

Regulación Genética en la Respuesta al Estrés Calórico en *Escherichia coli*

JESÚS RAMÍREZ SANTOS, GLORIA SOLÍS GUZMÁN Y M. CARMEN GÓMEZ EICHELMANN*

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apto Postal 70-228, 04510 México, D.F. México. Teléfono: 5622-38-52. FAX: 5622-38-91

*Autora para la correspondencia Email cargom@servidor.unam.mx

ABSTRACT. 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). The main HSPs, chaperones and proteases, are constituents of the cellular machinery of protein folding, translocation, repair and degradation. The bacteria *Escherichia coli* has been a paradigm regarding heat shock gene expression in prokaryotes. In this bacterium, the expression of the HSPs is regulated at the transcriptional level. The approximately 40 genes that encode the HSPs define the heat-shock stimulon. 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* and *rpoE*, are regulated by σ^E , encoded by *rpoE*. The cytoplasmic response to heat is regulated by σ^{32} , while that of the periplasm is regulated by σ^E . The expression of both regulons is interconnected, since σ^E regulates the transcription of *rpoH* at high temperatures. The activity of these σ factors, under non-stress and stress conditions, depends upon negative and positive regulatory mechanisms acting at different levels: transcription, translation, half-life and activity of the factors. Models for the regulation of the cytoplasmic and periplasmic response to heat in *E. coli* are presented.

Key words. heat-shock proteins, *Escherichia coli*, caloric stress.

RESUMEN. Las células de prácticamente todos los organismos responden a un aumento brusco de temperatura y a otros cambios ambientales con un aumento transitorio en la concentración celular de un conjunto de proteínas denominadas proteínas de estrés calórico (PEC). Las principales PECs, chaperonas y proteasas, son parte de la maquinaria celular de plegamiento, transporte, reparación y degradación de las proteínas. La bacteria *Escherichia coli* representa un paradigma en el estudio de la expresión de los genes del estrés calórico en los procariotes. En *E. coli* la expresión de las PEC se regula principalmente a nivel de la transcripción. Los mas de 40 genes que codifican para las PEC definen al estimulón de estrés calórico. La mayoría de estos genes están positivamente regulados por el factor de transcripción σ^{32} codificado por *rpoH*, mientras que aproximadamente 10 genes, incluyendo *rpoH* y *rpoE*, están regulados por σ^E codificado por *rpoE*. La respuesta citoplásmica al calor esta regulada por σ^{32} , mientras que la del periplasma se regula por σ^E . Las dos respuestas están interconectadas, ya que σ^E regula al gene de σ^{32} a altas temperaturas. La actividad de los dos factores σ , tanto en condiciones normales como de estrés, esta regulada a diferentes niveles: transcripción, traducción, vida media y actividad de los factores. En esta revisión se presentan los modelos de regulación genética de la respuesta al calor en *E. coli* en el citoplasma y en el periplasma.

Palabras clave. Proteínas de choque térmico, Estrés calórico, *Escherichia coli*

INTRODUCCIÓN

Las células de todos los organismos tienen la propiedad de responder a cambios en el ambiente, con cambios en la expresión de un conjunto específico de genes.

En las bacterias, el conjunto de genes que modifica su nivel de expresión en respuesta a un cambio ambiental, constituye un Sistema Global de Regulación, SGR o "estimulón". Los SGR les permiten a las bacterias mante-

ner la coordinación entre un metabolismo eficiente de nutrientes, la replicación del DNA y la división celular para reproducirse en diferentes condiciones ambientales o bien para mantener la capacidad de recuperar el crecimiento al cesar las condiciones adversas.

Un SGR esta constituido por una red de regulones que se expresan de manera coordinada en respuesta a un estímulo ambiental. Un regulón comprende a un conjunto de genes aislados y genes organizados en operones que codifi-



can para funciones distintas, se localizan en sitios diferentes del genoma y tienen un regulador común. El regulador generalmente es una proteína que se une a secuencias específicas de DNA que se localizan en la región reguladora de los genes para inducir o reprimir su transcripción.^{4,63}

El estímulo ambiental puede afectar la estructura y función de moléculas y organelos celulares. Estas moléculas y organelos blanco funcionan como sensores del estímulo, ya que al modificarse generan señales que pasan de manera directa, o a través de uno o más transductores, al regulador para producir cambios específicos en la expresión genética. Los cambios en la concentración y actividad de las moléculas codificadas por los genes del SGR constituyen la respuesta celular. La respuesta, a su vez, establece un circuito de retro-alimentación que modula la intensidad y duración de ésta. Este circuito permite que el sistema genético se estabilice, ya sea a un nivel de expresión similar al de antes del estímulo, o a un nuevo nivel más adecuado para la nueva condición ambiental⁴.

En las bacterias, los SGR más estudiados son: El de respuesta al daño en el DNA (sistema SOS) y los de respuesta a cambios en la temperatura, pH, osmolaridad, tensión de oxígeno y nutrientes.

En esta revisión se presenta la regulación genética de la respuesta a un incremento brusco de temperatura o estrés calórico (EC) en la bacteria *Escherichia coli* K12.

El conocimiento acumulado por más de 30 años sobre la bioquímica, genética y fisiología de esta bacteria la coloca como el organismo del cual se tiene más información biológica. Por ello, *E. coli* K12 constituye un modelo experimental poderoso para el estudio de la genética molecular de los SGR.

LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS CALÓRICO

La respuesta celular a un aumento brusco de temperatura la describió por primera vez F. Ritossa en 1962 en la mosca *Drosophila melanogaster*. Ritossa observó que si la mosca se expone a una temperatura 5°C por arriba de la temperatura normal de cultivo, se inducen ensanchamientos ("puffs") específicos en los cromosomas de las glándulas salivales.⁶⁰ Doce años después, en 1974, el grupo de A. Tissières demostró que estos ensanchamientos se acompañan de un aumento en la síntesis *de novo* de un grupo específico de proteínas.⁶⁶

Actualmente se sabe que la respuesta celular a un aumento brusco de temperatura o estrés de calor (EC) es una respuesta evolutivamente conservada en bacterias, arqueas y eucariontes. El EC induce un incremento rápido y transitorio en la síntesis de un grupo altamente conservado y específico de proteínas conocidas como proteínas de estrés calórico (PEC). Las principales PEC son chaperonas que catalizan el plegamiento correcto de las proteínas y proteasas que degradan a proteínas desplegadas. Las PEC son importantes para la célula, tanto en condiciones normales

de crecimiento, como en situaciones de estrés.^{5,18,42,73}

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

En los 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 que en organismos que crecen en un intervalo de temperatura restringido, la respuesta máxima ocurre alrededor de 5°C arriba de la temperatura óptima.^{5,49,73}

El EC, además de inducir un incremento en la síntesis de las PEC, modifica de manera general la estructura y la fisiología celular. Por ejemplo, el EC modifica la fluidez membranar, la topología e integridad del DNA, la estructura de las proteínas, la organización del citoesqueleto y de los ribosomas, etc.^{5,6,35,50}

Además del calor, hay otros estímulos capaces de inducir la síntesis de las PEC. Estos estímulos incluyen, entre otros, a infecciones por virus, radiaciones ultravioleta, cambios en osmolaridad, oxigenación, pH y nutrientes, presencia de sustancias tóxicas como etanol, metales pesados y algunos antibióticos. Cada estímulo determina una respuesta particular en cuanto a nivel de inducción, cinética y PEC que induce. El inductor más potente es el calor mismo, el cual induce la expresión de todo el repertorio de PEC, mientras que la mayoría de los otros estímulos inducen la expresión de sólo algunas de estas proteínas.^{24,51,69}

Los mecanismos de inducción de una respuesta celular similar al EC por otros estímulos aún no son claros. Los datos experimentales apoyan la propuesta de que todos estos estímulos generan cambios en la conformación de las proteínas y por tanto una señal común. Sin embargo, no se excluye que las modificaciones que se presentan en otras moléculas y estructuras celulares (DNA, membrana, ribosomas) actúen también como señales para responder al estímulo.^{5,68}

LA RESPUESTA AL ESTRÉS CALÓRICO EN *E. coli* K12

La respuesta al EC en bacterias se descubrió en 1978 en *Escherichia coli* K12. El primer paso en este descubrimiento lo dieron S. Cooper y R. Ruettinger en 1975, al aislar una cepa mutante de *E. coli* afectada en la síntesis de una proteína, GroE, esencial para el crecimiento a alta tem-

peratura.⁹ En 1978 los grupos de F. Neidhardt y T. Yura de manera independiente demostraron que en una cepa silvestre de *E. coli* el EC induce un aumento transitorio en la síntesis de varias proteínas con un peso molecular similar a las proteínas descritas para la respuesta a EC en *D. melanogaster*. Al comparar la síntesis de proteínas durante un EC en la cepa silvestre y en la mutante de Cooper y Ruettinger, se observó que en la mutante no se presentaba este aumento. Este resultado sugirió que la mutación afectaba a un regulador de la respuesta al EC.^{27,72} La caracterización del gene para este regulador permitió identificar al primer factor sigma alternativo en *E. coli*: σ^{32} .^{19,25} Este factor, codificado por el gene *rpoH* (*htrP*), dirige la unión de la RNA polimerasa a promotores específicos presentes en muchos de los genes de EC para su transcripción.

La presencia de la respuesta al EC en una bacteria fue una sorpresa, ya que se consideraba exclusiva de organismos más complejos. Este hallazgo permitió avanzar rápidamente en el conocimiento del sistema genético de regulación de esta respuesta, no sólo en bacterias, sino en otros organismos.

En células de *E. coli* que crecen en medio rico, el cambio rápido de una temperatura de 30°C a 42-43°C produce un aumento en la síntesis de las PEC y un aumento menor en la síntesis del resto de las proteínas. El cambio a temperaturas más elevadas, 45-47°C, causa una disminución en la síntesis de las proteínas generales y un aumento importante en las PEC. Finalmente, el cambio a 50°C, una temperatura letal, induce la represión casi total de la síntesis de las proteínas generales y un gran incremento en la síntesis de las PEC.^{5,49}

El aumento de algunas de las PEC protege transitoriamente a las células de la exposición a temperaturas letales. Por ejemplo, si *E. coli* se expone por un tiempo corto a 42°C y luego a 50°C, el porcentaje de células que sobreviven es mayor al de las células que se pasan directamente de 30°C a 50°C. Este fenómeno llamado termotolerancia esta presente en las células de todos los organismos.⁵⁴

Las bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, tienen dos membranas celulares, una interna y otra externa. Estas membranas limitan a dos compartimientos celulares con propiedades diferentes: el citoplasma que es un medio osmóticamente estable, reductor y con capacidad energética y el periplasma que es oxidante y no tiene ATP.⁵² Esto determina que en estas bacterias existan sensores y mecanismos de transducción de señales específicos para cada compartimiento.

En *E. coli* el SGR de EC está integrado por dos regulones definidos por los factores sigma alternativos, σ^E (σ^{24}) y σ^{32} . Estos regulones coordinan la expresión de más de 40 genes dispersos en el cromosoma que codifican a las PEC (Tabla 1). El regulón de σ^{32} se induce por señales que se generan en el citoplasma y el de σ^E por señales periplásmicas. El primero regula aproximadamente 26 genes y el segundo alrededor de 10.^{5,7,12,42}

Además de estos dos regulones, con un método de aná-

Tabla 1. Principales proteínas de estrés calórico de *Escherichia coli* K12¹⁸

Regulón σ^{32}	Regulón σ^{32}	Regulón σ^E
Chaperonas	Enzimas Metabólicas	Proteasas
ClpA, ClpB, ClpX	GADPH	DegP
DnaK, DnaJ, GrpE	HtrM (RfaD)	Reguladores
HtpG	Otras	σ^E
IbpA, IbpB	TopI	σ^{32}
GroEL, GroES	Función desconocida	RseA
Proteasas	FtsJ	RseB
ClpPA	HslA	RseC
ClpPX	HslC	Otras
FtsH (HflB)	FtsH (HflB)	FtsH (HflB)
HslVU (ClpQY)	HtpX	
Lon	HslO	
Reguladores	HslP	
HtpY	HslW	
σ^{70}	HslX	
HtrC	HslY	
	HslZ	

lisis global comparativo de la expresión genética de *E. coli* se detectaron 119 genes que modifican su expresión durante un EC de 50°C. En este análisis se amplificaron fragmentos específicos de DNA que cubren todo el genoma de la bacteria con la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR), se unieron de manera ordenada a una membrana y se hibridaron con cDNA radioactivo. La membrana constituye lo que se conoce como micro-arreglo genómico ("microarray"). En este estudio se identificaron a la mayoría de los genes ya descritos para los regulones de σ^E y σ^{32} , así como a genes nuevos y 35 marcos de lectura para los cuales no hay aún genes designados. Los reguladores de la expresión de estos genes se desconocen.⁵⁹

EL REGULÓN σ^E DE LA RESPUESTA PERIPLÁSMICA AL ESTRÉS CALÓRICO EN *E. coli* K12

El regulón σ^E está formado por 7 genes: *degP* (*htrA*), *fkpA*, *rpoE*, *rseA*, *rseB*, *rseC* y *rpoH*; aunque la sobreex-



presión de σ^E induce la expresión de por lo menos 10 proteínas^{11,39,42,73}. Las secuencias -35 y -10 de los promotores para σ^E en estos genes son diferentes a las de los otros factores σ (Tabla 2). El gene *degP* codifica para una endopeptidasa periplásmica esencial para el crecimiento celular por arriba de 42°C²⁹ y *fkpA* para una peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa que es importante para el recambio y plegamiento de las proteínas del periplasma.^{38,40} Los genes *rseA*, *rseB*, *rseC* codifican para proteínas reguladoras de la actividad de σ^E .^{11,39} Este factor regula la transcripción de su propio gene, *rpoE*, y la del regulador de la respuesta citoplásmica al EC, *rpoH*. Esto hace que exista una regulación coordinada entre los dos principales regulones de la respuesta al EC. El regulón de σ^E se induce por EC y por otros estímulos como etanol e hiperosmolaridad.⁷³

La actividad de σ^E aumenta en respuesta a señales que se generan extracitoplásmicamente. Por ejemplo, la sobre-producción de las proteínas de la membrana externa *OmpC*, *F*, *K*, *T* y *X*, del periplasma como *AsnB* y *PBP2* o de la membrana interna como *DsbD* inducen la respuesta celular dependiente de σ^E .^{34,41} La sobre-producción de *DsbD*, una tiol-disulfato reductasa, probablemente causa la acumulación de polipéptidos reducidos con un plegamiento incorrecto en un medio oxidante como el periplasma.⁴⁰ Esta respuesta se induce también en cepas mutantes en los genes *dsb*, *fkpA*, *htrM* (*rfaD*), *skp* y *surA*.³⁸ Las proteínas *Dsb*, *FkpA* y *SurA* son importantes para el plegamiento correcto de las proteínas del periplasma, *Skp* asiste el plegamiento e inserción de las OMPs en la membrana externa, mientras que *HtrM* (*RfaD*) participa en la síntesis de los lipopolisacáridos. Esta última proteína es importante para asegurar una proporción correcta de las OMPs en la membrana externa.³⁸ Finalmente, también se observó la inducción del regulón σ^E en una mutante *ompC* en la cual la proteína *OmpC* mutada no se inserta en la membrana externa e interfiere con la inserción de otras proteínas OMPs. Sin embargo, en mutantes *secB* que acumulan proteínas precursoras de las OMPs en el citoplasma no se induce este regulón.³⁴ Estas observaciones muestran que la señal se genera después que las proteínas del periplasma y las OMPs atraviesan la membrana interna y antes de que las OMPs se inserten en la membrana externa. Esta señal puede ser la acumulación en el periplasma de proteínas precursoras de las OMPs y de proteínas propias del periplasma parcialmente plegadas.

La regulación del aumento en la actividad de σ^E en la respuesta al EC es compleja e involucra tanto regulación positiva a nivel de la transcripción de *rpoE* como negativa a nivel post-transcripcional.

Autoregulación positiva de la transcripción del gene *rpoE*. La transcripción del gene *rpoE* se inicia en dos sitios diferentes. El promotor P2 determina la transcripción que se origina a partir del sitio proximal al codón de inicio del gene. Este promotor tiene secuencias -35 y -10 similares a otros promotores de σ^E . Las secuencias correspondientes al promotor distal P1 no se pudieron identificar, ya que en

esta región promotora no hay secuencias similares para σ^{70} , σ^{32} , o σ^E y tampoco se logró la transcripción desde el sitio distal con la RNA polimerasa y σ^{70} o σ^E . La cantidad del mRNA de P1, a diferencia del de P2, disminuye con el incremento de la temperatura, por lo que la regulación de *rpoE* a temperaturas altas depende exclusivamente de su autoregulación positiva a través del P2.^{55,61}

Regulación negativa post-transcripcional de la actividad de σ^E . El análisis de la secuencia y los estudios de la transcripción del locus *rpoE* mostraron que este gene está organizado en un operón con los genes *rseABC* ("regulator of σ E").^{11,39} Estos genes codifican a tres proteínas de peso molecular pequeño involucradas en la actividad de σ^E . La proteína de la membrana interna *RseA* de 27 kDa tiene una función anti- σ^E que depende de su interacción directa con este factor. El análisis topológico de *RseA* muestra que esta proteína tiene un dominio transmembranal único con el extremo N-terminal en el citoplasma y el C-terminal en el periplasma. *RseA* se une al σ^E presente en el citoplasma a través del dominio N-terminal y de esta manera inhibe su actividad transcripcional (Fig. 1). La actividad de *RseA* esta modulada a su vez por la proteína periplásmica *RseB*. Esta proteína de 33 kDa regula negativamente la actividad de σ^E a través de su interacción con el dominio Gterminal de *RseA* (Fig. 1). *RseA* se degrada rápidamente en respuesta al EC,¹ lo que produce un aumento en la poza libre de σ^E en el citoplasma y con ello el incremento en la transcripción de los genes del regulón σ^E . En el caso de la proteína *RseC* de 17 kDa de membrana interna se sabe que tiene un efecto menor y positivo sobre la actividad de σ^E únicamente en ausencia de *RseB*. El mecanismo por el cual *RseC* ejerce este efecto positivo sobre σ^E aún se desconoce.^{11,39} Recientemente se propuso que la degradación de *RseA* es por la serin-proteasa *DegS* que se localiza en la membrana interna.¹

Modelo de la regulación genética de la respuesta periplásmica al estrés calórico por σ^E . Un modelo para explicar la activación de σ^E por un EC (Fig. 1) propone que en las células en condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de este factor se encuentra inactivo en el complejo *RseA*/ σ^E . El EC induce que las moléculas sensoras, proteínas OMPs y periplásmicas, se desdoblén y generen la señal. El transductor de esta señal puede ser *RseB*, como se propuso originalmente y/o la proteasa *DegS* como sugieren reportes más recientes.^{1,11,39} *RseB* al reconocer y unirse a las proteínas semi-plegadas deja libre a *RseA* lo que favorece su degradación por *DegS*. Finalmente la señal se transduce al regulador σ^E a través de la degradación de *RseA*, lo que causa que σ^E se libere en el citoplasma e induzca un incremento en la transcripción de los genes de su regulón. Este incremento induce un aumento en la transcripción del operón *rpoE rseABC*, de *rpoH* y de los genes para las proteínas *FkpA* y *DegP*. El incremento en la transcripción de *rpoH*, y por tanto de los genes de su regulón, coordina la respuesta periplásmica con la citoplásmica

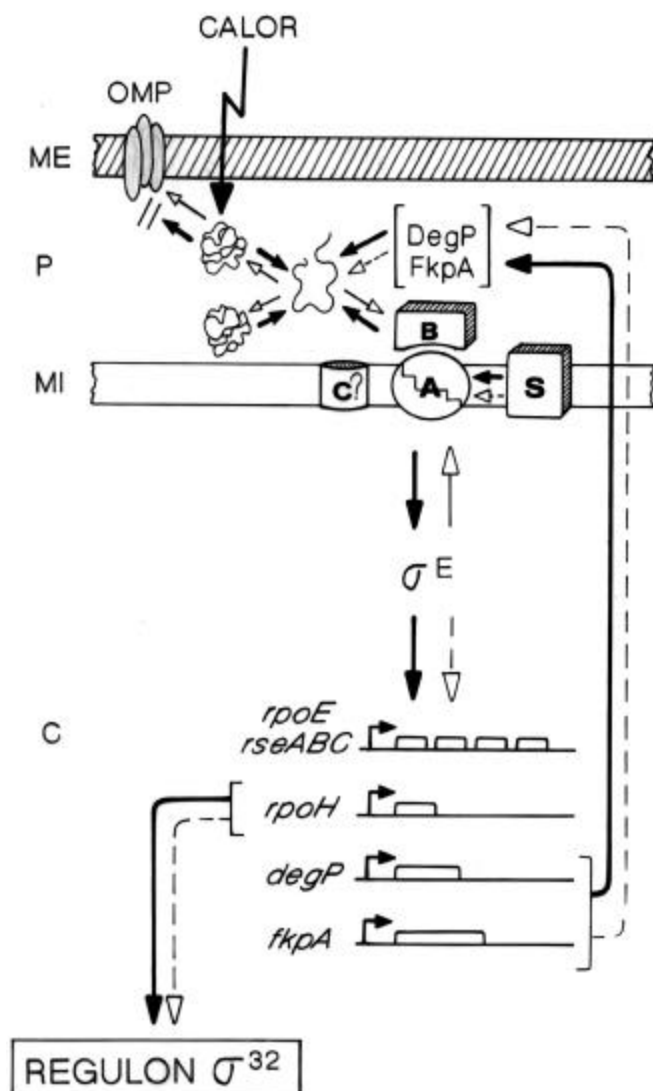


Fig. 1. Modelo de la regulación genética de la respuesta periplásmica al estrés calórico en *E. coli*. El aumento súbito de temperatura (calor) se sensa principalmente por las proteínas periplásmicas. El despliegue de las proteínas por el efecto del calor genera la señal que se transduce al regulador σ^E a través de la proteína periplásmica RseB (B) y de la proteína membranal anti- σ^E RseA (A). La función reguladora de la proteína membranal RseC (C) no se conoce. El aumento inicial en la actividad de σ^E se produce por: a) disminución de la interacción entre las proteínas A y B debido a la unión de B a las proteínas desplegadas y b) aumento en la degradación de A por la proteasa membranal DegS (S). Esta cadena de reacciones produce la liberación de σ^E y con ello la transcripción de los genes regulados por este factor, como su propio gene, *rpoE*, y el gene para σ^{32} . OMP, proteínas de membrana externa; ME, membrana externa; P, periplasma; MI, membrana interna; C, citoplasma. (→, ---) y (→) representan la dirección de la reacción durante condiciones de no estrés y de estrés calórico, respectivamente. Las flechas discontinuas representan reacciones menos activas que las de las continuas.

Tabla 2. Secuencias consenso de los promotores de los factores de *E. coli* K12 que participan en la respuesta al estrés calórico.⁴²

Holoenzima ^A	Sitio -35 ^B	Espaciador	Sitio -10 ^B
Es ⁷⁰	TTGACA	16-18 pb	TATAAT
Es ³²	CTTGAA	13-15 pb	CCCCATNT _C
Es ^E	GAACCT	16 pb	TCTGA

^A, Holoenzima: RNA polimerasa (E) y un factor σ ; ^B, Los sitios se enumeran en relación a la posición +1 que representa el inicio de la transcripción; ^C, N: A, T, C o G.

(Fig. 1).

El aumento en la concentración de FkpA y DegP, al favorecer el plegamiento o la degradación de las proteínas periplásmicas dañadas por el calor, disminuye la intensidad de la señal. RseB se une a la proteína RseA recién sintetizada y ésta, a su vez, se une a σ^E con lo que disminuye la actividad de este factor (Fig. 1). Esta cascada de eventos finalmente estabiliza el sistema genético en un nivel de expresión característico de la nueva temperatura.^{1,11,39,41,73}

En este modelo no se ha involucrado como posible sensor a la membrana; sin embargo, los cambios en fluidez membranal que acompañan al EC³⁵ podrían contribuir a la activación de la proteasa DegS.

Es importante mencionar que además del regulón de σ^E existen otros sistemas genéticos específicos para la respuesta extracitoplásmica al estrés. Uno de ellos es el sistema de transducción de señales de dos componentes CpxA/CpxR. Este sistema responde a un aumento de pH en el medio y a alteraciones en la integridad de la envoltura celular a través de CpxA, una cinasa/fosfatasa de membrana interna que actúa como sensor y que fosforila al regulador CpxR. CpxR a su vez activa la transcripción de *degP* mediada por la RNA polimerasa- σ^E y la de *dsbA* y otros genes de los que se desconoce su función. DegP, como ya se mencionó, es una proteasa esencial a altas temperaturas, mientras que DsbA cataliza la formación de puentes disulfuro de las proteínas y por tanto es importante en el plegamiento de éstas. Los datos experimentales con mutantes en *cpxA* sugieren que estos dos sistemas de respuesta extracitoplásmica no detectan y regulan funciones iguales y que únicamente se solapan en la inducción de DegP.⁸

EL REGULÓN σ^{32} DE LA RESPUESTA CITOPLÁSMICA AL ESTRÉS CALÓRICO EN *E. coli* K12

El primer regulón de EC que se describió fue el de σ^{32} . El factor de transcripción σ^{32} de 32 kDa está codificado por el gene *rpoH* y reconoce promotores específicos (Tabla



2). Este factor es muy importante para la respuesta al EC en el citoplasma ya que la intensidad de la respuesta depende fundamentalmente de su concentración celular.⁶⁴ Inicialmente, los estudios genéticos y la comparación de patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida de proteínas marcadas radiactivamente en condiciones control y de EC identificaron alrededor de 5-8 PEC.¹⁰ Los patrones de estas proteínas en geles de dos dimensiones permitieron aumentar el número a 17.⁴⁹ Posteriormente el análisis de la transcripción global de una biblioteca génica clonada en fagos λ (Banco de Kohara) permitió identificar a la mayoría de los genes ya descritos y a 26 nuevos genes.⁷ Entre los genes del regulón se encuentran los de las principales chaperonas ClpB, DnaK, GroE, HtpG, IbpA y IbpB; los de las proteasas dependientes de ATP, ClpPA, ClpPX, FtsH (HflB), Lon, y HslVU (ClpQY); genes reguladores como *rpoD*, *htpY* y *htrC*; genes para enzimas como *gap* (GADPH gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), *rfaD* (DL-glicero-D-manoheptosa epimerasa) y *topA* (topoisomerasa I) y varios de función desconocida^{18,42,59} (Tabla 1).

El regulón de σ^{32} se induce total o parcialmente en respuesta a varios estímulos. Entre ellos esta el EC, la hiperosmolaridad, infecciones por fagos, luz ultravioleta, y la presencia de sustancias tóxicas como etanol, agua oxigenada y antibióticos que inhiben la traducción o a la enzima girasa^{5,30,68,69}

Función de las principales proteínas del regulón σ^{32} . Las principales PEC son chaperonas, proteasas y proteínas reguladoras. Las chaperonas moleculares se definen como proteínas que interaccionan de manera transitoria y no covalente con otras proteínas. La función de estas proteínas es favorecer el plegamiento correcto y el transporte de proteínas, mediar el ensamble y desensamble de complejos multiproteicos, presentar proteínas a las proteasas para su degradación y prevenir la agregación y desagregar a las proteínas bajo condiciones de estrés. Las proteasas son enzimas ATP-dependientes que en condiciones normales de crecimiento regulan la degradación de proteínas en general y de algunos reguladores en especial para asegurar el recambio de proteínas y la concentración adecuada de estos reguladores y que en condiciones de estrés degradan proteínas dañadas^{16,17,18,21,71}

a. Chaperonas. La proteína ClpB funciona como chaperona, mientras que ClpA y ClpX pueden funcionar aisladas como chaperonas y en unión con ClpP como proteasas ClpPA y ClpPX, respectivamente (ver más adelante).²¹

La actividad de la chaperona DnaK esta dada por tres PEC: DnaK de 70 kDa, DnaJ de 41 kDa y GrpE de 23 kDa. Los genes para DnaK y DnaJ estan organizados en el operón *dnaKJ*, mientras que el gene *grpE* se localiza en otro sitio del genoma. DnaK pertenece a la familia de chaperonas Hsp70 que es una de las más conservadas evolutivamente. Esta proteína contienen tres dominios: El amino terminal contiene el sitio de unión para ATP, magnesio y GrpE; el carboxilo proximal el sitio de unión del péptido

sustrato y el carboxilo distal posiblemente es el sitio de unión a DnaJ.^{17,18,71} DnaK se une preferentemente a aminoácidos hidrofóbicos como isoleucina, leucina, valina y fenilalanina, los cuales quedan expuestos al desplegarse las proteínas.⁵⁸ DnaK tiene una actividad de ATPasa dependiente de temperatura y es capaz de autofosforilarse.³³ La actividad de ATPasa, esencial para la función de la chaperona, está regulada por las co-chaperonas DnaJ y GrpE y por su sustrato, las proteínas desplegadas.²⁸

HtpG es una chaperona homóloga a la Hsp90 de los eucariontes. La pérdida de este gene no afecta el crecimiento de la bacteria excepto a temperaturas muy altas. Esto sugiere que HtpG es dispensable a temperaturas intermedias ya que otras chaperonas pueden sustituirla.⁴²

Las proteínas IbpA e IbpB son chaperonas pequeñas que durante el EC se unen a proteínas desplegadas y forman unas estructuras denominadas "cuerpos de inclusión".¹⁸

La actividad de la chaperona GroE depende de dos proteínas: GroEL de 60 kDa y GroES de 12 kDa cuyos genes forman el operón *groESL*. Este operón, además de un promotor para σ^{32} , tiene un promotor tipo σ^{70} . GroESL pertenece a la familia Hsp60 o familia de las chaperoninas, la cual está también muy conservada en los organismos. GroEL presenta un dominio de unión de ATP, tiene actividad de ATPasa y funcionalmente actúa como una proteína oligomérica compuesta de dos anillos de siete subunidades cada uno. GroES se organiza en un heptámero en forma de domo y funciona como "tapadera" de las aberturas del cilindro que forman los dos anillos de GroEL. El volumen de este cilindro sufre modificaciones importantes durante la catálisis. El complejo GroEL₁₄-GroES₇ interacciona con polipéptidos desplegados para favorecer su plegado correcto (17,18,21,71). El modelo actual propone que el polipéptido desplegado se introduce al cilindro y regresa a su estado nativo después de varios ciclos de unión y liberación de este complejo.³¹ La actividad catalítica de esta chaperona depende de ciclos de unión e hidrólisis de ATP a las subunidades GroEL de uno y luego del otro anillo, así como de la unión del sustrato y de GroES a los anillos de GroEL.^{17,21,31}

b. Proteasas. Las proteínas Clp pertenecen a una familia altamente conservada de proteasas dependientes de ATP. Estas proteínas en su forma activa están formadas por subunidades catalíticas y de reconocimiento. Por ejemplo, la proteasa ClpPA esta formada por subunidades catalíticas ClpP y de reconocimiento de sustrato ClpA. ClpP se asocia también con ClpX para constituir una proteasa con especificidad diferente a ClpPA.^{16,21} La estructura de estas proteasas es similar a la de GroE; es decir, están formadas por anillos de varias subunidades que forman una cavidad donde se degrada la proteína. En el caso de ClpPA, la proteasa esta formada por dos anillos centrales de 7 subunidades de ClpP y un anillo de 6 subunidades de ClpA en cada uno de los extremos del cilindro de ClpP.²¹ Las subunidades ClpA y ClpX pueden funcionar aisladas como chaperona

nas típicas.¹⁷ La proteasa HslVU (ClpQY) pertenece también a esta familia; en este caso HslV (ClpQ) es la unidad catalítica y HslU (ClpY) la de reconocimiento. La especificidad del sustrato de esta proteasa es similar a la de Lon.¹⁶

La proteasa FtsH es una proteína de membrana interna que pertenece a la familia de ATPasas tipo AAA ("ATPasas associated to a variety of cellular activities"). Esta proteasa participa en el ensamblaje de proteínas a la membrana interna, en la exportación de proteínas y en la degradación del factor σ^{32} .⁶⁷

La serin-proteasa Lon es una de las principales proteasas para el recambio normal de las proteínas, degradación específica de algunos reguladores y degradación de proteínas dañadas por el EC. La forma activa de esta proteasa es un homotetrámero.³⁸

c) Proteínas reguladoras. El gene *htpY* se localiza a 700 pares de bases (pb) del extremo 3' del operón *dnaKJ* y codifica para una proteína de 21 kDa. Esta proteína regula positivamente la expresión de las PEC modificando el nivel y/o la actividad de σ^{32} .⁴²

El gene *rpoD* codifica para el factor σ^{70} . Este factor reconoce a los promotores de los genes involucrados en la mayoría de las funciones celulares. La secuencia consenso para este factor se muestra en la Tabla 2.

El gene *htrC* es un regulador del cual se desconoce la función.⁴²

d. Enzimas. Entre las enzimas cuyos genes tienen promotores para σ^{32} se encuentran enzimas metabólicas como GADPH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) y RfdA (DL-glicero-D-manoheptosa epimerasa) y la topoisomerasa I codificada por *topA*.^{42,67} Esta última enzima cataliza el relajamiento de moléculas de DNA superenrolladas.¹⁴ La función de estas enzimas en el EC no está clara.

Regulación de la actividad celular de σ^{32} . Un aumento rápido de temperatura induce un incremento de 3 a 5 veces en la transcripción de *rpoH*. Sin embargo, este aumento no explica el incremento de 15-20 veces en la actividad de σ^{32} durante el EC. Actualmente se sabe que la regulación de la actividad de este factor se lleva a cabo a nivel de la transcripción y traducción del gene *rpoH*, así como de la vida media y actividad de este factor.^{5,13,73}

Regulación de la transcripción del gene *rpoH*. La región reguladora de *rpoH* de aproximadamente 250 pb contiene 4 promotores. Los promotores P1, P4 y P5 son reconocidos por σ^{70} y P3 por σ^E (Fig. 2). A 30°C aproximadamente el 90% del mRNA de *rpoH* corresponde a P1 y P4. A 43.5°C, la transcripción a partir de los promotores P1 y P4 sube ligeramente y la de promotor P3 aumenta de manera importante. A 50°C, la transcripción de los promotores P1 y P4 disminuye gradualmente mientras que la de P3 se mantiene elevada hasta por 85 minutos. El promotor distal P1 se localiza dentro del terminador del operón de división celular *ftsYEX* y es el más fuerte en condiciones normales.¹³ La sobreposición del terminador y P1 aparentemente no afecta la actividad del promotor.¹⁵ P1 es más activo en DNA relajado, mientras que P4 lo es en DNA

superenrollado.³⁰ El promotor P5 es un promotor débil regulado principalmente por la fuente de carbono presente en el medio.⁴⁵

Además de los 4 promotores, la región reguladora de *rpoH* presenta sitios de unión para proteínas reguladoras de la transcripción como son: dos cajas CRP ("cyclic AMP receptor protein"), dos DnaA y una CytR (Fig. 2).^{23,45,70}

La ausencia de glucosa en el medio causa que la concentración celular de cAMP aumente y con ello la cantidad del complejo CRP-cAMP. En estas condiciones, la unión del complejo al sitio CRP1 favorece la transcripción a partir del promotor P5, pero interfiere con la del P4, lo que sugiere una alternancia entre estos promotores.⁴⁵ El promotor P5 probablemente es un promotor secundario, ya que las mutantes en el gene que codifica para la adenil-ciclase, *cya*, pueden responder a un EC.²⁶

Las dos cajas DnaA se identificaron a partir del análisis de la secuencia de la región reguladora de *rpoH*. La unión de la proteína DnaA a sus sitios de reconocimiento es importante para el inicio de la replicación del cromosoma y para la expresión de varios genes.³⁷ En el caso de *rpoH*, la unión *in vitro* de la proteína DnaA pura a las dos cajas DnaA inhibe la transcripción de los promotores P3 y P4. Esta inhibición también se presenta en células que sobreproducen a DnaA. La función de estas cajas todavía no se evalúa.⁷⁰

Las cajas CytR y CRP2 también se identificaron a partir del análisis de la secuencia reguladora de *rpoH*. Esta identificación la realizó el grupo que estudia la función anti-activadora de la proteína CytR sobre la transcripción mediada por cAMP-CRP. La unión del complejo CytR-(cAMP-CRP) a las cajas CytR y CRP reprime la transcripción de los genes que codifican a las proteínas que transportan y catabolizan nucleótidos. Cuando hay nucleótidos en el medio, CytR no se une a su caja, lo que favorece la regulación positiva de CRP y la expresión de los genes para su transporte y catabolismo. En el caso de *rpoH*, el complejo ternario CytR₁-CRP₂ se une a los sitios CRP1, CRP2 y CytR y cubre a DnaA1 (Fig. 2). En ausencia de nucleótidos, el complejo reprime la transcripción de los promotores P3, P4 y P5, mientras que en presencia de citidina, CytR se inactiva y aumenta la actividad de esos promotores.²³

La presencia de las cajas CRP y CytR en la región reguladora de *rpoH* sugiere que σ^{32} regula la concentración celular de chaperonas y proteasas no sólo en el EC, sino también en respuesta a la presencia de diferentes nutrientes en el medio. Por otra parte, la presencia de cajas DnaA en esta región reguladora y los reportes de que las células próximas a dividirse son más sensibles a la lisis inducida por temperaturas altas³⁶ y que dos de las PEC, DnaK y Lon, están involucradas en la división celular^{43,53} permiten sugerir que σ^{32} participa también en la regulación del ciclo celular.

Regulación de la traducción del mRNA de *rpoH*. Uno de los primeros estudios sobre la regulación de la traducción de *rpoH* se realizó en una cepa con una fusión

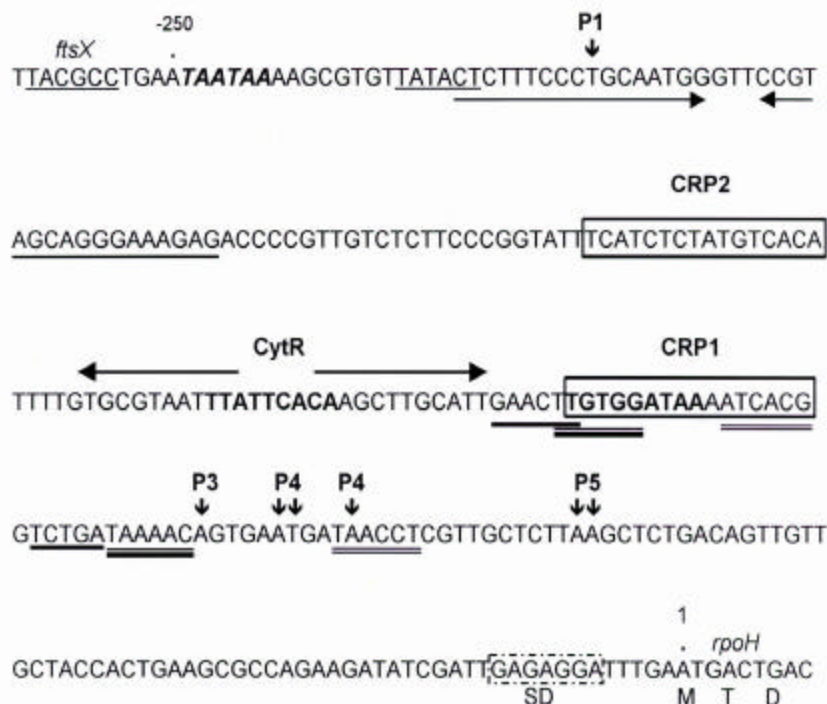


Fig. 2. Estructura de la región reguladora del gene *rpoH* de *E. coli* K12. En la parte superior del esquema se indica con letras itálicas dos posibles codones de término de traducción del gene *ftsX* y en la parte inferior los tres primeros codones de *rpoH*. El terminador de transcripción del operón *ftsYEX* se indica con flechas invertidas. Los sitios de unión para la proteína CRP están encerrados en rectángulos; el sitio CytR está señalado por flechas opuestas y las secuencias para DnaA están en letras oscuras; DnaA1 está dentro de la secuencia CytR y DnaA2 dentro de CRP1. Los inicios de transcripción de *rpoH* se señalan con flechas verticales. El 1 corresponde a la primera base de la región codificadora de *rpoH*. SD, secuencia Shine-Dalgarno. Las regiones -35,-10 de los promotores están señalados de la forma siguiente:

P1, ——— ; P3, ———; P4, ——— P5, ———

rpoH-lacZ que contiene las señales de inicio de la traducción de *rpoH*. Esta fusión codifica para una proteína que contiene un fragmento del extremo amino terminal de la proteína σ^{32} fusionado con la β -galactosidasa. En esa cepa se observó un aumento en la traducción de la proteína de fusión, lo que sugirió la presencia de una secuencia represora en la región codificadora carboxilo terminal. El análisis de la secuencia del mRNA de *rpoH* y los experimentos con mutaciones en diferentes regiones del gene, permitieron identificar tres regiones importantes para la regulación de la traducción: la región activadora A y las represoras B y C.^{44,46,74}

La región A es un elemento activador de la traducción localizado en la región codificadora de *rpoH* del nucleótido 6 al 20 en relación al codón de inicio de la traducción. Esta región complementa con el RNA ribosomal 16S, por lo que el reconocimiento mRNA-ribosoma se favorece. Las mutaciones en A inducen una disminución drástica de hasta 15 veces en la traducción del mRNA de *rpoH*.

La región B del nucleótido 110 al 210 es un elemento represor de la traducción que participa en la formación de una estructura secundaria que “secuestra” a la región A y al sitio de inicio de la traducción. Los experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que esta estructura es estable a 30°C e inestable a temperaturas más altas.^{44,73,74}

La región C o caja RpoH del nucleótido 364 al 433 también es un elemento represor de la traducción ya que las mutantes en C que alteran la secuencia de aminoácidos de σ^{32} disminuyen esta represión. Los aminoácidos que corresponden a esta región definen un dominio característico de σ^{32} . Se ha propuesto que este factor se une a DnaK a través de este dominio.³² Esta unión podría establecerse en el ribosoma y reprimir la terminación de la síntesis de σ^{32} , y/o establecerse con la proteína completa σ^{32} y favorecer su degradación.

Regulación de la estabilidad de la proteína σ^{32} . El factor σ^{32} es una de las proteínas más inestables de *E. coli*, con una vida media a 30°C de aproximadamente 1 minuto.

Durante el EC esta vida media se incrementa transitoriamente hasta 8 minutos. Este incremento no se presenta en las mutantes *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* y *ftsH*, lo que sugiere que los productos de estos genes participan en determinar la vida media de σ^{32} .⁶⁵ Un modelo sugiere que a 30°C la chaperona DnaK interacciona directamente con la región C de σ^{32} para favorecer su degradación por la proteasa membranal FtsH. En este caso la chaperona DnaK funcionaría como un regulador anti- σ .²² El mecanismo propuesto es que primero DnaJ se une a σ^{32} y lo presenta a DnaK-ATP. En presencia de ATP, DnaJ induce que DnaK compita con la RNA polimerasa por la unión a σ^{32} . La hidrólisis de ATP por la actividad de ATPasa de DnaK favorece la formación de un complejo terciario estable DnaK-ADP-DnaJ- σ^{32} . Finalmente GrpE dirige a este complejo a la proteasa FtsH para su degradación.^{3,22} La vida media de σ^{32} aumenta durante el EC ya que al incrementarse las proteínas desplegadas que son sustrato de la chaperona DnaK y de FtsH disminuye la formación de complejos terciarios y la degradación de σ^{32} .

Sin embargo, un trabajo reciente del grupo de Bukau sugiere que la función de la región C es aumentar la afinidad de σ^{32} por la RNA polimerasa, lo que le permitiría a este factor competir eficientemente con otros factores σ por la RNA polimerasa durante el EC.² Otro trabajo reciente reporta que la degradación de σ^{32} puede estar mediada también por otras proteasas como Lon, ClpAP y HslVU (ClpQY) (73). Esto muestra que el mecanismo de regulación de la vida media de σ^{32} puede ser más complejo de lo que se propuso originalmente.

Modelo de la regulación genética de la respuesta citoplásmica al estrés calórico por σ^{32} . El conocimiento actual sobre el regulón σ^{32} permite proponer un modelo de regulación para la respuesta citoplásmica al EC (Fig. 3).

En este modelo se propone que en condiciones normales de crecimiento (30°C) el gene *rpoH* se transcribe principalmente a partir de los promotores P1 y P4, el mRNA de *rpoH* presenta una estructura secundaria estable y su traducción es ineficiente. La mayoría de las moléculas de σ^{32} se encuentran unidas a la chaperona DnaK lo que favorece su degradación y una vida media corta (1 minuto). Esto genera una expresión basal de los genes del regulón σ^{32} y con ello una cantidad limitada de chaperonas y proteasas en la célula.

En la fase inicial del EC, las proteínas en general, DnaK en particular y el mRNA de *rpoH* funcionarían como termosensores para generar las señales de estrés celular.^{5,33,44} La señal de las proteínas es la pérdida de su plegamiento normal. La chaperona DnaK reconoce la señal, se une a las proteínas dañadas y libera a σ^{32} , con lo que se favorece la interacción RNA polimerasa- σ^{32} y se inhibe la degradación de σ^{32} por FtsH (Fig. 3). Esta cascada de regulación induce un aumento de 1 minuto a 8 minutos en la vida media de σ^{32} . DnaK además sensa directamente a la temperatura a través de su actividad de ATPasa, la cual se

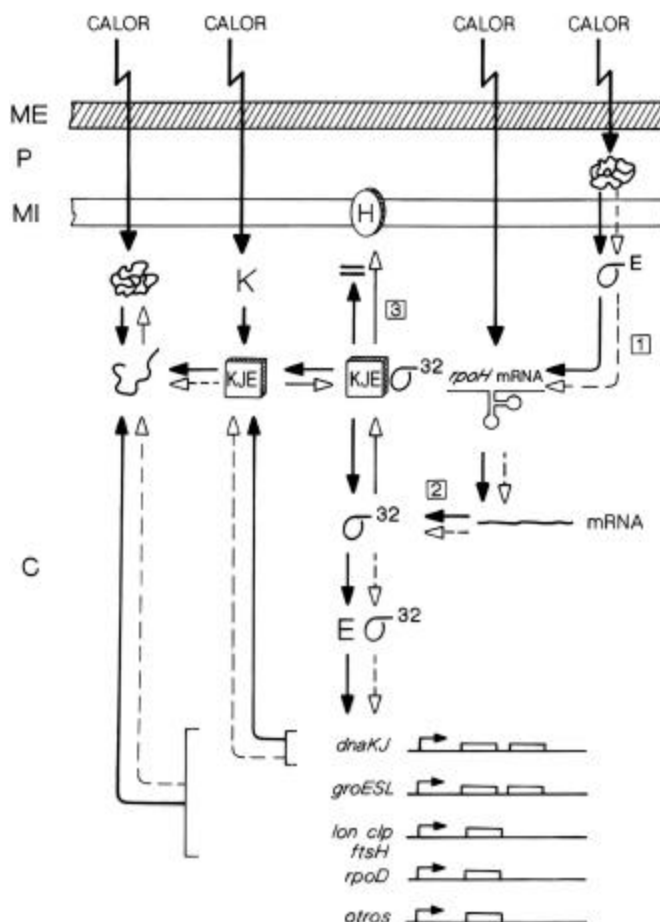


Fig. 3. Modelo de la regulación genética de la respuesta citoplásmica al estrés calórico en *E. coli*. El aumento súbito de temperatura (calor) se sensa en el citoplasma por las proteínas en general y DnaK (K) en particular y por el mRNA del gene *rpoH*. El aumento en la concentración y actividad del regulador σ^{32} obedece a: [1] un aumento en la transcripción de *rpoH* al activarse σ^E por la respuesta periplásmica al calor, [2] un incremento en la traducción del mRNA de este gene al desestabilizarse su estructura secundaria por efecto directo del calor y [3] una aumento en la vida media de σ^{32} al disminuir su degradación por la proteasa FtsH (H). Este aumento se produce al disminuir la interacción de este factor con la chaperona DnaK-DnaJ-GrpE (KJE). El significado de las letras y flechas es como en la Fig. 1.

incrementa a temperaturas altas.⁵⁵ Este aumento hace que la función de esta proteína sea más eficiente durante el EC. Finalmente, la molécula del mRNA de *rpoH* funciona simultáneamente como un termosensor al desdoblarse por efecto directo del calor y como un transductor de la señal al incrementar la eficiencia de la traducción del propio mRNA (Fig. 3). La suma de estos factores, más un incre-



mento de 3-5 veces en la transcripción de *rpoH* a partir del promotor P3, hacen que la actividad de σ^{32} aumente hasta 20 veces y con ello la expresión de los genes de la respuesta celular al EC. El aumento en la transcripción de *rpoH* se presenta como consecuencia de la respuesta al EC en el periplasma el cual induce una activación de σ^E , el factor que reconoce a P3.

En la fase de adaptación, el aumento en las chaperonas y proteasas asegura el re-plegamiento o la degradación de las proteínas dañadas con lo que disminuye la señal. La transcripción del mRNA de *rpoH* a partir de P3 disminuye al disminuir la actividad de σ^E durante la fase de adaptación de la respuesta periplásmica. El aumento en la chaperona DnaK favorece nuevamente su unión a σ^{32} y la degradación de esta proteína. La concentración del producto de *rpoD*, σ^{70} , aumenta, con lo que se restablece la transcripción general. La temperatura mantiene la inestabilidad de la estructura secundaria del mRNA de *rpoH* por lo que su traducción en la fase de adaptación continua alta. En esta fase la concentración de σ^{32} disminuye principalmente en respuesta a la disminución en la transcripción de *rpoH* a partir de P3 y al aumento de la vida media de este factor. Esta disminución permite que la expresión de los genes del regulón se establezca al nivel característico de la nueva temperatura.

En el caso de otros estímulos, como el etanol y la novobiocina, este último inhibidor de la girasa, se ha propuesto que el aumento en la síntesis de las PEC se debe principalmente a un incremento en la transcripción de *rpoH*.^{30,73} En el caso de novobiocina, se demostró que este antibiótico, al inducir una disminución en el grado de superenrollamiento del DNA, causa un aumento en la transcripción de *rpoH* a partir del promotor P1 el cual es más activo en DNA relajado.³⁰

LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA GENÉTICA AL ESTRÉS POR CALOR EN OTRAS BACTERIAS

El avance en el conocimiento de la regulación genética de la respuesta al EC en otras bacterias sugiere que en general las proteínas son los principales termosensores celulares, la señal es la modificación de su estructura y la respuesta genética induce un aumento en la cantidad de chaperonas y proteasas evolutivamente conservadas. Sin embargo, la evolución ha seleccionado en las bacterias dos mecanismos diferentes de regulación de la transcripción para responder a un EC: Un mecanismo positivo por factores alternativos como en *E. coli*, y uno negativo compuesto por un represor y un sitio operador en el DNA. En algunos géneros bacterianos la regulación del EC responde a una combinación de estos dos mecanismos, incluso un mismo gene puede estar regulado por un σ alternativo y por un represor.^{47,48,57,62,73}

El mecanismo positivo esta presente principalmente en las bacterias evolutivamente más próximas a *E. coli* como son las Proteobacterias del grupo γ al que pertenece la fa-

milia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias como *Haemophilus*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.^{47,57,73} Entre las Enterobacterias analizadas se encuentran *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Yersinia*, y *Proteus*.^{47,56,57} El análisis del patrón de transcripción y de la arquitectura de la región reguladora del gene *rpoH* de estas bacterias, muestra la presencia de cuatro promotores similares a los promotores P1, P3, P4 y P5 de *E. coli* K12. Sin embargo, únicamente en las bacterias más relacionadas a *E. coli* (*Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*) se identificaron cajas similares a DnaA, CRP, CytR.⁵⁶

El mecanismo positivo también esta presente en algunas Proteobacterias de los grupos α y β como *Agrobacterium*, *Caulobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhodobacter*, *Rickettsia* y *Alcaligenes*, respectivamente.⁷³ Sin embargo, el mecanismo negativo esta más difundido entre las bacterias.⁴⁸ Este mecanismo esta presente en varias Proteobacterias α , en las bacterias Gram-positivas, Cianobacterias, Micoplasmas, Espiroquetas y Clamidas (20,48,73). A la fecha se han descrito varios sistemas operador/represor como CIRCE/HrcA, HAIR/HspR y ROSE/represor.⁴⁸ Estos sistemas se han localizado principalmente en las regiones reguladoras de los genes que codifican a las chaperonas DnaK y GroE.⁶²

CONCLUSIONES

El estudio de la respuesta genética al EC en un organismo modelo como *E. coli* K12, así como en otras bacterias y organismos, sugiere que esta respuesta es muy conservada en cuanto a las características de los sensores, señales y funciones celulares de las principales PEC; mientras que los mecanismos genéticos que la regulan muestran mayor versatilidad. En *E. coli*, y posiblemente en todas las bacterias que presentan dos compartimientos celulares, existen sensores, mecanismos de transducción de señales, reguladores y genes específicos para la respuesta al EC en cada compartimiento. En *E. coli* la respuesta a EC se ha estudiado principalmente en células que pasan de 30 a 42°C por lo que el conocimiento de esta respuesta a temperaturas altas es limitado. Los estudios recientes de un EC a 50°C (temperatura letal) identificaron la inducción de un número importante de nuevos genes de los que se desconoce su regulación y función. Además de estos genes, existen otros que disminuyen específicamente la transcripción a temperaturas altas y que no se han estudiado.⁵⁹ Una vez que se descifró de manera general la respuesta genética al EC en esta bacteria, los estudios futuros deberán enfocarse a analizar: 1) la regulación y función de los nuevos genes descritos para el EC, 2) la regulación del SGR de EC en la respuesta a estímulos que lo inducen parcialmente, 4) la participación del SGR de EC en la inducción de otros SGR, 3) la participación de otras moléculas y estructuras celulares como los ribosomas y la membrana en la generación de señales, 4) el papel de las proteasas y chaperonas,

incluyendo a las pequeñas como IbpA y IbpB, en la regulación del EC, 4) el efecto del EC en el metabolismo celular, la respiración, la replicación del DNA y la división celular, así como la función específica de las PEC en estos eventos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de CONACyT (Donativo 27980-N).

REFERENCIAS

- Ades, S. E., L. E. Connolly, B. M. Alba and C. A. Gross. 1999. The *Escherichia coli* σ^E -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- σ factor. *Genes Dev.* 13:2449-2461.
- Arsene, F., T. Tomoyasu, A. Mogk, C. Schirra, A. Schulze-Specking and B. Bukau. 1999. Role of region C in regulation of the heat shock gene-specific sigma factor of *Escherichia coli*, sigma 32. *J. Bacteriol.* 181:3552-61.
- Blaszczak, A., C. Georgopoulos, and K. Liberek. 1999. On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the σ^{32} transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the DnaK chaperone machine. *Mol. Microbiol.* 31:157-166.
- Blumenthal, R. M., D. W. Borst, and R. G. Matthews. 1996. Experimental analysis of global gene regulation in *Escherichia coli*. *Progress Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol.* 55:1-86.
- Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* 9:671-680.
- Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernández, J. Ramírez-Santos, J. Castro-Dorantes, V. Chagoya de Sánchez and M. C. Gómez-Eichelmann. 1995. Topoisomerase activity during the heat-shock response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 177:3619-3622.
- Chuang, S. E., and F. R. Blattner, 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:5242-5252.
- Connolly, L., A. De las Peñas, B. M. Alba, and C. A. Gross. 1997. The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes Dev.* 11:2012-2021.
- Cooper, S. and T. Ruettinger. 1975. A temperature sensitive nonsense mutation affecting the synthesis of a major protein of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 139:167-176.
- Craig, E. A. and C. A. Gross. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* 16:135-140.
- De las Peñas, A., L. Connolly and C. A. Gross. 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.
- Erickson, J. W. and C. A. Gross. 1989. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* 3:1462-1471.
- Erickson, J. W., V. Vaughn, W. A. Walter, F. C. Neidhardt, and C. A. Gross. 1987. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* 1:419-432.
- Gómez Eichelmann, M. C. and R. Camacho Carranza. 1995. Superenrollamiento del DNA y topoisomerasas de *Escherichia coli*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 37:291-304.
- Gómez-Eichelmann, M. C. and C. H. Helmstetter. 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.
- Gottesman, S. 1999. Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:142-147.
- Gottesman, M. E. and W. A. Hendrickson. 2000. Protein folding and unfolding by *Escherichia coli* chaperones and chaperonins. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:197-202.
- Gross, C. A. 1996. Function and regulation of the heat shock proteins, pp.1382-1399. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Grossman, A. D., J. W. Erickson and C. A. Gross. 1984. The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* 38:383-390.
- Hecker, M., W. Schumann and U. Volker. 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19:417-428.
- Horwich, A. L., E. U. Weber-Ban and D. Finley. 1999. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11033-11040.
- Hughes, K. T. and K. Mathee. 1998. The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:231-286.
- Kallipolitis, B. H. and P. Valentin-Hansen. 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.
- Krueger, J. H. and G. C. Walker. 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*⁺-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1499-1503.
- Landick, R., V. Vaughn, E. T. Lau, R. A. VanBogelen, J. W. Erickson, and F. C. Neidhardt. 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell* 38:175-182.
- Lee-Rivera, I. 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
27. Lemaux, P. G., S. L. Herdeen, P. L. Bloch and F. C. Neidhardt. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* 13:427-434.
 28. Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos, and M. Zylicz. 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:2874-2878.
 29. Lipinska, B., Zylicz, M. and C. Georgopoulos. 1990. The *htrA* (*degP*) protein, essential for *Escherichia coli* growth at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172:1791-1797.
 30. López-Sánchez, F., J. Ramírez-Santos and M. C. Gómez-Eichelmann. 1997. In vivo effect of DNA relaxation on the transcription of gene *rpoH* in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1353:79-83.
 31. Mayhew, M., A. C. R. Da Silva, J. Martin, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and F. U. Hartl. 1996. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379:420-426.
 32. McCarty, J. S., S. Rudiger, H. J. Schonfeld, J. Schneider-Mergener, K. Nakahigashi, T. Yura and B. Bukau. 1996. Regulatory region C of *E. coli* heat shock transcription factor, σ^{32} , constitutes a DnaK binding site and is conserved among eubacteria. *J. Mol. Biol.* 256:829-837.
 33. McCarty, J. S., and G. C. Walker. 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.
 34. Mecsas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross. 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.
 35. Mejía R., M. C. Gómez-Eichelmann and M. S. Fernández. 1995. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim. Biophys. Acta*. 1239:195-200.
 36. Membrillo-Hernández, J., A. Nuñez-de la Mora, T. del Río-Albrechtsen, R. Camacho-Carranza and M. C. Gómez-Eichelmann. 1995. Thermally-induced cell lysis in *Escherichia coli* K12. *J. Basic Microbiol.* 35:41-46.
 37. Messer, W. and C. Weigel. 1997. DnaA initiator - also a transcription factor. *Mol. Microbiol.* 24:1-6.
 38. Missiakas, D., J. M. Betton, and S. Raina. 1996. New components of protein folding in the extra-cytoplasmic compartments of *Escherichia coli*: SurA, FkpA, and Skp/OmpH. *Mol. Microbiol.* 21:871-884.
 39. Missiakas, D., M. P. Mayer, M. Lemaire, C. Georgopoulos and S. Raina. 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.
 40. Missiakas, D. and S. Raina. 1997. Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179:2465-2471.
 41. Missiakas, M. and S. Raina. 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 28:1059-1066.
 42. Missiakas, D., S. Raina and C. Georgopoulos. 1996. Heat shock regulation, pp.481-501. In E. C. C. Lin and A. S. Lynch (Eds). *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. R. G. Landes Company, Austin, TX.
 43. Mizusawa, S. and S. Gottesman. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: The *lon* gene controls the stability of the SulA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:358-362.
 44. Morita, M. T., Y. Tanaka, T. S. Kodama, Y. Kyogoku, H. Yanagi, and T. Yura. 1999. Translation induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* 13:655-665.
 45. Nagai, H., R. Yano, J. W. Erickson, and T. Yura. 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.
 46. Nagai, H., H. Yuzawa and T. Yura. 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.
 47. Nakahigashi, K., H. Yanagi, and T. Yura. 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.
 48. Narberhaus, F. 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.* 31:1-8.
 49. Neidhardt, F. C. and R. A. Vanbogelen. 1987. Heat shock response, pp.1334-1345. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
 50. Neumann, D. and L. Nover. 1991. Heat shock-induced changes of cell ultrastructure, pp.346-371. In L. Nover (Ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
 51. Nover, L. 1991. Inducers of HSP synthesis: heat shock and chemical stressors, pp.5-40. In L. Nover (Ed). *Heat Shock Response*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
 52. Oliver, D. B. 1996. Periplasm, pp.88-103. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
 53. Paek, K. H. and G. C. Walker. 1987. *Escherichia coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* 169:283-290.

54. Parsell, D. A. and Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496.
55. Raina, S., D. Missiakas, and C. Georgopoulos. 1995. The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:1043-1055.
56. Ramírez-Santos, J., J. Collado-Vides, M. García-Varela, and M. C. Gómez-Eichelmann. 2001. Conserved regulatory elements of the promoter sequence of the gene *rpoH* of enteric bacteria. *Nucleic Acids Res.* 29:380-386.
57. Ramírez-Santos, J. and M. C. Gómez-Eichelmann. 1998. Identification of σ^{32} -like factors and *ftsX-rpoH* gene arrangements in enteric bacteria. *Can. J. Microbiol.* 44:565-568.
58. Richarme, G. and M. Kohiyama. 1993. Specificity of the *Escherichia coli* chaperone DnaK (70-kDa heat shock protein) for hydrophobic amino acids. *J. Biol. Chem.* 268:24074-24077.
59. Richmond, C. S., J. D. Glasner, R. Mau, H. Jin and F. R. Blattner. 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27:3821-3835.
60. Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DPN in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
61. Rouviere, P. E., A. De las Peñas, J. Mecsas, C. Z. Lu, K. E. Rudd, and C. A. Gross. 1995. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14:1032-1042.
62. Segal, G. and E. Z. Ron. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 138:1-10.
63. Snyder, L. and W. Champness. 1997. Global regulatory mechanisms, pp.298-334. In *Molecular Genetics of Bacteria*. American Society for Microbiology. Washington D. C.
64. Straus, D. B., W. Walter and C. A. Gross. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329:348-351.
65. Straus, D., W. Walter, and C. A. Gross. 1990. DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Genes Dev.* 4:2202-2209.
66. Tissières, A., H. K. Mitchell and U. Tracy. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389-398.
67. Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A. J. Rutman, A. B. Openheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki, S. Hiraga and T. Ogura. 1995. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.* 14:2551-2560.
68. VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt. 1990. H-bosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5589-5593.
69. VanBogelen, R. A., P. M. Philip and F. C. Neidhardt. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:26-32.
70. Wang, Q. and J. M. Kaguni. 1989. DnaA protein regulates transcription of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264:7338-7344.
71. Wickner, S., M. R. Maurizi and S. Gottesman. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888-1893.
72. Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura and T. Yura. 1978. Transient regulation of proteins synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.* 134:1133-1140.
73. Yura, Y. and K. Nakahigashi. 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:153-158.
74. Yusawa, H., H. Nagai, H. Mori, and T. Yura. 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.