^E también es modulada por el producto de los genes *rseB* y *rseC*. *rseB* codifica a RseB de 33 kDa, una proteína del periplasma que también regula negativamente la actividad de σ^E a través de la interacción específica con el dominio C-terminal de RseA (Figura 1). Por el contrario, RseC es una proteína de 17 kDa de membrana interna que modula positivamente la actividad de σ^E . El mecanismo por el cual RseC ejerce su efecto positivo sobre σ^E aún es desconocido (De la Peñas et al. 1997; Missiakas et al. 1997).

El regulón σ^{32} de respuesta citoplásmica.

Entre los procariontes, en *E. coli* es donde están mejor entendidos los mecanismos que determinan la inducción de las proteínas de EC. En esta bacteria

MEMBRANA EXTERNA

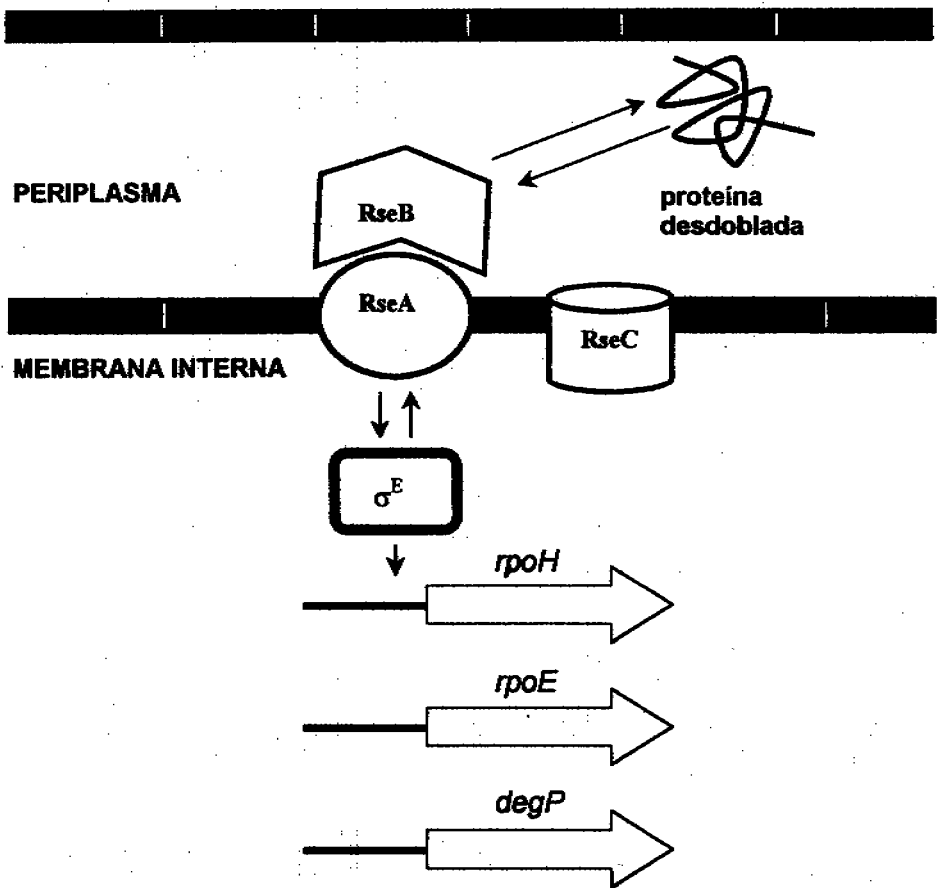


Figura 1. Modelo de regulación del regulón σ^E (Modificado de Connolly et al. 1997).

el regulón de σ^{32} consiste de alrededor de 30 genes, regulados por el factor σ^{32} (Gross, 1996). La capacidad de inducción por el calor de este regulón está basada en el reconocimiento específico de la holoenzima $E\sigma^{32}$ a los promotores de los genes del regulón. Los promotores dependientes de σ^{32} difieren de los demás

promotores en sus regiones -35 y -10; el sitio -35 tiene una secuencia consenso CTTGAA, mientras el sitio -10 tiene el consenso CCCCATNTA (Tabla 2) (Gross, 1996). En ausencia de σ^{32} estos genes no son transcritos a partir de estos promotores ya que no son reconocidos por otro factor sigma; sin embargo, algunos de estos genes, como el operón *groESL* y el gene *grpE* contienen promotores adicionales dependientes de $E\sigma^{70}$, con lo que se asegura su expresión basal independiente de σ^{32} (Parsell y Linquist, 1994). Cabe mencionar que todos los genes de EC tienen una expresión basal bajo condiciones normales de crecimiento celular en virtud de la importancia que revisten las proteínas codificadas por estos genes en la fisiología normal de *E. coli*.

- *Los genes y las proteínas del regulón σ^{32} .*

A través de los métodos de geles de proteínas de doble dimensión y de expresión *in vitro* de fragmentos de todo el genoma de *E. coli* K12 han sido descritos alrededor de 30 loci que codifican a 33 PEC cuya síntesis depende del regulador σ^{32} (Chuang y Blattner, 1993; Gross, 1996). La mayoría de estas proteínas pertenece al grupo de las proteínas conocidas como chaperonas moleculares y al grupo de las proteasas. Las chaperonas moleculares se definen como proteínas que interaccionan de manera transitoria y no covalente con otras proteínas. Su función es la de estabilizar a los péptidos salientes de los ribosomas, translocar a algunas proteínas, mediar el ensamble correcto entre polipéptidos, prevenir la agregación y desagregar las proteínas bajo condiciones de estrés y presentar a algunas proteínas sustrato a las proteasas (Hendrick y Hartl, 1993;

Becker y Craig, 1994). Otras PEC son proteínas reguladoras, enzimas metabólicas y varias de ellas son de función desconocida. Los genes de este regulón están distribuidos en el cromosoma bacteriano como genes individuales u operones.

Debido a la función celular que desempeñan en conjunto algunas de estas proteínas, en este trabajo, se describen como grupos protéicos.

➤ *Los genes dnaK, dnaJ y grpE y el grupo las chaperonas DnaK, DnaJ y la proteína GrpE.*

El operón *dnaKJ* codifica a las chaperonas DnaK de 70 kDa y DnaJ de 41 kDa. DnaK es un miembro de la familia Hsp70, la cual es una familia de proteínas de EC ampliamente conservada entre los organismos (Gross, 1996; Liberek et al. 1991). Aunque originalmente DnaK se identificó como una proteína requerida para la replicación del fago λ y del cromosoma de *E. coli*, se sabe que también participa en la replicación del fago P1, el plegamiento correcto de proteínas y la modulación de la proteólisis (Gross, 1996; Liberek et al. 1991). DnaK tiene una actividad débil de ATPasa dependiente de potasio, en ausencia o presencia de sustratos protéicos, y es capaz de autofosforilarse en el residuo de treonina 199 (McCarty y Walker, 1991; Buchberger et al. 1994). La actividad de ATPasa de DnaK está regulada por sus co-chaperonas DnaJ y GrpE, así como por sus sustratos (Liberek et al. 1991).

DnaK y todos los miembros de la familia Hsp70 contienen tres dominios. El dominio amino terminal, de cerca de 40 kDa, contiene el sitio de unión para ATP, magnesio y GrpE. El dominio carboxilo proximal de 25 kDa contiene el sitio de

unión al péptido sustrato y el dominio carboxilo distal podría incluir el sitio de unión a DnaJ (Buchberder et al. 1994). Los resultados recientes muestran que DnaK se une fuertemente con los aminoácidos (aa) hidrofóbicos como isoleucina, leucina, valina y fenilalanina (Richarme y Kohiyama, 1993). Funcionalmente, se propone que el cambio conformacional dependiente de ATP en el dominio N-terminal induce cambios conformacionales en el sitio de unión del péptido sustrato y subsecuentemente causa la liberación del mismo.

La proteína DnaJ pertenece a la familia de las chaperonas conocida como Hsp40. DnaJ funciona como dímero e interacciona con DnaK a través del extremo N-terminal y como consecuencia acelera la actividad de ATPasa de DnaK e induce cambios conformacionales que estabilizan el complejo péptido sustrato y DnaK (Szypersky et al. 1994; Gross, 1996).

El gene *grpE* codifica a la proteína GrpE de alrededor de 23 kDa. Esta proteína actúa como dímero e interacciona con el dominio N-terminal de DnaK. Se propone que GrpE funciona como un intercambiador de los nucleótidos (ADP → ATP) unidos a DnaK al incrementar la afinidad de DnaK por magnesio (Zylicz y Georgopoulos, 1987; Skowyra y Wickner, 1995).

El grupo de las chaperonas DnaK, DnaJ y de la proteína GrpE tiene como función principal el plegamiento de proteínas mediante ciclos de unión y liberación de las proteínas sustrato. El modelo actual propone primero, la unión de la proteína sustrato a DnaJ. De esta manera el sustrato es presentado a DnaK-ATP para formar el complejo DnaJ-proteína sustrato-DnaK-ATP. El contacto de DnaJ con DnaK-ATP promueve la hidrólisis del ATP e induce que el sustrato se una con

mayor afinidad a la forma DnaK-ADP. GrpE cataliza la disociación del ADP unido a DnaK y permite la unión de ATP. Esto último, induce un estado de baja afinidad de DnaK y la disociación del péptido sustrato y de GrpE de DnaK. El sustrato liberado puede volver al ciclo con este sistema de proteínas o puede ser captado por el equipo de las chaperoninas GroEL-GroES (Frydman y Hartl, 1994; Gross, 1996).

➤ *El operón groESL y la chaperonina GroEL, y la co-chaperonina GroES.*

El operón *groESL* codifica a las proteínas GroEL y GroES. Este operón es transcrito también a partir de un promotor tipo σ^{70} . GroEL (de "growth E larger"), pertenece a la familia Hsp60 o familia de las chaperoninas, la cual está ampliamente conservada en los organismos. GroEL es una proteína de aproximadamente 60 kDa en su forma monomérica con actividad de ATPasa y que funcionalmente actúa como una proteína oligomérica. La forma oligomérica de GroEL está compuesta de dos anillos de siete subunidades cada uno en un arreglo espalda con espalda. Los estudios de cristalografía de rayos X de GroEL de *E. coli* muestran que la proteína tiene una estructura cilíndrica abierta de 137 Å de diámetro externo, 146 Å de altura y 47 Å de diámetro interno. Además tiene siete ventanas elípticas que conectan el exterior con la cavidad central. Se propone que las ventanas podrían servir para la entrada del ATP y la salida del ADP, así como para proporcionar una extensión mayor de la superficie de contacto con el péptido sustrato (Braig et al. 1994; Hartl, 1994; Schmidt et al. 1994).

El gene *groES* codifica a la proteína GroES (de "growth E smaller"), de masa molecular aproximada de 12 kDa en su forma monomérica. GroES en su forma activa conforma un heptámero con forma de domo con dimensiones aproximadas de 75 Å de diámetro, 30 Å de altura y una cavidad de 8 Å de altura. Los análisis de cristalografía de rayos X muestran que GroES forma una tapadera sobre las aberturas del cilindro formado por GroEL en un complejo GroEL₁₄-GroES₇-ADP₇. El complejo GroEL-GroES está mediado por una asa móvil de 16 aa de cada subunidad de GroES que se inmoviliza cuando el heptámero se une a GroEL. Los análisis de microscopía electrónica muestran que la unión de una tapadera de GroES al cilindro de GroEL induce cambios conformacionales que incrementan el volumen de la cavidad central aproximadamente dos veces: de 47 a 90 Å (Frydman et al. 1994; Hunt et al. 1996).

De manera breve, se propone que el mecanismo de acción de la chaperonina GroEL y su co-chaperona GroES inicia con la unión del péptido sustrato al complejo GroEL₁₄-GroES₇. La unión del péptido sustrato ocurre en el anillo de GroEL opuesto al ocupado por GroES. La unión del sustrato induce la disociación de GroES. Nuevamente un heptámero de GroES y siete moléculas de ATP se une a cualquiera de los anillos de GroE y el péptido sustrato es encerrado dentro de la cavidad de GroEL para ser plegado correctamente o pasar a un estado comprometido (estado de transición hacia un estado de plegado correcto). El péptido plegado o en estado comprometido emerge de la cavidad después de la disociación de la tapa de GroES estimulada por la hidrólisis del ATP en el anillo opuesto de GroEL. Generalmente el estado nativo de una proteína se alcanza después de varios ciclos de unión y liberación en el complejo GroEL-GroES

(Martin et al. 1993; Lin y Einsenstein, 1996; Mayhew et al. 1996; Murai et al. 1996; Roseman et al. 1996; Weissman et al. 1996).

➤ *htpG* y la chaperona HtpG.

En 1987, Bardwell y Craig identificaron al gene *htpG* de *E. coli* que codifica a la chaperona HtpG. Esta proteína es homóloga a la Hsp90 de los eucariontes. La pérdida de este gene no afecta el crecimiento de la bacteria excepto a temperaturas muy altas. Posiblemente HtpG es dispensable a temperaturas medias debido a que otras chaperonas pueden sustituirla, excepto a temperaturas muy elevadas cuando la función de las chaperonas podría ser limitada. La sobreproducción de la proteína es capaz de suprimir los defectos de exportación de proteínas en mutantes *secY* (Ueguchi y Ito, 1992). El gene *secY* codifica a la proteína SecY de membrana, la cual transloca proteínas hacia el espacio periplásmico (Hartl et al. 1990).

➤ El operón *ibpAB*.

El operón *ibpAB* codifica a las proteínas IbpA de 16.3 kDa y IbpB de 15.8 kDa, respectivamente (Chuang et al. 1993). Ambas proteínas se identificaron asociadas a los cuerpos de inclusión que se forman al sobreproducir proteínas heterólogas (Allen et al. 1992). Estas proteínas se incluyen en el grupo de proteínas heterogeneas conocidas como las proteínas de EC pequeñas. Varias proteínas de este grupo funcionan como chaperonas en eucariontes (Jakob y Buchner, 1994).

➤ Los genes *clp* y la familia de las proteasas Clp.

Los genes *clp*, llamados así originalmente por la capacidad de sus productos para degradar caseína, codifican a una familia altamente conservada de proteasas dependientes de ATP. Esta familia de proteínas tiene una composición bipartita ya que en su forma activa están formadas por dos tipos de subunidades: un tipo de subunidad reconoce al sustrato y el otro tipo lo degrada (Gottesman y Maurizi, 1992). El operón *clpP clpX* codifica para las proteínas ClpP y ClpX de 24 y 46 kDa, respectivamente (Wojkowiak et al. 1993). ClpP forma dos anillos hexaméricos que pueden ser activos independientemente de ATP en la degradación de péptidos pequeños (Maurizi, 1992). En conjunción con ClpX, ClpP hidroliza a la proteína λ O de manera dependiente de ATP (Wojkowiak et al. 1993). Wawrzynow y col. en 1995 mostraron en ensayos *in vitro* que ClpX puede funcionar como una chaperona ya que protege de la agregación y disocia agregados de λ O inducidos por calor. También, la actividad de ATPasa de ClpX se estimula en presencia de λ O y se une mejor a luciferasa desnaturalizada que a su forma nativa.

El gene *clpA* codifica a la proteína ClpA de 87 kDa. Como chaperona ClpA disocia dímeros de RepA del fago P1 y protege a la luciferasa de agregación inducida por calor en ausencia de ATP, pero no puede disociar sus agregados. Sin embargo, en su forma bipartita, ClpP₁₂-ClpA₇, degrada específicamente a RepA de P1 y a caseína de manera dependiente de ATP (Maurizi, 1992).

El gene *clpB* codifica a un mRNA con dos sitios de inicio de traducción y por lo tanto codifica a dos proteínas ClpB, de 93 y de 79 kDa, respectivamente (Kim et al. 1998). No es claro si ClpB funciona como una proteasa o chaperona y tampoco ha sido mostrado que se asocie a ClpA. Esta proteína es similar a la Hsp104 de

Saccharomyces cerevisiae, la cual protege a las células de la muerte por calor (Lindquist y Kim, 1996). Las células de *E. coli* que carecen de ClpB crecen más lento a temperaturas altas y mueren más rápido a 50°C (Squires et al. 1991).

➤ *El gene lon y la proteasa Lon.*

El gene *lon* se identificó primero por el fenotipo de su mutación. Las células de *E. coli lon* son sensibles a la luz ultravioleta y de consistencia mucoide. Este gene codifica para la serin-proteasa Lon de 87 kDa con actividad de ATPasa estimulada por las proteínas sustrato; su forma nativa es un homotetrámero de aproximadamente 450 kDa. *In vitro*, Lon degrada un gran número de proteínas desnaturalizadas. *In vivo*, Lon participa en la degradación de proteínas canavanil, péptidos puromicil, varias proteínas mutadas y varias proteínas de inestabilidad natural. Todas las proteínas que degrada Lon pueden ser degradadas por otras proteasas a la misma tasa de degradación; sin embargo, Lon degrada a SulA, RcsA, y a la proteína N (proteínas inestables), diez veces más rápido que otras proteasas. Entonces, la tasa de degradación de Lon sobre las proteínas inestables es mucho mayor que sobre las proteínas anormales (Maurizi, 1992).

➤ *El gene ftsH y la proteasa FtsH.*

El gene *ftsH* (de "filamentation temperature sensitive") es idéntico al gene *hflB*; codifica a la proteína integral de membrana interna FtsH de 70.7 kDa, dependiente de ATP (Tomoyasu et al. 1995). Esta proteína pertenece a la familia de ATPasas conocidas como la familia AAA (de "ATPases associated to a variety of cellular activities"), la cual es ampliamente distribuida entre las arqueas, bacterias y

eucariontes (Confalonieri y Duguet, 1995). Se sugiere que la proteína FtsH participa en varios procesos celulares que incluyen el ensamble de proteínas en la membrana y la exportación de proteínas. Sin embargo, recientemente se ha propuesto su participación en la degradación específica de las proteínas reguladoras CII y CIII del bacteriófago λ y el factor σ^{32} (Tomoyasu et al. 1995; Herman et al, 1997).

➤ *El operón hslV hslU.*

El gene *hslV* codifica para la proteína HslV de 19 kDa, una proteína homóloga a las subunidades tipo β del proteasoma 20S de eucariontes, de algunas bacterias y arqueas. *hslU* codifica a una proteína de 50 kDa que tiene una identidad de 50% con la proteína ClpX. Estas dos proteínas funcionan juntas como una proteasa de dos componentes dependiente de ATP. Los estudios *in vitro* con proteínas puras muestran que HslU tiene actividad de ATPasa, mientras HslV tiene actividad de peptidasa. *In vitro* la proteasa HslVU degrada péptidos hidrofóbicos, la cadena B de la insulina, caseína y lactoglobulina carboximetilada. La tasa máxima de degradación se alcanza cuando la relación molar de HslV y HslU es de 1:4. HslV se comporta como un oligómero de 250 kDa, mientras HslU se comporta como una proteína de 450 kDa. *In vivo*, la sobreproducción de HslU y HslV disminuye significativamente la expresión de las PECs en una cepa silvestre y en una mutante *htrC* (Missiakas et al. 1996; Yoo et al. 1996).

➤ *El gene rpoD.*

El gene *rpoD* codifica para el factor σ^{70} ; este factor sigma reconoce a los promotores de los genes involucrados en la mayoría de las funciones celulares durante el crecimiento exponencial de *E. coli*. El análisis de cerca de 300 promotores reconocidos por σ^{70} muestra que sus sitios -35 y -10 tienen las secuencias consenso TTGACA y TATAAT, respectivamente (Tabla 2) (Record et al. 1996).

➤ *El gene htpY*

El gene *htpY* se localiza a 700 pb del extremo 3' del operón *dnaK dnaJ* y codifica para una proteína de 21 kDa. El producto de *htpY* muestra una regulación positiva sobre la expresión de los genes de EC. En mutantes nulas de *htpY* disminuye la expresión de las PECs dependientes de σ^{32} y de DegP que depende de σ^E , y la sobreexpresión de *htpY* induce la expresión elevada de los genes de EC. Es posible que este efecto se deba a la reducción, o a la alteración en el nivel o la actividad de σ^{32} en la mutante *htpY* (Missiakas et al. 1993)

➤ *El gene htrC.*

El gene *htrC* está bajo la regulación del EC y solamente se transcribe en presencia de σ^{32} , codifica para la proteína básica HtrC de 21 kDa. HtrC es dispensable a temperaturas inferiores a 30°C pero es esencial para el crecimiento bacteriano a temperaturas superiores a 42°C. Las mutantes nulas *htrC* muestran varios defectos fenotípicos tales como una extensiva filamentación a 37°C y 42°C, lisis celular a temperaturas superiores a 42°C, defectos en la proteólisis celular,

sobreproducción constitutiva de de las PEC dependientes de σ^{32} a todas las temperaturas, así como la disminución e incremento de varias proteínas. Se propone que HtrC podría ser un activador o un modulador negativo directo o indirecto de la expresión de otros genes (Raina y Georgopoulos, 1990).

El gene *rpoH*, regulador transcripcional del regulón σ^{32} .

El gene *rpoH* codifica a la proteína de 32 kDa conocida como factor σ^{32} , la subunidad de la RNA polimerasa encargada de reconocer a los promotores del regulón σ^{32} . El nivel de expresión de los genes de EC depende de la cantidad disponible de σ^{32} , por lo que durante la respuesta al EC hay un aumento rápido y transitorio en los niveles de actividad de σ^{32} . Este incremento se debe principalmente a un incremento en la traducción y estabilidad del mRNA de *rpoH*, así como un incremento en la vida media de esta proteína (Strauss et al. 1987; Gross, 1996).

- *Regulación de la traducción del mRNA de *rpoH*.*

Durante la respuesta al EC a 42°C el incremento en la síntesis de mRNA de *rpoH* es solamente de 2 ó 3 veces y el incremento en la concentración del mismo mRNA va de 5 a 8 veces; sin embargo la actividad y el nivel de σ^{32} se incrementa en los primeros minutos hasta 15 veces (Erickson et al. 1987). Este incremento se debe principalmente a la termoregulación a nivel traduccional del mRNA de *rpoH* y a un incremento en la vida media σ^{32} . Los estudios de la síntesis de la proteína de

fusión σ^{32} - β -galactosidasa provenientes de la fusión de los genes *rpoH-lacZ* en condiciones normales y durante EC, sugieren que la estructura del mRNA de *rpoH* es importante para el control traduccional de la síntesis de σ^{32} (Nagai et al. 1991). El análisis de la estructura secundaria del mRNA, sugirió dos regiones proximales involucradas en la represión de la traducción bajo condiciones normales y en la inducción durante del EC. La primera región llamada A, corresponde a los nucleótidos 6 a 20 de la región codificadora; esta región actúa como un elemento potenciador de la traducción (Figura 2). El mecanismo propuesto es a través de la interacción de A con una región complementaria al rRNA 16S. La región B, del nucleótido 153 al 247 es un elemento negativo el cual forma una estructura secundaria con la región A (Figura 2). La eliminación parcial o total de B estimula la traducción del mRNA de *rpoH* a temperaturas bajas (Nagai et al. 1991; Yusawa et al. 1993). El modelo actual propone que el apareamiento entre bases de la región A y la región B es importante en la termoregulación traduccional del mRNA de *rpoH*. Una tercera región o región C de los nucleótidos 364 a 433 reprime la traducción del mensajero de *rpoH*. Los estudios con mutantes por corrimiento de mensaje que alteran la secuencia de aminoácidos de este fragmento y que eliminan la represión, sugieren que proteínas como DnaK podrían unirse al péptido emergente del ribosoma y de esta manera reprimir la síntesis de σ^{32} directa o indirectamente (Nagai et al. 1994; Missiakas et al. 1996).

- Estabilidad de σ^{32} .

El factor σ^{32} es una de las proteínas más inestables de *E. coli*; su vida media de 30 a 42°C es de 45 a 60 segundos. La vida media de esta proteína se incrementa hasta 8 minutos durante estímulos superiores a 42°C e inferiores a 22°C (Strauss et al. 1987); sin embargo, el aumento en la estabilidad es por un periodo corto de tiempo ya que la vida media es restaurada poco tiempo después del incremento de la temperatura. En células mutantes *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* o *ftsH* la vida media de σ^{32} se estabiliza a cualquier temperatura, lo cual sugiere que los cuatro productos de estos genes participan directa o indirectamente en la degradación de σ^{32} (ver más adelante).

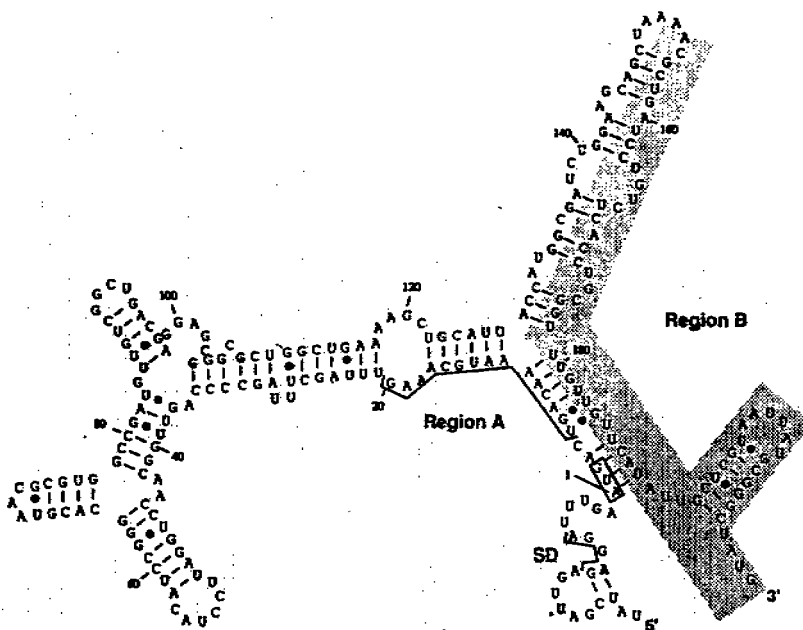


Figura 2. Modelo de la estructura secundaria de la región 5' del mRNA de *rpoH*. La región A está subrayada y la región B está sombreada; el codón de inicio de la traducción está encerrado en un rectángulo; SD: (secuencia Shine-Dalgarno), secuencia de unión al ribosoma (Nagai et al. 1991).

- *Regulación de la transcripción de rpoH.*

La región reguladora de *rpoH* de aproximadamente 250 pb contiene al menos 4 promotores. Los experimentos sobre la transcripción de *rpoH* muestran que los promotores P1, P4 y P5 son reconocidos por el factor σ^{70} , mientras que el promotor P3 es reconocido por el factor σ^E (Figura 3). Bajo condiciones normales de crecimiento de *E. coli* (30°C), la transcripción de *rpoH* inicia principalmente (en un 90%), de los promotores P1 y P4. El promotor P1 es el más distante y el inicio de su transcripción está a -221 pb hacia el extremo 5' del inicio de la traducción. Sus sitios -35 y -10 están dentro de la región codificadora y dentro del terminador de transcripción del operón *ftsYEX* de división celular (Figura 3). La transcripción del promotor P4 inicia a -82 ó -83 pb del inicio de traducción del mRNA. Cuando la temperatura se incrementa a 43.5°C, la transcripción a partir de los promotores P1 y P4 se incrementa ligeramente y la de promotor P3 se hace evidente. A temperaturas extremas como 50°C, la transcripción de los promotores P1 y P4 disminuye gradualmente y la transcripción del P3 se incrementa y persiste por lo menos por 85 minutos. La transcripción del promotor P3 inicia a -88 pb del inicio de traducción del mRNA (Erickson et al.1987; Gross, 1996).

En la cepa SC122, el inicio de la transcripción a -133 pb del inicio de traducción, sugiere la presencia de un promotor P2, específico de esta cepa (Erickson et al.1987).

El promotor P5 es un promotor débil sujeto a represión catabólica que inicia su transcripción a -61 pb del inicio de traducción; su expresión depende de la ausencia o escasez de glucosa en el medio de crecimiento. La transcripción a

partir del P5 depende de la unión específica del complejo CRP-cAMP (de "cAMP receptor protein-cyclic AMP") al sitio CRP1, en el extremo 5' del promotor (Figura 3). La presencia de glucosa inhibe la síntesis cAMP e induce la salida del cAMP del citoplasma y por consecuencia disminuye la concentración del complejo CRP-cAMP. La proteína CRP solamente puede unirse a sus sitios en presencia de cAMP. En ausencia de glucosa en el medio, se incrementa la concentración de cAMP celular y la transcripción a partir del promotor P5 de *E. coli* aumenta de 2 a 3 veces (Nagai et al. 1990); sin embargo, la inducción del EC en células mutantes *cya* y *crp* muestran que el promotor P5 es dispensable para la respuesta al estrés de calor (Lee-Rivera y Gómez-Eichelmann, 1994).

La región reguladora de *rpoH* presenta sitios de unión para varias proteínas reguladoras de la transcripción. En 1998, Kallipolitis y Valentin-Hansen identificaron la presencia de un segundo sitio de unión para CRP (CRP2) separado del primero por 53 pb (Figura 3). Además, existen dos sitios de unión para la proteína DnaA (DnaA1 y DnaA2) y un sitio de unión para CytR (Figura 3). DnaA es mejor conocida por su papel en el inicio de la replicación del cromosoma de *E. coli*; sin embargo, se sabe que tiene funciones de activador y represor en la expresión de varios genes (Messer y Weigel, 1997). CytR es un anti-activador que, en colaboración con CRP, reprime la transcripción de los genes que codifican a proteínas que transportan y catabolizan ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos. DnaA y CytR ejercen el control transcripcional negativo de *rpoH* (Wang y Kaguni, 1989; Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998). Los experimentos *in vitro* e *in vivo* de la transcripción de *rpoH* muestran que DnaA ejerce su función de modulador negativo en la transcripción de *rpoH* a través de su unión en el extremo 5' de los

promotores P3 y P4 (Figura 3) mientras la transcripción del promotor P1 no se ve alterada (Wang y Kaguni, 1989).

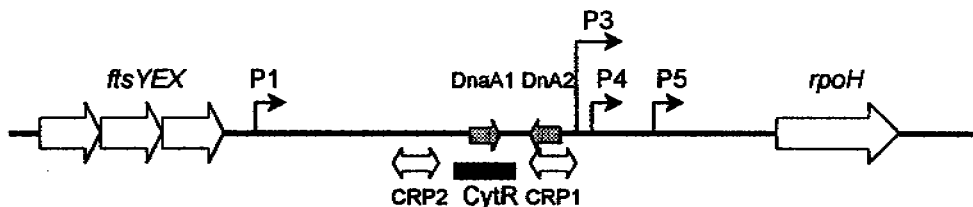
La proteína CytR se une a la región reguladora de *rhoH* entre los dos sitios para CRP y sobre el sitio DnaA1 (Figura 3). CytR y CRP se unen cooperativamente a sus respectivos sitios para formar un complejo con estequiometría de 1:2. El complejo represor modula negativamente la transcripción de los promotores P3, P4 y P5; la transcripción del promotor P1 no se ve afectada (Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998).

- *Modelo de la regulación de la respuesta al estrés de calor dependiente del regulón σ^{32} de E. coli.*

La regulación de la respuesta al EC se alcanza por cambios en la concentración celular de σ^{32} ; las proteínas FtsH, DnaK, DnaJ y GrpE juegan un papel clave en el control del nivel de σ^{32} . Las evidencias bioquímicas sugieren un mecanismo de unión de DnaK, DnaJ y GrpE a σ^{32} , similar al de otras proteínas sustrato.

Bajo condiciones normales, DnaK y DnaJ son capaces de unirse independientemente a σ^{32} cuando está dissociado de la RNA polimerasa, mientras la presencia de ATP induce la formación de un complejo ternario entre DnaK, DnaJ y σ^{32} . El modelo actual propone que primero DnaJ se une a σ^{32} y lo presenta a DnaK-ATP y el ATP se hidroliza. GrpE se une al complejo ADP-DnaK- σ^{32} -DnaJ y estimula la liberación de ADP, lo cual permite que entre el ATP y σ^{32} se disocie del complejo. El σ^{32} liberado puede asociarse a la RNA polimerasa o ser presentado a

A



B

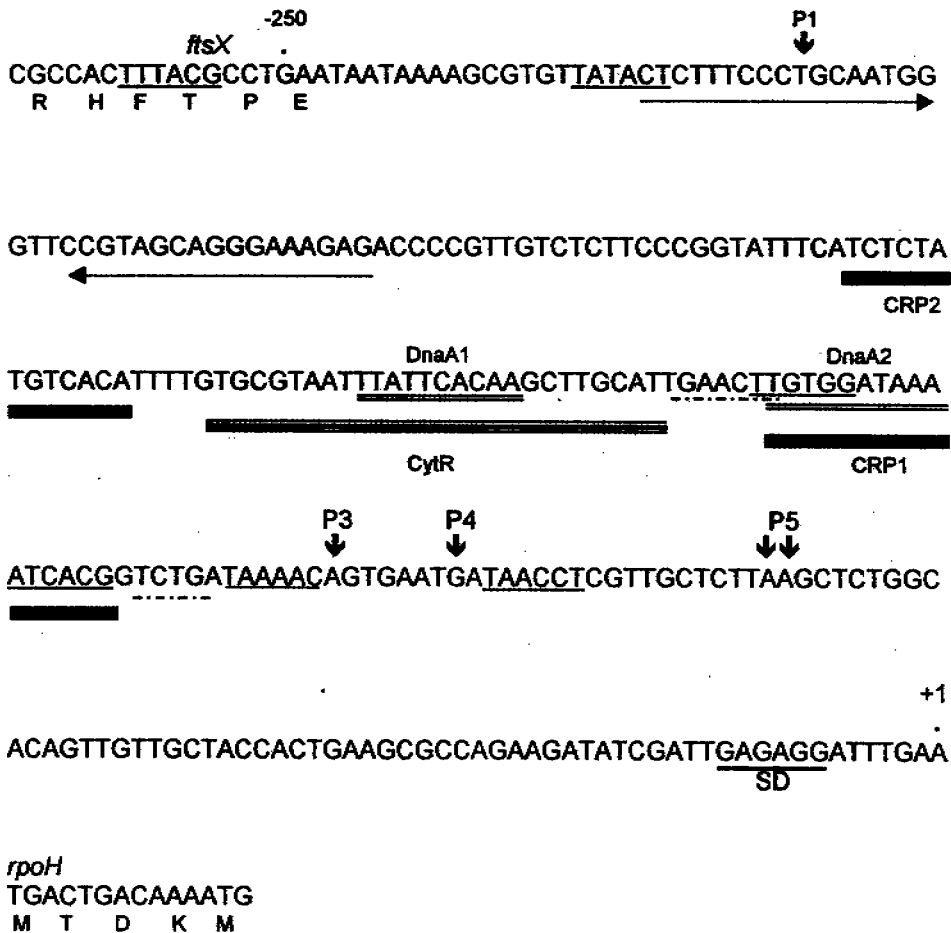


Figura 3. A. Representación esquemática de la región reguladora de *rpoH* de *E. coli* K12. B. Secuencia de DNA de la región reguladora de *rpoH*. +1 corresponde a la primera base de la región codificadora de *rpoH*. SD (secuencia Shine-Dalgarno), sitio de unión al ribosoma. Los sitios -35 y -10 de los promotores P1, P3, P4 y P5 están subrayados y sus inicios de transcripción están indicados con flechas. Los sitios de unión para las proteínas CRP, CytR y DnaA están señalados. El posible terminador de transcripción del operón *ftsYEX* se indica con flechas invertidas.

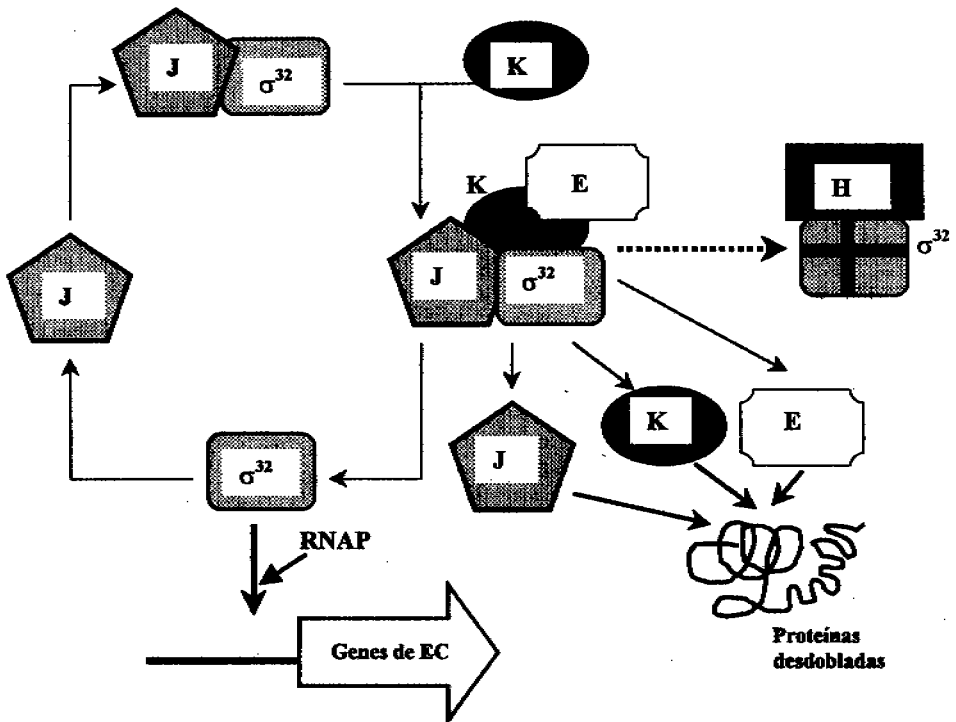


Figura 4. El modelo de regulación de la respuesta al EC dependiente de σ^{32} (Modificado de Hughes y Mathee, 1998). Las proteínas están señaladas de la forma siguiente: RNAP, RNA polimerasa; K, DnaK; J, DnaJ; E, GrpE; H, FtsH y factor σ^{32} , σ^{32} .

la proteasa FtsH para su degradación (Figura 4). Bajo condiciones de EC las proteínas DnaK, DnaJ y GrpE se unen a las proteínas dañadas por el calor, σ^{32} se libera y transcribe a los genes de EC. Después de un periodo de adaptación, se acumula un exceso de proteínas de EC y las chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE vuelven a unirse a σ^{32} para regular su concentración y la expresión de los genes de EC (Hughes y Mathee, 1998) (Figura 4). Se propone que DnaK se une a σ^{32} en las secuencias de aminoácidos RKLFFNRL y LNRWRIVK, localizados central y periféricamente a la región C (McCarty et al. 1996).

IV) LA RESPUESTA AL ESTRES DE CALOR EN LAS BACTERIAS.

Actualmente existe un gran número de especies bacterianas de las diferentes divisiones donde se ha caracterizado la respuesta al EC. La comparación del peso molecular aparente de las proteínas inducidas por el calor con las PEC de *E. coli* y el uso de anticuerpos específicos en contra de estas proteínas han permitido la identificación de algunas PEC similares a las de *E. coli* en estas especies. La caracterización ha permitido verificar la amplia distribución de proteínas como las chaperonas moleculares GroE, DnaK, DnaJ y GrpE, y las proteasas Clp y Lon.

Aunque la inducción de la síntesis de las PEC, es una respuesta común en casi todas las células de todos los organismos, existen diferencias importantes en los elementos que intervienen en esta respuesta. En las bacterias, los mecanismos que regulan la expresión de los genes de EC son variables y puede existir más de un mecanismo de regulación en un mismo organismo o en un solo gene. El peso

molecular y el número de proteínas, así como el número de genes que codifican para una misma proteína de EC también puede variar. En esta sección se abordan brevemente aspectos concernientes a la regulación de la respuesta al EC en las eubacterias en general.

Los mecanismos de inducción de las proteínas de estrés de calor entre las eubacterias.

En las bacterias la transcripción de los principales genes de respuesta a EC se regulan por mecanismos diferentes. Sin embargo, éstos pueden agruparse en dos mecanismos generales: 1) un mecanismo de represión a través de secuencias operadoras presentes en el extremo 5' de los principales genes de EC, y 2) un mecanismo positivo a través de factores sigma alternativos (σ^{32} , σ^E y σ^B), que reconocen específicamente a los promotores de los genes de EC e inducen su transcripción.

El mecanismo de regulación de los genes de EC a través de secuencias invertidas repetidas (IR), conocidas como CIRCE (de "controlling inverted repeat of chaperone expression") está ampliamente distribuido en las bacterias. La CIRCE consta de 9 pb, altamente conservadas, separadas entre sí por 9 pb no conservadas: TTAGCACTC-N₉-GAGTGCTAA. La secuencia parece funcionar de dos maneras: una, como un sitio operador para la unión de la proteína HrcA que actúa como represor y otra como una secuencia que determina la vida media del mRNA al cual está conectada. El comportamiento de una u otra manera parece depender de la ubicación de la secuencia en relación a las cajas -35 y -10 del promotor. Se propone que cuando la CIRCE está ubicada río arriba del promotor

puede funcionar como un operador y no constituye parte del transcrito. La ubicación de la secuencia CIRCE río abajo del promotor permite la transcripción de la secuencia y modifica la estabilidad del mRNA (Segal y Ron, 1996).

La presencia de las CIRCE se ha detectado en las regiones reguladoras de los operones *groE* y *dnaK* de varias especies de las divisiones Proteobacteria, Gram positivas, Cyanobacteria, Mycoplasma, Spirochaetes y Chlamydia (Segal y Ron, 1996). Sin embargo, la función de esta secuencia solamente ha sido estudiada en *C. crescentus* (*groE*) y en las Gram positivas *Bacillus subtilis* (*groE* y *dnaK*), *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces albus* G (*groE*) (Bucca, 1997; Baldini et al. 1998; Narberhaus, 1999). En esta última bacteria, la caracterización y el estudio de la regulación del gene *clpB* y el operón *dnaK* (*dnaK grpE dnaJ hspR*) muestra que su región promotora no contiene una secuencia CIRCE; en su lugar, presenta una y tres secuencias IR, respectivamente, llamadas HAIR (de "HspR associated inverted repeat") con la secuencia consenso CTTGAGT-N₇-ACTCAAG. En éstas IR se une específicamente el producto del gene *hspR*, la proteína HspR. La unión de HspR reprime la transcripción del gene *clpB* y del operón *dnaK* (Bucca, 1997). No hay similitud alguna entre los sistemas HspR/IR y HrcA/CIRCE.

El mecanismo de regulación exclusivo a través factores sigma parece estar restringido a la subdivisión γ de las proteobacterias, ya que, en algunas especies de la subdivisión α de las proteobacterias, además del mecanismo de inducción por σ^{32} , existen mecanismos de regulación por secuencias operadoras. La secuencia CIRCE está presente en el promotor de los operones *groE* de las α

proteobacterias *A. tumefaciens*, *B. japonicum* y *Z. mobilis* (Segal y Ron, 1996) (Tabla 3). En *B. japonicum* existen cinco operones *groE*; *groE*₁ es regulado por σ^{32} , mientras *groE*₄ y *groE*₅ presentan una secuencia CIRCE. El operón *groE* de *C. crescentus* es el único ejemplo descrito que su transcripción depende de σ^{32} y de la secuencia CIRCE (Baldini et al. 1998).

Recientemente, en *B. japonicum* se describió la presencia de una secuencia de 100 pb ubicada entre el inicio de transcripción y el inicio de traducción de los operones *hspA rpoH*₁, *hspB degP*, *hspE hspF orfG* y el gene *hspD*, de respuesta a EC. Esta secuencia conocida como ROSE (de "repression of heat shock gene expression") funciona como sitio de unión de una proteína represora, aún no identificada, bajo condiciones normales de crecimiento y previene la transcripción de los genes (Narberhaus et al. 1998).

La presencia de genes *rpoH* que codifican a factores similares a σ^{32} involucrados en la respuesta al EC, ha sido determinada o sugerida en especies de las subdivisiones α y γ de las proteobacterias (Tabla 3). Por otra parte, el análisis de la región reguladora del gene *rpoH*, sugiere la participación de σ^E en la regulación del gene *rpoH* y posiblemente en la respuesta al EC en *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas Campestris* (Naczynski et al. 1995; Nakahigashi et al. 1995; Huang et al. 1998). En *B. subtilis* los genes de EC son regulados por tres mecanismos diferentes: por las secuencias CIRCE, por el factor σ^B alternativo y por un mecanismo aún no conocido (Hecker et al. 1996).

V) EL GENE *rpoH* EN OTRAS BACTERIAS Y LA REGULACION DE SU EXPRESION.

Existen evidencias de la regulación positiva a través de factores similares a σ^{32} de los principales genes de EC en bacterias gram negativas pero no en gram positivas. En los años recientes se han caracterizado y secuenciado varios genes *rpoH* que codifican a factores similares a σ^{32} de un número de bacterias gram negativas (Fleischmann et al. 1995; Nakahigashi et al. 1995; Reisenauer et al. 1996; Wu y Newton, 1996; Narberhaus et al. 1997; Sahu et al. 1997; Emetz y Klug, 1998; Huang et al. 1998; Karls et al. 1998; Ramírez-Santos y Gómez-Eichelmann, 1998). Como se muestra en la Tabla 3, todas las especies bacterianas pertenecen a las subdivisiones α y γ de las proteobacterias. En algunos casos la funcionalidad de los genes *rpoH* ha sido probada por su capacidad para restituir el crecimiento a temperaturas elevadas y la respuesta al EC, de mutantes *rpoH* de *E. coli*, las cuales sólo crecen a una temperatura máxima de 20°C.

La comparación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de algunos de estos homólogos con el gene *rpoH* de *E. coli*, muestra varias secuencias conservadas que parecen ser importantes para la respuesta al EC. En *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis* (bacterias entéricas), *P. aeruginosa* y *X. campestris*, se encuentra la región A (previamente descrita), una secuencia potenciadora de la traducción, la cual es complementaria al rRNA 16S (Nakahigashi et al. 1995; Huang et al. 1998). También se encuentra la estructura secundaria predicha para el extremo 5' del mRNA de *rpoH* de *E. coli* (Nakahigashi et al. 1995). La región A y la estructura secundaria no están presentes en la proteobacteria γ *Buchnera aphidicola* y en las proteobacterias α *Agrobacterium*

tumefaciens y *Zimomonas mobilis* (Nakahigashi et al. 1995; Sato e Ishikawa, 1997). Además, todos los genes *rpoH* identificados muestran un fragmento altamente conservado que codifica para 9 aminoácidos (QRKLFFNRL) (Fleischmann et al. 1995; Nakahigashi et al. 1995; Reisenauer et al. 1996; Wu y Newton, 1996; Narberhaus et al. 1997; Sahu et al. 1997; Emetz y Klug, 1998; Huang et al. 1998; Karls et al. 1998; Ramírez-Santos y Gómez-Eichelmann, 1998). Esta secuencia denominada como la caja RpoH, podría implicar un mecanismo, similar al de *E. coli*, en la regulación de la respuesta al EC mediada por las chaperonas DnaK y DnaJ, y la proteína GrpE.

El análisis comparativo de la región reguladora de los genes *rpoH* muestra la presencia de un posible promotor σ^E en *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis* (bacterias entéricas), *P. aeruginosa* y *X. campestris* (Nakahigashi et al. 1995; Huang et al. 1998).

La vida media de los factores σ^{32} de *S. marcescens* y *P. aeruginosa* es corta (0.7 a 2.5 min) a 30°C, mientras el σ^{32} de *Proteus mirabilis* muestra tener una vida media de 40 min a 30°C con un incremento ligero a 42°C. En cambio, cuando los genes *rpoH* de *S. marcescens* y *P. mirabilis* se expresan en *E. coli*, la vida media de los factores σ^{32} resulta ser similar a la del factor σ^{32} de *E. coli*. Esto sugiere que ciertos factores celulares como proteasas o chaperonas, más que características intrínsecas del factor σ^{32} , podrían estar involucrados en la estabilidad de los factores entre estas bacterias (Nakahigashi et al. 1998).

TABLA 3. LOS GENES SIMILARES A *rpoH* DE DIFERENTES PROTEOBACTERIAS.

ESPECIE BACTERIANA	Identidad con <i>E. coli</i> K12	No. de pb	Contenido de G+C	No. aa del σ^{32} Homólogo
Grupo γ				
<i>E. coli</i> K12	100%	852	54.3	284
<i>Citrobacter freundii</i>	89.9	852	52.9	284
<i>Enterobacter cloacae</i>	86.5	855	54.6	285
<i>Serratia marcescens</i>	80.7	855	57.8	285
<i>Proteus mirabilis</i>	72.8	852	43.1	284
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66.6	852	62.7	284
<i>Haemophilus influenzae</i>	70.8	846	40.5	281
<i>Vibrio cholerae</i>	ND	858	ND	286
<i>Xanthomonas campestris</i>	57.3	876	62	291
<i>Buchnera aphidicola</i>	ND	855	ND	284
Grupo α				
<i>Caulobacter crescentus</i>	41	885	ND	295
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	39 (<i>rpoH1</i>)	924	ND	308
	39 (<i>rpoH2</i>)	897	ND	299
	37 (<i>rpoH3</i>)	921	ND	307
<i>Zymomonas mobilis</i>	46.4	906	49.4	302
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45.4	900	60.4	300
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	ND	900	64.4	299
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	40	894	ND	298

ND: No determinado

Los análisis experimentales de la transcripción de algunos genes *rpoH* muestran que los mecanismos que regulan la transcripción difieren extensivamente. En *P. aeruginosa*, los experimentos de extensión de un iniciador de polimerización ("primer extension"), muestran que el gene *rpoH* inicia su transcripción a partir de dos posibles promotores; un promotor dependiente de σ^{70} y otro dependiente de σ^E . Además, como en *E. coli*, se encuentra un sitio de unión para DnaA entre los sitios -35 de ambos promotores. El significado biológico de la presencia de esta secuencia es desconocido. Los ensayos de complementación de cepas mutantes *rpoH* de *E. coli* con el gene *rpoH* de *P. aeruginosa* muestran que este gene es capaz de recuperar el crecimiento de las mutantes a 28°C y regula la expresión de algunos genes de EC (Naczynski et al. 1995).

En *C. crescentus* y *Rhodobacter capsulatus* el gene *rpoH* está regulado por dos promotores; el promotor P1 (P2 en *R. capsulatus*), parece estar regulado por el factor σ^{70} mientras el promotor P2 (P1 en *R. capsulatus*), es reconocido por σ^{32} (Reisenauer et al. 1996; Wu y Newton, 1997; Huang et al. 1998). Los ensayos de protección del mRNA y digestión con nucleasa S1 en *C. crescentus* y de extensión de un iniciador en *R. capsulatus*, muestran que la transcripción de este gene a 30 y 40-42°C depende en su mayoría de la autoregulación positiva del promotor de σ^{32} (Wu y Newton, 1997; Emetz y Klug, 1998). Los experimentos de complementación de cepas carentes σ^{32} de *E. coli* sensibles a temperatura, mostraron que el *rpoH* de *C. crescentus* es capaz de restaurar el crecimiento de *E. coli* a 37°C (Reisenauer et al. 1996; Wu y Newton, 1996).

En *Bradyrhizobium japonicum* la inducción de los genes de EC se efectúa por al menos tres mecanismos diferentes. Algunos genes de EC están controlados por la secuencia CIRCE, mientras una segunda clase de genes es dependiente del factor σ^{32} . *B. japonicum* es el primer organismo que presenta tres genes homólogos a *rpoH* y que codifican a tres factores σ^{32} funcionales (Narberhaus et al. 1997). Cada uno presenta una forma diferente en la regulación de su transcripción. *rpoH₁* está localizado en el operón *hspA rpoH₁* (*hspA* codifica a una proteína pequeña de EC). La transcripción de este operón se induce con calor a partir de un promotor consenso de σ^{70} . Los experimentos de extensión del iniciador ("primer extension") para el gene *rpoH₂*, sugieren la presencia de dos promotores. El promotor P1 con un sitio de inicio a -109 pb del inicio de traducción presenta los sitios -35 y -10 similares a los promotores dependientes de σ^{70} de *E. coli*. La actividad de este promotor decae después del choque de calor. El segundo promotor es inducido por calor e inicia su transcripción a -54 pb del codón de inicio. La secuencia correspondiente al promotor es similar a la secuencia consenso de los promotores dependientes de σ^E . El gene *rpoH₃* está organizado en el operón *ragA ragB rpoH₃*. Los análisis de extensión de iniciador ("primer extension) muestran que la transcripción del operón inicia a partir de un promotor similar a los promotores dependientes de σ^{32} de *E. coli*. La transcripción de este promotor ocurre bajo condiciones normales de crecimiento y se incrementa aproximadamente dos veces durante el EC. La regulación diferencial de los tres genes descritos para *B. japonicum* sugiere el desarrollo de una estrategia para contender con varios retos ambientales ya sea en el suelo o como

simbionte de plantas. Sin embargo, los experimentos con cepas carentes de cada uno de los genes *rpoH* sugieren que solamente *rpoH*₂ podría ser esencial para *B. japonicum*, bajo condiciones del laboratorio (Narberhaus et al. 1997).

En resumen, los análisis de las secuencias de los genes de EC y de los mecanismos que los regulan, muestran que existen diferentes mecanismos de la regulación de transcripción en las eubacterias. El mecanismo más conservado entre las bacterias (Proteobacteria, Gram positivas, Cyanobacteria, Mycoplasma, Spirochaetes y Chlamydia), para controlar los genes de EC, es un sistema operador/represor (CIRCE/HrcA, HAIR/HspR, ROSE/Represor). En las proteobacterias, particularmente en el grupo α , han surgido varios mecanismos de control de los genes de EC. En este grupo, los genes se regulan por el sistema operador/represor y por factores sigma alternativos. La regulación de los genes de EC por factores sigma alternativos σ^{32} y σ^E , es altamente conservada en el grupo γ de las proteobacterias.

Los análisis teóricos y experimentales de la secuencias de los genes *rpoH*, y la inducción de la síntesis de los factores σ^{32} , de las γ proteobacterias, indican que la inducción ocurre a nivel de la traducción, como en *E. coli*. Lo anterior sugiere un mecanismo conservado de regulación traduccional que involucra la estructura secundaria del mRNA para la regulación de la síntesis de σ^{32} y la respuesta al EC. Por el contrario, en las α proteobacterias, el incremento en σ^{32} parece depender principalmente de la transcripción del gene *rpoH*.

El estudio de la regulación de la transcripción de los genes *rpoH* en *P. aeruginosa*, *C. crescentus* y *B. japonicum*, muestra que esta regulación podría ser menos compleja que en *E. coli*. La transcripción inicia de sólo dos promotores y la participación de proteínas reguladoras (activadores o represores) en la transcripción de estos genes solamente ha sido sugerida en *P. aeruginosa*.

JUSTIFICACION

En las bacterias, los estudios sobre la regulación genética de la respuesta al EC se han realizado principalmente en *E. coli* K12. En esta bacteria el gene *rpoH* y el factor σ^{32} juegan un papel esencial en la expresión de los genes de EC en condiciones normales y durante la respuesta al EC; además, *rpoH* muestra una regulación muy compleja en su expresión. Por lo tanto, es importante ampliar los estudios para determinar si el gene *rpoH* y el factor σ^{32} están presentes en otras bacterias y si la regulación de la transcripción de *rpoH* es similar a la observada en *E. coli* K12.

Los análisis comparativos de secuencias reguladoras representan un enfoque alternativo para la generación de predicciones sobre la regulación de genes homólogos en bacterias estrechamente relacionadas.

OBJETIVOS

En el presente trabajo se plantearon tres objetivos que pretenden, en conjunto, profundizar en el conocimiento de la transcripción del gene *rpoH* en las bacterias entéricas, pertenecientes a la subdivisión γ de las proteobacterias.

1. Identificar factores σ^{32} y genes *rpoH* en especies de bacterias entéricas.
2. Identificar el arreglo genético *ftsX-rpoH* en las mismas especies.
3. Secuenciar y analizar comparativamente la región reguladora de los genes *rpoH* de bacterias entéricas.

RESULTADOS

Parte I

Identificación de factores similares a σ^{32} y del arreglo genético *ftsX-rpoH* en bacterias entéricas.

Conserved Regulatory Elements of the Promoter Sequence of the Gene *rpoH* of Enteric Bacteria

Keywords: Heat shock; *rpoH*; sigma-32; Enteric bacteria.

Jesús Ramírez-Santos, Julio Collado-Vides¹, Martín García-Varela² and M. Carmen Gómez-Eichelmann*

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, 04510 México, D. F., México, ¹Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 565-A, 62100 Cuemavaca Morelos, México and ²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, 04510 México, D. F., México

Address for correspondence

Departamento de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
P.O. Box 70-228
04510 México, D. F.
México

Phone: (525) 6-22-38-52

FAX: (525) 6-22-38-91

Email: cargom@servidor.unam.mx

ABSTRACT

The *rpoH* regulatory region of different enteric bacteria was sequenced or downloaded from the GenBank and compared. Sequences similar to the σ^{70} promoters P1, P4 and P5, to the σ^E promoter P3, and to boxes DnaA1, DnaA2, cAMP receptor protein (CRP) boxes CRP1, CRP2, and box CytR present in *Escherichia coli* K12, were identified in sequences of closely related bacteria such as: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, and *Klebsiella pneumoniae*. In all these bacteria, an AraC-like box was also identified and the promoter P1 overlaps a putative *ftsYEX* transcription terminator. This overlap is also present in *Yersinia enterocolitica*. In more distant bacteria, *Y. enterocolitica*, *Erwinia amylovora* and *Proteus mirabilis*, the *rpoH* regulatory region has a putative σ^E promoter and sequences similar to σ^{70} promoters. Sequences similar to the regulatory boxes were not identified in these bacteria, although *P. mirabilis* presents a sequence similar to the DnaA2 box. The sequence analysis and phylogenetic study of the *rpoH* regulatory region of different enteric bacteria suggest that the pattern of transcription regulation of this gene varies slightly among bacteria closely related to *E. coli*; however, this pattern could show greater differences in the more distant bacteria.

INTRODUCTION

Cells of almost any organism respond to a sudden up-shift of temperature and to several other stress conditions by a transient increase in the cellular concentration of a set of proteins, the heat-shock proteins (HSPs). In *Escherichia coli* K12, the approximately 40 genes that encode the HSPs define the heat-shock stimulon (1,2). Most of these genes, including the main chaperone and protease genes, are under the positive control of σ^{32} , encoded by *rpoH*; while approximately 10 genes, including *rpoH*, *rpoE* and *degP*, have a promoter for σ^E , encoded by *rpoE* (1,2,3).

During the heat-shock response there is an increase in σ^{32} . This increase is primarily due to an enhanced translation of the *rpoH* mRNA and stabilization of the protein (1,2); however, transcription of *rpoH* is subject to complex regulation. This gene has four promoters: P1, P3, P4 and P5. Promoters P1, P4 and P5 are σ^{70} promoters, while P3 is controlled by σ^E . Promoters P1 and P4 are responsible for *rpoH* transcription under most growth conditions, while promoter P3 is strongly induced by heat and promoter P5 is a weak catabolite-sensitive promoter (1,2,4). Promoter P1 overlaps the terminator of the cell division operon *ftsYEX* (5). In addition, the regulatory region of the *rpoH* gene, approximately 250 base pairs (bp), contains two cAMP receptor protein (CRP), two DnaA and one CytR boxes (4,6,7). It has been proposed that the binding of CRP to box CRP1 increases transcription from P5 and decreases that from P4 (4); while the binding of the CRP-CytR complex to the CRP1-CytR-CRP2 sites, reduces transcription from P3, P4 and P5 (7). Finally, the binding of DnaA to the DnaA boxes represses transcription

from P3 and P4 (6). The *in vivo* physiological significance of these boxes has not been completely evaluated.

The presence of *rpoH* genes and of σ^{32} -like factors has been determined in several species of the α and γ subdivisions of the Proteobacteria (8-14). In addition to a σ^{32} factor, a highly conserved controlling inverted repeat of chaperone expression (CIRCE), has also been detected in front of genes *groE* and *dnaK* of the α Proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Caulobacter crescentus* (15,16). In bacteria of other divisions, instead of *rpoH* homologs and σ^{32} -dependent promoters, the sequence CIRCE has been detected in the regulatory region of the main heat-shock genes, *dnaK* and *groE* (15).

Although in several bacteria the structure and function of the σ^{32} protein are similar to those of its *E. coli* counterpart, the architecture, copy number, and regulation of the *rpoH* gene is different. In *C. crescentus* and *Pseudomonas aeruginosa* this gene is transcribed from two promoters, regulated by σ^{70} and σ^{32} and σ^{70} and σ^E , respectively (17,18). *B. japonicum* has three copies of the *rpoH* gene regulated by different mechanisms (11). Finally, the predicted sequence that generates a mRNA secondary structure involved in translational control of *rpoH*, and a σ^E -putative promoter were found in the γ but not in the α subdivision of the Proteobacteria (19).

In this study, the *rpoH* regulatory region of several enteric bacteria was sequenced, analyzed, and compared with sequences and regulatory elements previously determined for *E. coli* and other enteric bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

The bacteria used in this study as DNA source were: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia amylovora*. With exception of *E. amylovora*, all strains used were isolated at hospitals in Mexico City, Mexico (14).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and cloning of the regulatory region of *rpoH* homologs from enteric bacteria

The regulatory region of *rpoH* homologs was PCR amplified using different primers complementary to *ftsX* (forward: F1, 5'-TGATTGGTGCGACAGATG; F2, 5'-AGAAATTCTGGTGCTGCG; F3, 5'-CCTGCTATTGCTGCTGGTAT; F4, 5'-TTTACGCCACTTTACGCC) and *rpoH* (reverse: R1, 5'-CAGTCATTCAAATCCTCTCA; R2, 5'-GTTACCTTCCTGAATCAAATCC; R3, 5'-CGAGCAATATGAACAACAAACC) coding regions of *E. coli* K12. The PCR protocol included an initial step of 1 min of denaturation at 95°C, followed by 30 cycles of 30 sec of denaturation at 95°C, 30 sec of annealing at 50-58°C and 1 min of polymerase extension. A final extension was performed for 5 min at 72°C. *E. coli* DNA was amplified with primers F1/R2 and primer annealing was at 58°C. Primers F3/R1 were used to amplify DNAs from *S. flexneri*, *Y. enterocolitica*, *S. enterica* and *C. freundii* and primer annealing was performed at 58, 55, 55 and 53°C, respectively. *K. pneumoniae* and *E. amylovora* were amplified using primers F4/R3 and F2/R3, respectively, and 50°C as annealing temperature. The amplified DNA fragments were electrophoresed in 1% agarose gels in 1X TBE buffer (20) using a

100 bp ladder as size marker and purified by Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN Inc.). The purified DNAs were cloned in the pMOSBlue T-vector (Amersham Life Science). Plasmids carrying the *rpoH* amplified regulatory region were selected for DNA sequencing.

DNA sequence determination

DNA was sequenced using the Thermo sequenase cycle sequencing kit (Amersham Life Science) and M13 primers. Internal primers were used to complete the sequences.

Analysis of the nucleotide sequences

The nucleotide sequences were first aligned using the Clustal algorithm of PC/GENE release 6.85 (IntelliGenetics) and were then manually corrected. The relationships among these aligned sequences were estimated by two methods: maximum-parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) (21). The MP method was applied using the branch and bound model (TBR option) of program PAUP 3.1.1 (22), and the NJ method was applied as implemented by the MEGA program (23). The genetic distances among *rpoH* regulatory sequences were calculated by using the two-parameter model (24). Robustness of MP and NJ trees was determined by analyzing 100 bootstrap replicates using the PHYLIP (25) and MEGA programs, respectively.

Putative CRP and DnaA regulatory sites as well as other sites were initially identified by the method described by Thieffry et al. (26). Sequences in which no CRP and DnaA sites were identified, were further analyzed by eye, searching for sequences that matched any of the three consensus sequences proposed by Messer and Weigel (27). The putative CytR sites were identified by eye, taking

advantage of the consensus sequence defined by Pedersen and Valentin-Hansen (28).

Nucleotide sequence accession numbers

E. amylovora (AF127098), *C. freundii* (AF127099), *K. pneumoniae* (AF127100), *S. enterica* serovar Typhimurium (AF127101), *S. flexneri* (AF127102), *Y. enterocolitica* (AF127103) and *E. coli* (AF127104).

RESULTS AND DISCUSSION

DNA nucleotide sequence comparison of the regulatory region of the *rpoH* homologs

A total of 10 regulatory region sequences of *rpoH* homologs from different Enterobacteria were analyzed. The seven sequences obtained in this work were from *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *Y. enterocolitica* and *E. amylovora*. Three sequences were downloaded from the GenBank: reference strain *E. coli* K12 strain MG1655 (AE000422), *E. cloacae* (D50829) and *P. mirabilis* (D50830). The reported partial sequence, 122 nucleotides 5' to the first *rpoH* codon of *C. freundii* (X14960), was also downloaded to be compared with our sequence of 276 nucleotides. Both sequences were identical in the overlapping region.

DNA sequences of bacteria closely related to *E. coli* K12, that is *E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *C. freundii*, showed a high degree of nucleotide identity (80 to 98.8%) compared with that of the reference strain. A lower degree of identity was observed for more distant bacteria, *Y. enterocolitica* (65.3%), *P. mirabilis* (55.5%) and *E. amylovora* (53.0%). The G+C

content was similar for all sequences (42 to 46%), with the exception of *P. mirabilis* in which the G+C content was much lower, 31.3%. These percentages are lower than the G+C content of the *rpoH* coding region and of the genome of these bacteria (29).

To analyze the regulatory region of gene *rpoH* homologs of different enteric bacteria, the *E. coli* K12 regulatory region was subdivided in distal and proximal regions. The distal region comprises promoter P1 and the putative transcriptional terminator of operon *ftsYEX*; while the proximal region comprises promoters P3, P4 and P5, and boxes DnaA1, DnaA2, CRP1, CRP2 and CytR.

The alignment of the sequences of the *rpoH* distal regulatory region of the studied bacteria, is shown in Figure 1. *E. amylovora* was excluded from this analysis since its sequence differs greatly from the reference strain. In all aligned sequences, a putative promoter P1 was identified. In *P. mirabilis*, the -35 and -10 sites differ from those of *E. coli* K12 in 3 bases each. In *E. coli*, *S. enterica* and *S. flexneri*, promoter P1 is located at exactly the same position as the *E. coli* P1 promoter. In *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Y. enterocolitica* and *P. mirabilis*, this promoter is located upstream to that of *E. coli* K12, in relation to the beginning of the gene. The distance separating the -35 and -10 sites was the same in all the strains. The presence of at least one TAA termination codon located between the putative -35 and -10 sites was detected in all the strains with the exception of *P. mirabilis*. In addition to these termination codons, inverted repeats representing a putative transcriptional terminator were identified 3' to the -10 sites. The sequence and position of this terminator are identical in *E. coli* K12, *E. coli*, *S. enterica* and *S. flexneri*. The length of the inverted repeats is lower and the

distance separating both inverted repeats is larger in *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *C. freundii* and *Y. enterocolitica* (Fig. 1). No similar inverted repeat sequence was identified in the *P. mirabilis* distal region. In a separate analysis, sequences similar to promoter P1, termination codons and a putative *ftsYEX* terminator were not identified in the distal regulatory region of *E. amylovora*. The presence of the *ftsX-rpoH* arrangement has been previously reported in *E. amylovora* but not in *P. mirabilis* (14). However, it is possible that the *E. amylovora* and *P. mirabilis rpoH* regulatory distal sequences obtained were not complete, since the end codons and the putative transcriptional terminator of operon *ftsYEX* located upstream of *rpoH*, were not identified in these sequences.

The sequences of the proximal regulatory region of gene *rpoH* aligned for their analysis were those of *E. coli* K12, *E. coli*, *S. enterica*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *Y. enterocolitica* and *E. amylovora* (Fig. 2). The sequence of *P. mirabilis* corresponding to this region differs greatly from those of the other bacteria, and was not included in this alignment.

In all aligned sequences, a putative σ^E promoter (P3) was identified (Fig. 2). A similar promoter is also present in the *P. mirabilis* proximal region; however, it is located at a different position (-10 site at -121 and -35 site at -142). The presence of this promoter was previously reported by Nakahigashi et al. (9).

The -10 and -35 sites of promoter P4 of *E. coli*, *S. enterica* and *S. flexneri* were identical to that of *E. coli* K12. In general, the -35P4 sites of the other bacteria presented a lower number of nucleotide changes than those presented by the -10P4 sites. For example, the -35P4 sites of *C. freundii*, *E. cloacae* and *E.*

amylovora were identical to that of *E. coli* K12, while the -10P4 sites differed in one, one, and five nucleotides, respectively. This conservation may be related to the CRP sites present in these sequences overlapping the -35P4 site.

Sequences similar to the -10 region of promoter P5 of *E. coli* K12 were found in almost all analyzed bacteria (Fig. 3). A putative -35P5 region should be located at 21 nucleotides 5' to the -10P5 site of *E. coli* K12. Similar -35P5 sites were identified in other bacteria, with the exception of *Y. enterocolitica* and *E. amylovora*. Sequences similar to promoters P4 and P5, were not identified in the proximal regulatory region of *P. mirabilis*.

Sequences similar to the DnaA1, DnaA2, CRP1, CRP2 and CytR boxes of *E. coli* K12 were identified at almost the same position in the *E. coli*, *S. enterica*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* and *E. cloacae* sequences (Fig. 3). The CytR box overlaps DnaA1, and CRP1 overlaps DnaA2. On the other hand, DnaA2 overlaps the -35P4 site, while CRP1 overlaps the -34P4 and -35P5 sites (4,6,7). In *P. mirabilis*, one putative DnaA2 box (GTTGATAAA) was identified downstream of the σ^E promoter. The location of this box suggests that binding of protein DnaA could repress transcription from this promoter, as it does in *E. coli* K12 (6). Sequences similar to the DnaA, CRP and CytR boxes were not identified in the corresponding region of *Y. enterocolitica* and *E. amylovora*. In the sequences in which putative DnaA and CRP boxes were present, an AraC binding site was also identified. The fact that only one putative AraC box was identified, and that it overlaps boxes DnaA2 and CRP1 (Fig. 3), suggests that this box could be non-functional.

Phylogenetic relationships among *rpoH* regulatory regions

The alignment of the regulatory region sequence data of gene *rpoH* homologs consisted of 307 nucleotide sites for each of the 10 species of the enteric bacteria analyzed. Of these sites, 274 were variable and when sites with gaps were excluded to reduce systematic errors, 166 and 179 sites were variable and informative in the MP and NJ analysis, respectively.

The trees obtained with the MP and NJ analysis were further analyzed by carrying out bootstrap searches with 100 replicates. In both cases, a single tree was obtained. The tree obtained by NJ analysis is shown in Figure 4. The topology of this tree shows three main groups. The first group includes the *rpoH* regulatory sequences of *E. coli* K12, *E. coli*, *S. enterica*, and *S. flexneri*. The second group includes 3 species, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *C. freundii*. Finally, the sequences of *E. amylovora* and *P. mirabilis* form a basal group while *Y. enterocolitica* appears as a sister species of this group. The topology of the tree (Fig. 4) shows that the sequences of the first group exhibited slower evolution at nucleotide level; therefore, this group has shorter branch lengths than the second group. All these relationships among the *rpoH* regulatory sequences of the enteric bacteria studied, are also supported by the MP tree obtained after a moderated bootstrap analysis (data not shown).

The relationships inferred from the MP and NJ analysis of the regulatory region of *rpoH* homologs suggests that the regions of *E. coli* K12, *E. coli*, *S. enterica* and *S. flexneri* conform a closely related group (Fig. 4). *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *C. freundii* constitute another group that shows a higher nucleotide substitution rate than that of the previous group. Finally, the sequences of *Y. enterocolitica*, *E.*

amylovora, and *P. mirabilis* were found to be distant to these two groups. Similar relationships among enteric bacteria have been found comparing the conserved 2.1-2.4 coding region of σ^{32} (9). The relationships among the sequences of the regulatory region of gene *rpoH* reported in this work, are similar to the phylogenetic relationships among enteric bacteria (30).

The sequence analysis and phylogenetic study of the regulatory region of gene *rpoH* of the enteric bacteria suggest that in most enteric bacteria *rpoH* could be transcribed from one σ^E promoter and from several σ^{70} promoters and that transcription from P1 could be coupled to cell division. The pattern of regulation of this gene probably varies slightly among members of the two groups closely related to *E. coli*. In these bacteria, transcription from the *rpoH* promoters P3, P4 and P5, appears to be modulated by various regulatory proteins, DnaA, CytR, CRP. This modulation probably ensures an adequate amount of σ^{32} , and thus of the main chaperones and proteases, under most growth conditions. The pattern of *rpoH* regulation could show higher differences for bacteria of the third group, *Y. enterocolitica*, *E. amylovora*, and *P. mirabilis*. It is important to mention that *E. amylovora* is a plant bacterium and that *P. mirabilis* has a lower G+C content compared with the other enteric bacteria.

To better elucidate the mechanisms governing the transcription of gene *rpoH* in *E. coli* K12 and other enteric bacteria, a direct experimental approach is necessary. This approach must be focussed on the regulatory mechanisms that couple *rpoH* transcription from different promoters, to carbon source, cellular response to several stress conditions, and probably DNA replication or cell cycle.

CONCLUSIONS

We have performed a sequence comparative analysis of the regulatory region of *rpoH* in enteric bacteria. The regulatory elements discussed here, have been basically studied experimentally in the reference *E.coli* K12 strain. This study shows that such regulatory studies and annotations can be applied productively to generate predictions on the regulation of homologous genes in closely related bacteria. Similar recent studies have been performed comparing regulation and regulon organization in *Haemophilus influenzae* (31). The sequence analysis presented here suggests that in most enteric bacteria *rpoH* could be transcribed from one σ^E promoter and from several σ^{70} promoters. The activity of the *rpoH* promoters of bacteria of the two closely related groups, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. cloacae*, and *K. pneumoniae*, could be modulated, as in *E. coli* K12, by the regulatory proteins CRP, DnaA and CytR. Modulation of the activity of these promoters could be different in the bacteria of the third group, *E. amylovora*, *Y. enterocolitica* and *P. mirabilis*.

The phylogenetic study of the regulatory region of gene *rpoH* of enteric bacteria shows a tree composed by two closely related groups and a third more distant group. Given that the topology of the tree with regulatory regions reproduces the evolutionary distances among these bacteria, we assume that the evolution of these regulatory regions did not involve major shuffling events in these regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to M. Paéz for preparing bacterial media, A. M. Huerta for running the programs to search for binding sites, and I. Pérez-Monfort for advice on manuscript style. This study was partially supported by grant 3086P-N9607 from CONACyT, México.

REFERENCES

1. Gross,C.A. (1996) In Neidhardt,F.C., Curtiss,R.III, Ingraham,J.L., Lin,E.C.C., Low,K.B., Magasanik,B., Reznikoff,W.S., Riley,M., Schaechter,M. and Umberger,H.E. (eds), *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. 2nd Edn. ASM Press, Washington, DC, Vol. 1, pp. 1382-1399.
2. Yura,T. and Nakahigashi,K. (1999) *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 153-158
3. Rouvière,P.E., De Las Peñas,A., Mecsas,J., Lu,C.Z., Rudd,K.E. and Gross,C.A. (1995) *EMBO J.*, **14**, 1032-1042.
4. Nagai,H., Yano,R., Erickson,J.W. and Yura,T. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 2710-2715.
5. Gill,D.R., Hatfull,G.F. and Salmond,G.P.C. (1986) *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 134-145.
6. Wang,Q. and Kaguni,J.M. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 7338-7344.
7. Kallipolitis,B.H. and Valentin-Hansen,P. (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 1091-1099.
8. Fleischmann,R.D., Adams,M.D., White,O., Clayton,R.A., Kirkness,E.F., Kerlavage,A.R., Bult,C.J., Tomb,J.-F., Dougherty,B.A., Merrick,J.M., et al. (1995) *Science*, **269**, 496-512.

9. Nakahigashi,K., Yanagi,H. and Yura,T. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4383-4390.
10. Wu,J. and Newton,A. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 2094-2101.
11. Narberhaus,F., Krummenacher,P., Fischer,H.M. and Hennecke,H. (1997) *Mol. Microbiol.*, **21**, 93-104.
12. Sahu,G.K., Chowdhury,R. and Das,J. (1997) *Gene*, **189**, 203-207.
13. Karls,R.K., Brooks,J., Rossmeissl,P., Luedke,J. and Donohue,T.J. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 10-19.
14. Ramírez-Santos,J. and Gómez-Eichelmann,M.C. (1998) *Can. J. Microbiol.*, **44**, 565-568.
15. Segal,G. and Ron,E.Z. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 1-10.
16. Baldini,R.L., Avedissian,M. and Lopes,S. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 1632-1641.
17. Naczynski,Z.N., Mueller,C. and Kropinski,A.M. (1995) *Can. J. Microbiol.*, **41**, 75-87.
18. Wu,J. and Newton,A. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 514-521.
19. Nakahigashi,K., Yanagi,H. and Yura,T. (1998) *J. Bacteriol.*, **180**, 2402-2408.
20. Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edn. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY.
21. Saito,N. and Nei,M. (1987) *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
22. Swofford,D. (1993) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
23. Kumar,S., Tamura,K. and Nei,M. (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, **10**, 189-191.
24. Kimura,M. (1980) *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120.

25. Felsenstein, J. (1993) PHYLIP: phylogenetic inference package, version 3.5c.
University of Washington, Seattle.
26. Thieffry, D., Salgado, H., Huerta, A.M. and Collado-Vides, J. (1998)
Bioinformatics, **14**, 391-400.
27. Messer, W. and Weigel, C. (1997) *Mol. Microbiol.*, **24**, 1-6.
28. Pedersen, H. and Valentin-Hansen, P. (1997) *EMBO J.*, **16**, 2108-2118.
29. Brenner, D.J. (1984) In Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, Vol. I, pp. 408-516.
30. Ochman, H. and Wilson, A.C. (1987) In Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, DC, Vol. 1, pp. 1649-1654.
31. Mironov, A.A., Koonin, E.V., Roytberg, M.A. and Gelfand, M.S. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2981-2989.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1.

Sequence comparison of the distal *rpoH* regulatory region of different enteric bacteria. Distal *rpoH* regulatory regions were compared with that of *E. coli* K12. Sites similar to the -35 and -10 sites of the *E. coli* K12 promoter P1 are boxed. The transcription start-site for promoter P1 is indicated by a vertical arrow. Inverted repeats of the transcriptional terminator of *ftsX* are indicated by opposite arrows under the sequences. Right numbers indicate the nucleotide position relative to the +1 of each sequence. Bacterial nomenclature: Eck, *E. coli* K12; Ec, *E. coli*; Se, *S. enterica* serovar Typhimurium; Sf, *S. flexneri*; Kp, *K. pneumoniae*; Ecl, *E. cloacae*; Cf, *C. freundii*; Ye, *Y. enterocolitica*; Pm, *P. mirabilis*. Identical residues are represented by a dot and substituted residues are indicated. Dashed lines indicate introduced gaps to maximize the alignment.

Figure 2.

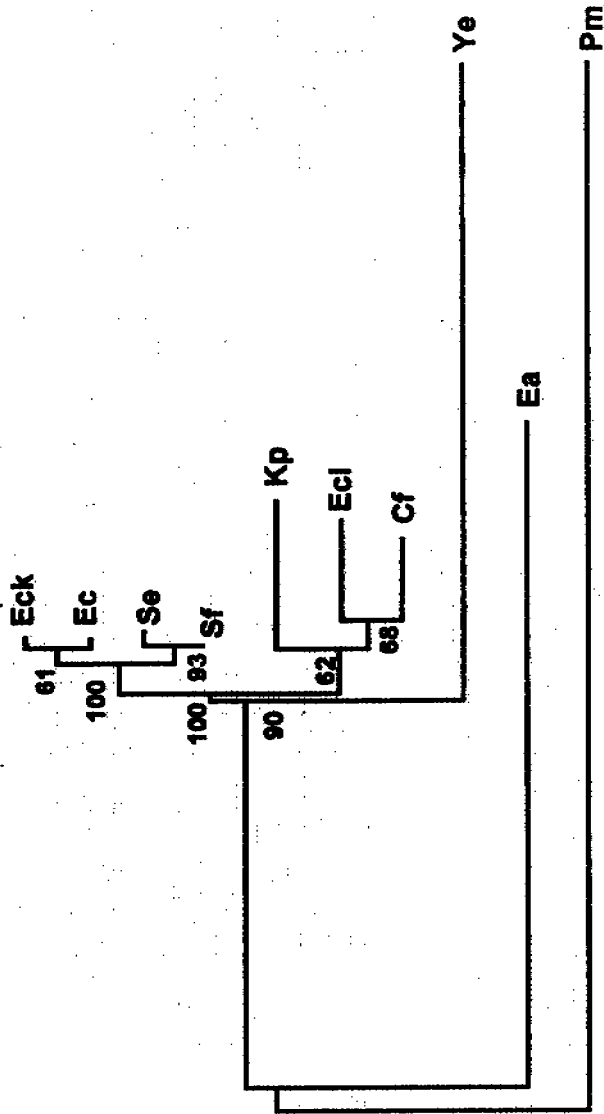
Sequence comparison of the proximal regulatory region of *rpoH* homologs of different enteric bacteria. The -10 and -35 sites similar to the *E. coli* K12 promoters P3, P4 and P5 are boxed. The transcription start sites for these promoters are signaled by vertical arrows. Dots, dashes, and right numbers, as in Fig. 1. Bacterial nomenclature: Ea, *E. amylovora*; other bacteria as in Fig. 1.

FIG. 3. Predicted binding sites of regulatory proteins at the regulatory region of the *rpoH* homologs. CytR, DnaA, AraC and CRP binding sites are boxed with discontinuous, thin, thick, and gray lines, respectively. Opposite arrows underline

the inverted repeats present in box CytR. The -10 and -35 sites for *E. coli* K12 promoters P3, P4 and P5 are underlined. Bacterial nomenclature, dots and right numbers as in Fig. 1.

Figure 4.

Neighbor-joining tree of the regulatory region of *rpoH* homologs of different enteric bacteria. The number above each fork represents the percentage of 100 bootstrap replicates that supported that branch. Bacterial nomenclature as in Figs 1 and 2.



0 0.1

-35P1

-10P1



Eck	CGCCACTTACGCCTGAATAATAAAGCGTGTATACTCTTTCCTGC	---AATGGGTTTC--CGTAGCAGGGAAGAGAC	-183
EcA.....	-183
SeC.....C.....	T -183
Sf	T -183
KpC..T.....TGC.....A.....CTGT.C.	-193
EclT.C.C.C.....ACCG.GAT....GC--.T.....	C.-T -192
CfC.C.T..A..TCTC.G...A.....ACTG.GTA....GCTC-T.....	-T -199
YeGA.....A.GC.G...A...T.TT.....GGTGT.CAT..GAG-----	.GT -221
Pm	GC.ATT..AT.AAACC...TCTTTG..A.AA..ATG.TC.A.A..TAACTT.GAT.AAATGA...CT.TTTT..T...T		-203

	-35P3	-35P4	-35P5	-10P3	-10P4	-10P5			
Bck			CATTGAAC	TGTGGATA	TAATAAATC	ACCGTCTG	TAATAAACCT	CGTTGCTCTTAAGCT	-57
Ec									-57
Se									-57
Sf									-57
Kp									-64
Cf									-63
Ecl									-60
Ye									-63
Ea									-86

P5

P4

P3

-35P3 -35P4 -35P5 -10P3 -10P4

	TTCATCCTATGTCACATTTTGGGGTAAATTTATTTCACACACTTGGGATATAAATCACCTCTCGATAAAACAG		
Eck
Ec
Se
Sf
Kp
Cf
Ec1

CRP2

DnaA1

DnaA2

CRP1

.....A.....
CCG.....
C.A...TTACGA...G
TC.....TGTGCA.C.G.....

.....

C.....CT.AT.....-92
G.T.....-91
G.....-88

.....-86
-86
-86

RESULTADOS

Parte II

Conservación de los elementos reguladores en la región promotora del gene *rpoH* en bacterias entéricas.

(Enviado a la revista Nucleic Acids Research).

ANEXO 1.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS DE LA PARTE I.

Presencia de factores similares a σ^{32} y del arreglo genético *ftsX-rpoH* en bacterias entéricas

Especies	factor σ^{32a}	arreglo <i>ftsX-rpoH</i> ^{b)}
<i>E. coli</i> K12 (W3110)	+	+
<i>E. coli</i>	+	+
<i>Shigella boydii</i>	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> (2 cepas)	+	+
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	+	+
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+
<i>Klebsiella</i> spp.	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
<i>Erwinia amylovora</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i> (2 cepas)	+	+ ^{c)}
<i>Yersinia enterocolitica</i> (2 cepas)	+	+ ^{c)}
<i>Proteus mirabilis</i> (Pm15)	+	- ^{d)}

- a) Determinado por "Western blot" usando suero anti-*E. coli* K12 σ^{32} .
- b) Determinado por "Southern" blot en DNA total digerido con *Pst*I y *Pvu*II e hibridizado con el fragmento de 0.94 kb *Hind*III-*Pvu*II de pKV3 (*rpoH*) y re-hibridizado con el fragmento de 0.99 kb *Eco*RV-*Sph*I de pDG1 (*ftsX*).
- c) Determinado por "Southern blot", pero bajo condiciones relajadas de hibridización.
- d) Determinado por "Southern blot", pero bajo condiciones muy relajadas de hibridización.

ANEXO 2.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS DE LA PARTE II

-300

-240

Eck GCCCAGCTTTACGGCCTGAAATPAAATAAAAAGCGGTGTAAACTCTTTCCCTGC---AATGGGTTTC--CGTAGCAGGGAAAGACCC---GTTG
 EcC.....A.....C.....T.....
 SeC.....A.....C.....T.....
 SfC.....T.....A.....A.....TGC.....A.....CTGT.....C.....T.....
 KpT.....C.....C.....A.....A.....ACCG.....GAT.....GC---T.....C.....T.....T.....
 EclT.....C.....C.....T.....A.....TCTC.....G.....A.....ACTG.....GTA.....GCTC---T.....T.....GA
 CfGA.....A.....GC.....G.....A.....T.....TT.....GGTGT.....CAT.....GAG---T.....T.....GATTTGTA.....GCC
 YeA.....GC.....G.....CG.....A.....GG.....GGTGGC.....AGCC.....G.....TACT.....G.....TAT.....CG.....C.....C.....GC.....
 Ea T.AA.....CG.....G.....CG.....A.....GG.....GGTGGC.....AGCC.....G.....TACT.....G.....TAT.....CG.....C.....C.....GC.....
 Pm -----A.....GG.....AA.....CTTGCC.....TTT.....T.....AAACCCCTA.....GG.....ATAATA.....TGTTC.....A.....ACTTA.....C.....TA.....ATG.....ATTGAGTACTAT.....T

-180

Eck TCT-----CTTCCCG-GTAAATTCACTCTATGTGCACANTTTGTGCGTAATTTATTCACAAAGCTTGCAATTGAAGTTGGATA
 EcT.....T.....A.....
 SeT.....T.....A.....
 Sf TCCCGCTTT---TC.....G.....TCACT.....GTGG.....CCG.....G.....C.....
 KpA.....CT-GTAA.....TC.....GTG.....TGTGCA.....C.....G.....
 EclA.....GCGTA.....TGTG.....C.....A.....TTACGA.....G.....
 CfA.....TAATCCCATGTGATC.....G.....TGA.....CGCACAAAC.....GC.....ATCTGC.....AA.....AT.....AGCG.....AG.....AAATGTATCCAGT.....T.....ATGGC
 Ye TATTAAT---AT.....CA.....GATTAAG.....A.....T.....GTGATA.....T.....CTA.....G.....CTTAATG.....AA.....GAA.....G
 Ea TATTAAT---AT.....CA.....GATTAAG.....A.....T.....GTGATA.....T.....CTA.....G.....CTTAATG.....AA.....GAA.....G
 Pm .AATGATGA---ATT.....G.....GT.....GC.....GG.....AAAGTACAA.....G.....A.....AAAC.....TAGATG---GAT.....TGAAC.....T.....AGT.....TAT.....C.....G

```

Eck MAATCAGGGTCTGATATAAACAGTGTG---AATGATTAACCTCGTGGCTTTAAGGCTGTGGCACA-GTTGTTGC-----TACCACGTGAAGC
Ec .....T.....G.....
Se .....T.....G.....
Sf .....T.....G.....
Kp .....T.....CTAT.....G.....TT...AAT...A.G.ATG.....TG-C.....CTGATGGGGA..ACA.C..
Ecl .....T.....G.....C..F.....AA.C...T.....TG-.....CTGACGGGGA..ACCTG.-
Cf .....T.....G..T.....TT.....A.....A.....TG.....TATTGGT.TTAG.CA.F..
Ye .....TAAAT.....GAC.C.C.....AAATG..A.GGTG.C.AGC.....TGA.TCTG.TAAG...G..A.AAATATCGGCG.TGA..GAA
Ea GTTTAAG.C..TA.CAC.G.TT...TTTT.T.TTGCTG-.TG.T.A.G...T.TGT.GG.G-.CAG.GATC-----
Pm GTCATATATGT..TA.....TAAATATCT.CC.CC.A.GATGAC..G.....TA..ATT.A.A.G.TCTT.CTGCCTACCAT..A.T.TT

```

SD +1

```

Eck GCCAGAGATATATCGA-----TT-GAGAGGATTTGATATG
Ec .....
Se .....
Sf .....
Kp .....T.....A.....A.....A-.....
Ecl .....T.....A..A.....A-.....
Cf .....T..A.A.....
Ye ATTT.C.CTA.A.ATGCATGCA.-.....
Ea -GACACC.CA..ATGCATACAAA.....G.....
Pm AAT.TT.AT...TATTTGATT..CAT.....

```

Alineamiento múltiple de la región reguladora de *rhoH* de diferentes bacterias entéricas. Se muestran las secuencias reguladoras de Eck, *E. coli* K12; Ec, *E. coli*; Se, *S. enterica* serovar Typhimurium; Sf, *S. flexneri*; Kp, *K. pneumoniae*; Ecl, *E. cloacae*; Cf, *C. freundii*; Ye, *Y. enterocolitica*; Ea, *E. amylovora*; Pm, *P. mirabilis*. +1 es la primera base de la región codificadora de *rhoH* y SD indica la secuencia Shine-Dalgarno. Residuos idénticos están representados por puntos. Los guiones indican espacios para optimizar el alineamiento.

DISCUSION GENERAL

Los mecanismos que regulan la transcripción de los genes de respuesta al EC han evolucionado en los diferentes grupos de las bacterias. La regulación negativa a través de un mecanismo de represor/operador parece estar ampliamente distribuido entre las bacterias (Segal y Ron, 1996; Narberhaus, 1999); mientras la regulación positiva por medio de factores sigma alternativos (σ^{32} y σ^E) que dirigen la RNA polimerasa a los promotores específicos de los genes de EC, parece estar restringido al grupo γ de las proteobacterias. Sin embargo, varias bacterias, por ejemplo *B. japonicum* y *B. subtilis*, han establecido combinaciones de ambos mecanismos que les permiten regular finamente la expresión de los genes de EC bajo condiciones diferentes (Hecker et al. 1996; Narberhaus et al. 1997).

La bacteria *E. coli* K12 ha sido un organismo paradigma en el estudio de la regulación de la respuesta al EC (Yura et al. 1993; Gross, 1996). En esta bacteria, los factores σ^{32} y σ^E , codificados por los genes *rpoH* y *rpoE*, respectivamente, regulan positivamente la expresión de aproximadamente 40 genes que conforman el estímulo de EC (Chuang y Blattner, 1993; Gross, 1996). La expresión de ambos genes se realiza de manera compleja, ya que presentan varios niveles de regulación (transcripcional, traduccional y postraduccional). La transcripción de *rpoH* depende de cuatro promotores, varias proteínas reguladoras (activadoras y represoras) y posiblemente del operón *ftsYEX* ubicado en el extremo 5' de *rpoH* (Gill et al. 1986; Erickson et al. 1987; Wang y Kaguni y Kaguni, 1989; Nagai et al. 1990; Kallipolitis y Valentin-Hansen, 1998).

En el presente trabajo se buscó identificar la presencia de factores similares a σ^{32} en los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia*, *Erwinia*, y *Proteus*. A través del método de "Western blot" y empleando un anticuerpo policlonal contra σ^{32} de *E. coli*, se identificaron en todos los géneros estudiados factores similares a σ^{32} . Este factor se indujo con EC, bajo las condiciones experimentales utilizadas, en todas las bacterias probadas; sin embargo, en *Proteus* la inducción fue muy ligera y en *K. pneumoniae* no se indujo. Es posible que en *Proteus* el incremento menor de σ^{32} este relacionado estrechamente con la vida media de este factor en esta bacteria, la cual es de 40 minutos a 30°C. En conocido que la síntesis de σ^{32} durante EC es una respuesta común en las bacterias que contienen al gene *rpoH* (Wu y Newton, 1996; Huang et al. 1998; Karls et al. 1998; Nakahigashi et al. 1998). En su conjunto, estos resultados sugieren que el incremento inducido por el calor en el nivel de σ^{32} , es conservado como una respuesta celular primaria al incremento de temperatura en las proteobacterias.

Para identificar el arreglo genético *ftsX-rpoH* en las bacterias entéricas, se recurrió a la digestión con enzimas de restricción del DNA cromosomal y a los ensayos tipo "Southern blot" empleando las sondas *ftsX* y *rpoH* de *E. coli* K2. Los resultados, muestran que el arreglo genético se mantiene en todas las bacterias estudiadas, con excepción de *Proteus*, donde no fue posible identificar ninguno de los genes aunque se emplearon condiciones muy relajadas. Sin embargo, por "Western blot" si se identificó una proteína homóloga a σ^{32} en esta bacteria (Ramírez-Santos y Gómez-Eichelmann, 1998). Es posible que en los

experimentos tipo "Southern blot" la diferencia en el porcentaje del contenido de G+C entre *E. coli* y *Proteus mirabilis* explique que la sonda de DNA no identificó al gene *rpoH* de *Proteus*. La conservación de este arreglo genético sugiere que *ftsX* podría influir en la expresión del gene *rpoH* en las bacterias entéricas. Sin embargo, *ftsYEX* y el promotor P1 de *rpoH* se transcriben constantemente durante el ciclo celular, lo cual sugiere que el terminador de transcripción de *ftsYEX* no influye en la expresión del P1 de *rpoH* (Gómez-Eichelmann et al. 1998). En estudios simultáneos al desarrollo de este trabajo, Nakahigashi et al. 1995 identificaron al gene *rpoH* en *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens* y *P. mirabilis*, lo cual apoyó la presencia de σ^{32} en nuestras bacterias y mostró la existencia de *rpoH* en *Proteus*. Otros estudios paralelos al nuestro en bacterias como *H. influenzae* (Fleischmann et al. 1995), *P. aeruginosa* (Naczynski et al. 1995), *C. crescentus* (Wu y Newton, 1996), *V. colerae* (Sahu et al. 1997), *B. japonicum* (Narbehaus et al. 1997), *R. sphaeroides* (Karis et al. 1998) y *X. campestris* (Huang et al. 1998), muestran que el gene *rpoH* se encuentra ampliamente distribuido en las proteobacterias. En ningún caso de los anteriores se reporta la existencia del gene *ftsX* en el extremo 5' de *rpoH*, por lo que el arreglo *ftsX-rpoH* podría estar presente solamente en las proteobacterias γ .

Por otra parte, para tratar de entender el posible mecanismo de regulación de la transcripción de gene *rpoH* en las bacterias entéricas, se realizó el análisis comparativo y filogenético de la región reguladora de los genes de *rpoH*, de 10 especies de bacterias entéricas. De estas secuencias, siete (*E. coli*, *S. enterica*, *S. flexneri*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* y *E. amylovora*), se

secuenciaron en el laboratorio y tres se obtuvieron de la base de datos GenBank (*E. coli* K12, *E. cloacae* y *P. mirabilis*). Los resultados de los análisis de las secuencias sugieren que los elementos que regulan la transcripción de *rpoH* (promotores y sitios de unión para proteínas) están altamente conservados en las bacterias emparentadas más cercanamente a *E. coli* K12 (*E. coli*, *S. enterica*, y *S. flexneri*), y difieren ligeramente en *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *C. freundii*. Esto sugiere que el mecanismo de regulación de la transcripción de estos genes podría ser muy similar al de *E. coli* K12. Sin embargo, en *Y. enterocolitica*, *E. amylovora* y *P. mirabilis* (bacterias más alejadas filogenéticamente), la diferencia es mayor con respecto a *E. coli* K12, lo cual sugiere que el control de la regulación en estas bacterias podría ser diferente. El análisis muestra a un posible promotor para σ^E como el único elemento común en todas las secuencias estudiadas. Un promotor similar ha sido propuesto para *rpoH* de *P. aeruginosa*, *X. campestris* y *rpoH₂* de *B. japonicum* (Huang et al. 1998; Naczynski et al. 1995; Narberhaus et al. 1997). El análisis también sugiere, por primera vez, la participación de la proteína AraC en la posible regulación de *rpoH* en *E. coli* K12, *E. coli*, *S. enterica*, *S. flexneri*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *C. freundii*. Es conocido que en *E. coli* AraC solamente participa en la regulación del regulón de catabolismo de arabinosa, por lo que es necesario plantear un enfoque experimental para evaluar si AraC participa en la regulación del gene *rpoH*.

La mayoría de las secuencias analizadas en este trabajo presentan sitios de unión para las proteínas reguladoras CRP, CytR, DnaA y AraC; contrariamente, la regulación transcripcional de los genes *rpoH* en *C. crescentus* y *B. japonicum*

aparentemente no está determinada por la participación de proteínas reguladoras similares. Solamente en *P. aeruginosa* ha sido propuesta la posible participación de la proteína DnaA en la regulación de *rpoH* (Naczynski et al. 1995).

Aparentemente en los genes *rpoH* las secuencias reguladoras han cambiado a una tasa mayor que las regiones codificadoras. Por lo tanto, las estrategias de regulación se han modificado ampliamente; sin embargo, la inducción del factor σ^{32} ante el EC y otros estímulos, como esta descrito en *E. coli* K12, es similar en las bacterias estudiadas en este trabajo.

Finalmente, estos estudios apoyan el enfoque de comparar secuencias reguladoras conocidas con secuencias homólogas, para generar predicciones sobre la regulación de genes homólogos en bacterias estrechamente relacionadas. Estos estudios permitirán avanzar en el conocimiento de la distribución filogenética de *rpoH* y de σ^{32} , y estudiar los mecanismos que regulan la transcripción del gene *rpoH*, y en general la regulación de la respuesta al EC en las bacterias entéricas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Factores similares a σ^{32} están presentes en todas las bacterias entéricas estudiadas.
2. La síntesis de los σ^{32} se induce claramente con calor en la mayoría de las bacterias entéricas estudiadas.
3. Los genes *ftsX* y *rpoH* están presentes, en un arreglo similar al de *E. coli* K12, en la mayoría de estas bacterias.
4. El análisis de la región reguladora de los genes *rpoH* sugiere que este gene podría ser transcrito de un promotor σ^E y de varios promotores dependientes de σ^{70} , en la mayoría de las bacterias entéricas.
5. La actividad de los promotores de los genes *rpoH* en *S. flexneri*, *S. enterica*, *C. freundii*, *E. cloacae* y *K. pneumoniae* podría estar modulada por las proteínas reguladoras CRP, DnaA, CytR y AraC.
6. La regulación de la actividad de los promotores de *rpoH* en *E. amylovora*, *Y. enterocolitica* y *P. mirabilis* podría diferir importantemente de las bacterias anteriores.

REFERENCIAS

1. Allen, S. P., Polassi, J. O., Gierse, K. J. y Easton, A. M. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:6938-6947.
2. Baldini, R. L., Avedissian, M. y Lopes, S. 1998. The CIRCE element and its putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus* *groESL* operon. J. Bacteriol. 180:1632-1641.
3. Bardwell, J. C. A. y Craig, E. A. 1987. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5177-5181.
4. Becker, J., y Craig, E. A. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. Eur. J. Biochem. 219:11-23.
5. Braig, K., Otwinowski, Z., Hedge, R., Boisvert, D., Joachimiak, A., Horwick, A. y Sigler, P. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. Nature 371:578-586.
6. Bucca, G., Hindle, Z. y Smith, C. P. 1997. Regulation of the *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is governed by HspR, an autoregulatory repressor protein. J. Bacteriol. 179:5999-6004.
7. Buchberger, A., Theyssen, H., Schroder, H., McCarty, J. S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J. y Bukau, B. 1995. Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. J. Biol. Chem. 270:16903-16910.
8. Buchberger, A., Valencia, A., McMacken, R., Sander, C. y Bukau, B. 1994. The chaperon function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. EMBO J. 13:1687-1695.
9. Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. Mol. Microbiol. 9:671-680.
10. Confalonieri, F. y Duguet, M. 1995. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. BioEssays 17:639-650.

11. Connotly, L. , De las Peñas, A., Alba, B. M. y Gross, C. A. 1997. The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes Dev.* 11:2012-2021.
12. Cooper, S. y Ruettinger, T. 1975. A temperature sensitive nonsense mutation affecting the synthesis of a major protein of *Escherichai coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 139:167-176.
13. Chuang, S. E. y Blattner, F. R. 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:5242-5252.
14. Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G. R., Daniels, D. L. y Blattner, F. R. 1993. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslTS/fbpAB* and *hslUV* operons in *Escherichia coli*. *Gene* 134:1-6.
15. De las Peñas, A., Connolly, L. y Gross, C. A. 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Mol. Microbiol.* 24:373-385.
16. Emetz, D. y Klug, G. 1998. Cloning and characterization of the *rpoH* gene of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* 260:212-217.
17. Erickson, J. M. y Gross, C. A. 1989. Identification of the σ^E of *Escherichia coli* RNA polymerase: A second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* 3:1462-1471.
18. Erickson, J. M., Vaughn, V., Walter, W. A., Neidhardt, F. C. y Gross, C. A. 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* 1:419-432.
19. Fleischmann, R. D. et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
20. Frydman, J. y Hartl, F. U. 1994. Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. En: Morimoto, R., Tissieres, A. y Georgopoulos, C. (Eds.). *The Biology of the heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 251-283.
21. Gómez-Eichelmann, M. C y Helmstetter, C. H. 1999. Transcription level of operon *ftsYEX* and activity of promoter P1 of *rpoH* during the cell cycle in *Escherichia coli*. *J. Basic. Microbiol.* 39:237-242.

22. Gottesman, S. y Maurizi, M. R. 1992. Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* 56:492-621.
23. Gross, C. A. 1996. Function and regulation of the heat shock proteins. En: Neidhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington D. C. pp. 1382-1399.
24. Hartl, F. U. 1994. Secrets of double-doughnut. *Nature* 371:557-559.
25. Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P. y Wickner, W. 1990. The binding cascade of Sec B to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63:269-279.
26. Hecker, M., Schumann, W. y Volker, U. 1996. Heat-shock and general estress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19:417-428.
27. Hendrick, J. P. y Hartl, F. U. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62:349-384.
28. Herman, C., Thevenet, D., D'arl, R. y Bouloc, P. 1997. The HflB protease of *Escherichia coli* dégrades its inhibitor λ cIII. *J. Bacteriol.* 179:358-363.
29. Huang, L., Tseng, Y. y Yang, M. 1998. Isolation and characterization of the *Xanthomonas campestris rpoH* gene coding for a 32-kDa heat shock sigma factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 244:854-860.
30. Hughes, K. T. y Mathee, K. 1998. The anti-sigma factors. *Ann. Rev. Microbiol.* 52:231-286.
31. Hunt, J., Weaver, A., Landry, S., Gierasch, L. y Deisenhofer, J. 1996. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature* 379:37-45.
32. Jakob, U. y Buchner, J. 1994. Assisting spontaneity: the role of hsp90 and small hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19:205-211.
33. Kallipolitis, B. H. y Valentin-Hansen, P. 1998. Transcription of *rpoH*, encoding the *Escherichia coli* heat-shock regulator σ^{32} , is negatively controlled by the cAMP-CRP/CytR nucleoprotein complex. *Mol. Microbiol.* 29:1091-1099.

34. Karls, R. K., Brooks, J., Rossmeissl, P., Luedke, J. y Donohue, T. 1998. Metabolic roles of a *Rhodobacter sphaeroides* member of the σ^{32} family. *J. Bacteriol.* 180:10-19.
35. Kim, K. I., Woo, K. M., Seong, I. S., Lee, Z. W., Baek, S. H. y Chung, C. H. 1998. Mutational analysis of the two-bind sites in ClpB a heat shock protein with protein-activated ATPase activity in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 333:671-676.
36. Landick, R., Vaughn, V., Lau, E. T., VanBogelen, R. A., Erickson, J. W. y Neidhardt, F. C. 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell* 38:175-182.
37. Learnux, P. G., Heredeem, S. L., Bloch, P. L. y Neidhardt, F. C. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* 13:427-434.
38. Lee-Rivera, I. y Gómez-Eichelmann, M. C. 1994. *Escherichia coli* cells with mutations in the gene for adenylate cyclase (*cya*) exhibit a heat shock response. *FEMS Microbiol. Lett.* 121:35-38
39. Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. y Zylicz, M. 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2874-2878.
40. Liberek, K., Skwoyra, D., Zylicz, M., Johnson, C. y Georgopoulos, C. 1991. The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70 kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J. Biol. Chem.* 266:14491-14496.
41. Lin, Z. y Einsenstein, E. 1996. Nucleotide binding promoted conformational changes release a nonnative polypeptide from the *Escherichia coli* chaperonin GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1977-1981.
42. Lindquist, S. y Kim, G. 1996. Heat shock protein 104 expression is sufficient to thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5301-5306.
43. Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1151-1191.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

44. Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L. y Gross, C. A. 1989. Identification, characterization and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial viability only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* 171:1574-1584.
45. Lipinska, B., Zylicz, M. y Georgopoulos, C. 1990. The *htrA* (*degP*) protein, essential for *Escherichia coli* growth at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172:1791-1797.
46. Mager, W. H. y De Kruijff, A. J. J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59:506-531.
47. Martin, J., Mayhew, M., Langer, T. y Hartl, F. U. 1993. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature* 366:228-233.
48. Maurizi, M. R. 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia.* 48:178-201.
49. Mayhew, M., Da silva, A. C. R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Hartl, F. U. 1996. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379:420-426.
50. McCarty, J. S. y Walker, G. C. 1991. DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9513-9517.
51. McCarty, J. S., Rudiger, S., Schonfeld, H., Schneider-Mergener, J., Nakahigashi, K., Yura, T. y Bukau, B. 1996. Regulatory region C of the *E. coli* heat shock transcription factor, σ^{32} , constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J. Mol. Biol.* 256:829-837.
52. Mecsas, J., Rouviere, P. E., Erickson, J. W., Donohue, T. J. y Gross, C. A. 1993. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* 7:2618-2628.
53. Messer, W. y Weigel, C. 1997. DnaA initiator - also a transcription factor. *Mol. Microbiol.* 24:1-6.
54. Missiakas, D. y Raina, S. 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179:2465-2471.

55. Missiakas, D., Raina, S. y Georgopoulos. 1996. Heat shock regulation. En: Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Lin, E. C. C. y Lynch, A. S. (Eds). Chapman y Hall, New York. pp. 481-501.
56. Missiakas, D., Betton, J. M., y Raina, S. 1996. New components of protein folding in the extra-cytoplasmic compartments of *Escherichia coli*: SurA, FkpA, and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21:871-884.
57. Missiakas, D., Georgopoulos, C. y Raina, S. 1993. The *Escherichia coli* heat shock gene *htpY*: mutational analysis, cloning, sequencing, and transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 175:2613-2624.
58. Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J. M., Gergopoulos, C. y Raina, S. 1996. Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 24:6899-6909.
59. Missiakas, D., Mayer, M. P., Lemaire, M., Gergopoulos, C. y Raina, S. 1997. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol. Microbiol.* 24:355-371.
60. Missiakas, M. y Raina, S. 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 28:1059-1066.
61. Murai, N., Makino, Y. y Yoshida, M. 1996. GroEL locked in a closed conformation by an interdomain cross-link can bind ATP and polypeptide but cannot precess further reaction steps. *J. Biol. Chem.* 271:28229-28234.
62. Naczynski, Z. M., Mueller, C. y Kropinski, A. M. 1995. Cloning the gene for the heat shock response positive regulator (sigma 32 homolog) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 41:75-87.
63. Nagai, H., Yano, R., Erickson, J. W. y Yura, T. 1990. Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J. Bacteriol.* 172:2710-2715.
64. Nagai, H., Yuzawa, H. y Yura, T. 1991. Regulation of the heat shock response in *E. coli*: involvement of the positive and negative *cis*-acting elements in translational control of σ^{32} synthesis. *Biochimie* 73:1473-1479.

65. Nagai, H., Yusawa, H., Kanemori, M. y Yura, T. 1994. A distinct segment of the sigma 32 polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:10280-10284.
66. Nakahigashi, K., Yanagi, H. y Yura, T. 1995. Isolation and sequence analysis of *rpoH* genes encoding σ^{32} homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. Nucleic Acids Res. 23:4383-4390.
67. Nakahigashi, K., Yangi, H. y Yura, T. 1998. Regulatory conservation and divergence of σ^{32} homologs from gram-negative bacteria: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 180:2402-2408.
68. Narberhaus, F. 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. Mol. Microbiol. 31:1-8.
69. Narberhaus, F., Kaser, R., Nocker, A. y Hennecke, H. 1998. A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. Mol. Microbiol. 28:315-323.
70. Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H. y Hennecke, H. 1997. Three disparately regulated genes for σ^{32} -like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Microbiol. 24:93-104.
71. Neumann, D. y Nover, L. 1991. Heat shock-induced changes of cell ultrastructure. En: Nover, L. Heat shock response. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 346-371.
72. Nover, L. 1991. Inducers of HSP synthesis: heat shock and chemical stressors. En: Nover, L. Heat shock response. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 5-40.
73. Parsell, D. A. y Lindquist, S. 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. En: Morimoto, R. I., Tissieres, A. y Georgopoulos, C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 457-494.

74. Raina, S. y Georgopoulos, C. 1990. A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only at high temperatures. *J. Bacteriol.* 172:3417-3426.
75. Raina, S., Missiakas, D. y Georgopoulos, C. 1995. The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:1043-1055.
76. Ramírez-Santos, J. y Gómez-Eichelmann, M. C. 1998. Identification of σ^{32} -like factors and *ftsX-rpoH* gene arrangements in enteric bacteria. *Can. J. Microbiol.* 44:565-568.
77. Record, T. J. R., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. y Schlx, J. 1996. *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$) promoters, and the kinetics of the step of transcription initiation. En: Neidhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. E. (Eds). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington D. C. pp. 792-821.
78. Reisenauer, R. C., Mohr, C. D. y Shapiro, L. 1996. Regulation of the heat shock σ^{32} homolog in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 178:1919-1927.
79. Richarme, G. y Kohiyama, M. 1993. Specificity of the *Escherichia coli* chaperone DnaK (70-kDa heat shock protein) for hydrophobic amino acids. *J. Biol. Chem.* 268:24074-24077.
80. Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K. y Saibil, H. 1996. The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* 87:241-251.
81. Rouviere, P. E., De las Peñas, A., Mecsas, J., Lu, C. Z., Rudd, K. E. y Gross, C. A. 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:1032-1042
82. Sahu, G. K., Chowdhury, R. y Das, J. 1997. The *rpoH* gene encoding σ^{32} homolog of *Vibrio cholerae*. *Gene.* 189:203-207.
83. Sato, S. y Ishikawa, I. 1997. Expression and control of an operon from an intracellular symbiont which is homologous to the *groE* operon. *J. Bacteriol.* 179:2300-2304.

84. Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G. Y J. Buchner. 1994. Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle. *Science* 265:656-659.
85. Segal, G. Y Ron, E. Z. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 138:1-10.
86. Skwoyra, D. y Wickner, S. 1995. GrpE alters the affinity of DnaK for ATP and Mg^{2+} . *J. Biol. Chem.* 270:26282-26285.
87. Snyder, L. y Champness, W. 1997. Global regulatory Mechanisms. En: *Molecular Genetics of Bacteria*. American Society for Microbiology. Washington D. C. pp. 298-334.
88. Somero, G. N. 1995. Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* 57:43-68.
89. Squires, C. L., Pedersen, S., Ross B. M. y Squires, C. 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* 173:4254-4262.
90. Strauss, D. B., Walter, W. y Gross, C. A. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature.* 329:348-351.
91. Szyperski, T., Pellecchia, R., Wall, D., Georgopoulos, C. y Wuthrick, K. 1994. NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11343-11347.
92. Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A. J., Openheim, A. B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., Hiragata, S. y Ogura, T. 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 14:2551-2560.
93. Ueguchi, C. y Ito, K. 1992. Multicopy supression: an approach to undestanding intracellular functioning of the protein export system. *J. Bacteriol.* 174:1454-1461.
94. VanBogelen, R. A. y Neidhardt, F. C. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5589-5593.
95. Wang, Q. y Kaguni, J. M. 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:4248-4253.

96. Wawrzynow, A., Wojthowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C. y Zylicz, M. 1995. The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J.* 14:1867-1877.
97. Weissman, J. S., Rye, H., Fenton, W., Beechem, J. y Horwick, A. 1996. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES mediated protein folding reaction. *Cell* 84:481-490.
98. Wojkowiak, D., Georgopoulos, C. y Zylicz, M. 1993. Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:22609-22617.
99. Wu, J. y Newton, A. 1996. Isolation, identification and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor σ^{32} from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 178:2094-2101.
100. Wu, J. y Newton, A. 1997. The *Caulobacter* heat shock sigma factor gene *rpoH* is positively autoregulated from a σ^{32} -dependent promoter. *J. Bacteriol.* 179:514-521.
101. Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y. y Yura, T. 1978. Transient regulation of proteins synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.* 134:1133-1140.
102. Yoo, S. J., Seol, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L. y Chung, C. H. 1996. Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271:14035-14040.
103. Yura, N., Nagai, H. y Mori, H. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 47:321-350.
104. Yura, T., Tobe, T., Ito, K. y Osawa, T. 1984. Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6803-6807.
105. Yusawa, H., Nagai, H., Mori, H. y Yura, T. 1993. Heat induction of σ^{32} synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 23:5449-5455.

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