

Respuesta celular a estrés

Carmen Gómez Eichelmann*

RESUMEN. La respuesta celular a variaciones bruscas del medio ambiente, o respuesta al estrés, se caracteriza por cambios en la expresión genética y en la fisiología celular. Estos cambios le permiten a la célula sobrevivir y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. La mayoría de los estudios actuales sobre la respuesta al estrés se enfocan en identificar las modificaciones de los patrones de expresión genética (transcriptoma y proteoma), así como su relación con los cambios a nivel bioquímico (metaboloma), estructural y funcional que se presentan en las células durante el estrés. En el simposium Respuesta Celular al Estrés se presentaron cuatro trabajos sobre el efecto del estrés en funciones celulares importantes: 1) estrés nutricional en *Escherichia coli* y daño y mutabilidad del DNA, 2) estrés nutricional y oxidativo en *Candida glabrata* y silenciamiento subtelomérico, 3) estrés por frío y metabolismo del RNA en *E. coli*, y 4) estrés calórico y oxidativo en células de *E. coli* en estrés nutricional y limitación de oxígeno y síntesis diferencial de proteínas.

Palabras clave: Estrés celular, mutación, metabolismo de RNA, expresión genética.

INTRODUCCIÓN

Los primeros conocimientos básicos sobre el metabolismo general del DNA (replicación, reparación, recombinación, transcripción) y de la regulación de la expresión génica se establecieron utilizando principalmente a la bacteria *Escherichia coli* como modelo experimental. En general, los experimentos se realizaron en bacterias activamente dividiéndose en condiciones óptimas de crecimiento: aereación, pH neutro, 37°C y nutrientes abundantes. Sin embargo, en su habitat natural, *E. coli*, como la mayoría de los microorganismos, enfrenta constantemente condiciones adversas. La respuesta celular a estas condiciones de estrés (i.e. alta o baja temperatura, limitación de nutrientes), se caracteriza por cambios en la expresión genética. Cada condición de estrés modifica la fisiología general de la célula y genera señales que son detectadas por sensores específicos. Los sensores transducen la señal, por dife-

ABSTRACT. Environmental changes induce a cellular response characterized by a modification in the genetic expression and physiology of the cell. This modification allows the cell to survive and adapt to the new environment. Current studies on cellular stress response are mainly focused on the identification of the genetic expression patterns (transcriptome, proteome), and their relation with the biochemical (metabolome), structural and functional changes displayed by the cells under stress. In the symposium on Cellular Response to Stress, four works were presented about the stress effect on cellular functions of bacteria and fungi: 1) nutritional stress in *Escherichia coli* and DNA damage and mutagenesis, 2) nutritional and oxidative stress in *Candida glabrata* and subtelomeric silencing, 3) cold stress in *E. coli* and RNA degradation, and 4) oxidative and heat stress in *E. coli* and differential protein synthesis.

Key words: Cellular stress, mutation, RNA metabolism, genetic expression.

rentes vías, a los mecanismos de reprogramación de la expresión genética. Esta reprogramación le permite a la célula sobrevivir y adaptar su fisiología a las nuevas condiciones ambientales. La mayoría de los estudios actuales sobre la respuesta al estrés se enfocan a identificar los cambios de expresión genética (transcriptoma y proteoma), así como su relación con los cambios que se presentan en las células a nivel bioquímico (metaboloma), estructural y funcional. En este artículo se revisa el efecto de diferentes condiciones de estrés (oxidativo, calórico, por frío, nutricional) o de combinaciones de más de un estrés en eventos moleculares importantes como son la reparación y mutabilidad del DNA (Ramírez Santos y col.), el silenciamiento subtelomérico (De Las Peñas y col.), la regulación postranscripcional (Fernández Ramírez y col.) y la síntesis diferencial de proteínas (Delgado Olivares y col.).



* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

Mutaciones de estrés nutricional y GyrI, una proteína inhibidora de girasa de *Escherichia coli*

Jesús Ramírez Santos,* Verónica García Mata* y M. Carmen Gómez Eichelmann*,**

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-228, 04510 México, D. F.

** E-mail: cargom@servidor.unam.mx

Charles Darwin publicó en 1859 su Teoría de la Evolución; casi un siglo después, la genética bacteriana y la biología molecular permitieron identificar la molécula que contiene a la información genética (DNA) y estudiar a nivel molecular los mecanismos por los cuales cambia (muta) esta información. En 1943 Luria y Delbrück demostraron que las mutaciones que le confieren a la bacteria *Escherichia coli* resistencia a un fago, se encuentran presentes en la población bacteriana antes de la exposición al fago, lo que puso en duda la existencia de las mutaciones dirigidas o adaptativas propuestas por Lamarck.¹⁵ La síntesis de los postulados originales de la Teoría de la Evolución y el conocimiento aportado por estos estudios se conoce como Teoría Neo-Darwinista. Esta teoría postula que las mutaciones se generan al azar principalmente durante la replicación del DNA y de manera independiente al medio y que es el medio el que selecciona positiva o negativamente a los organismos con estas mutaciones.

En 1988 J. Cairns reportó la existencia de mutaciones “adaptativas” en células de *E. coli* en fase estacionaria (FS) bajo selección no-letal, lo que cimbró las bases de la Teoría Neo-Darwinista y despertó a la sombra de Lamarck.⁵ Los principales estudios de estas mutaciones utilizan un ensayo diseñado por Cairns y Foster.⁴ En este ensayo se utiliza una cepa Lac⁻ con una mutación fuera de fase en *lac* que puede revertir y generar células Lac⁺. En breve, las células Lac⁻ se cultivan en medio líquido con glicerol hasta alcanzar la FS y luego se siembran en cajas con medio sólido que contiene lactosa como única fuente de carbono. A partir del día 2-3 de incubación se observa la aparición de colonias revertantes Lac⁺. En los primeros estudios no se detectaron mutaciones en otros genes, lo que sugirió el carácter adaptativo de las mutaciones. Esto abrió una intensa polémica, ya que por una parte se sugería que las mutaciones podían ser “dirigidas” por el medio y por otra se demostraba que las células que no están activamente dividiéndose pueden mutar. Después de más de 10 años de investigación y de polémica, se demostró que también se presentan mutaciones en otros genes; es decir, las mutaciones no son adaptativas en sentido lamarckiano y que bajo ciertas condiciones, las células que no están activamente replicando el DNA pueden mutar.^{8,12} Actualmente, los estudios sobre las mutaciones

de FS se centran en conocer las condiciones que las favorecen, el mecanismo molecular que las genera y su significado evolutivo.

Los mecanismos que generan a las mutaciones de FS son diferentes a los de las células activamente dividiéndose. Las mutaciones de FS se generan principalmente por la reparación de cortes de doble hebra en el DNA por recombinación homóloga dependiente de RecA-RecBCD. En esta reparación participan varias proteínas del sistema SOS de respuesta celular al daño del DNA. Una de estas proteínas, la DNA polimerasa IV, es una polimerasa que también se induce en la FS y que copia DNA con poca fidelidad (Fig. 1).^{8,12}

El incremento de radicales libres, el colapso de horquillas de replicación y la actividad de ciertas endonucleasas en la FS pueden contribuir a la generación de los cortes en el DNA. La topoisomerasa II o girasa es una endonucleasa que potencialmente también puede generar cortes de dos hebras en el DNA de células en FS. Girasa es una enzima esencial para el metabolismo del DNA que requiere ATP, corta reversiblemente las dos hebras del DNA y lo superenrolla.¹⁰ Varios inhibidores de la enzima como proteínas codificadas por plásmidos (CcdB, microcina B17) o antibióticos (ácido nalidíxico, fluoroquinolonas), se unen a la enzima y estabilizan al complejo transitorio de corte girasa-DNA, lo que genera cortes estables de doble hebra en el DNA.⁷ Otra proteína que se une a girasa e inhibe su función es GyrI (SbmC). Sin embargo, en este caso GyrI disminuye la unión de girasa al DNA y su sobreproducción protege a las células del efecto inhibitorio de microcina B17, CcdB y fluoroquinolonas ya que disminuye el número de cortes que introduce girasa en presencia de estos inhibidores. GyrI aumenta en la FS y en la respuesta SOS;^{2,6,16} sin embargo, su función no se ha explorado en estas condiciones de estrés o en ausencia de inhibidores de girasa.

Recientemente demostramos que las proteínas CcdA y CcdB incrementan su concentración en la FS y que la sobre-expresión de éstas induce un aumento moderado en la frecuencia de mutaciones de FS. En este trabajo se propuso que este aumento se debe a los cortes que introduce girasa en el DNA de células en FS que sobreproducen CcdA/CcdB.¹ Estas proteínas constituyen uno de los sistemas

bacterianos de muerte celular programada o sistemas anti-toxina-toxina.¹¹ CcdB es una proteína tóxica que inhibe a girasa y la estabiliza en el complejo de corte girasa-DNA, mientras que CcdA es una antitoxina que interacciona con CcdB impidiendo su unión a girasa. CcdA tiene una vida media más corta que CcdB, por lo que se requiere de la expresión continua de las dos proteínas para impedir que CcdB pueda inhibir a girasa. Las bacterias que durante la división celular pierden el plásmido y por tanto los genes

que codifican para CcdA y CcdB, pueden morir, ya que CcdA se degrada más rápido que CcdB lo que lleva a la inhibición de girasa y generación de cortes en el DNA.^{7,11} En las células de FS que no se dividen activamente posiblemente se rompe el equilibrio CcdA/CcdB, como sugieren nuestros resultados, y CcdB puede inhibir a girasa y con ello incrementar los cortes en el DNA y las mutaciones de FS.

Por otra parte, se sabe que el grado de superenrollamiento del DNA disminuye en FS y se recupera inmediatamente después de añadir nutrientes. La recuperación depende de la girasa presente en las células de FS. La cantidad de enzima en estas células es similar a la de células en crecimiento, lo que muestra que en FS hay mucha girasa en relación al limitado metabolismo de DNA.¹⁸ En base a esto, se propuso la hipótesis de que el exceso relativo de girasa en limitación de ATP puede ser mutagénico, ya que es posible que la girasa corte, pero no religue al DNA en estas condiciones. Esta hipótesis nos permite explorar la función de GyrI en ausencia de inhibidores y en células en FS. En la FS GyrI podría disminuir el número de girasas unidas al DNA y por tanto el número de cortes en el DNA. La presencia de cortes de doble hebra en el DNA se determinó con el ensayo de mutación "adaptativa" o de FS.⁴ Los resultados muestran que la ausencia de GyrI induce un incremento en la mutación de FS de 80-100 veces. El incremento depende de RecA, RecB y SOS. La función que se sugiere para GyrI en las células en estrés nutricional, es que esta proteína "secuestra" moléculas de girasa lo que disminuye el daño al DNA causado por esta enzima. Esto implica que girasa puede ser mutagénica en células en ayuno y que GyrI es un antimutador.^{9,17} Sin embargo, resultados recientes muestran que un gene vecino a *gyrI*, no identificado, juega un papel importante en este incremento.

En otras bacterias y en levaduras también se han descrito proteínas que protegen a las células de inhibidores de la DNA topoisomerasa II.^{3,13} En este contexto, es importante identificar al gene vecino a *gyrI* y evaluar si las topoisomerasas II son mutagénicas y las proteínas protectoras son antimutadoras en células en ayuno y si las proteínas protectoras funcionan como antimutadores en ausencia de los inhibidores.

REFERENCIAS

1. Aguirre-Ramírez, M., J. Ramírez-Santos, L. Van Melderén & M. C. Gómez-Eichelmann. 2006. Expression of the F plasmid *ccd* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli* cells under nutritional stress. *Can. J. Microbiol.* 52:24-30.
2. Baquero, M. R., M. Bouzon, J. Varea & F. Moreno. 1995. *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol. Microbiol.* 18:301-311.
3. Baldwin, E. L., A. C. Berger, A. H. Corbett & N. Osheroff. 2005. Mms22p protects *Saccharomyces cerevisiae* from DNA damage induced by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.* 33:1021-1030.

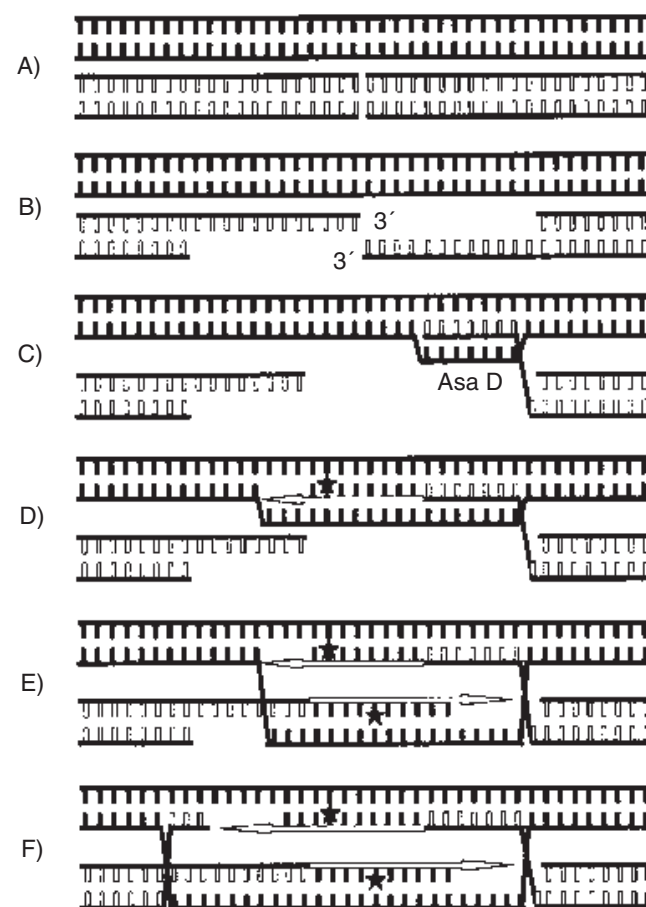


Figura 1. Reparación por recombinación homóloga de cortes de doble hebra del DNA en células en ayuno. A) Corte de dos hebras en una región del DNA y apareamiento mediado por RecA con una región homóloga. B) La enzima RecBCD produce extremos 3' libres. C) RecA cataliza la invasión de un extremo 3' a la región homóloga y forma una asa D. D) Síntesis de DNA por la DNA polimerasa III o la IV a partir del 3' invasor. E) La invasión y síntesis de DNA ocurre en el otro extremo 3'. F) RuvAB desplaza los entrecruzamientos, RuvC los resuelve y separa las dos moléculas de DNA. Figura modificada de Lewin, B.¹⁴ ★ Mutación.

La reparación de un corte de doble hebra cercano a *lac* por recombinación y síntesis de DNA por Pol IV, una DNA polimerasa poco fiel, puede generar mutaciones fuera de fase y como consecuencia células revertantes *Lac*⁺.

4. Cairns, J. & P. L. Foster. 1991. Adaptive reversion of a frame-shift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* 128:695-701.
5. Cairns, J., J. Overbaugh & S. Miller. 1988. The origin of mutants. *Nature* 335:142-145.
6. Chatterji, M. & V. Nagaraja. 2002. GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO reports* 31:261-267.
7. Couturier, M., E. M. Bahassi & L. Van Melderen. 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends Microbiol.* 6: 269-275.
8. Foster, P. L. 2004. Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:4846-4852.
9. García-Mata, V. 2005. Participación del gene *gyrI* en la generación de mutaciones de fase estacionaria en *Escherichia coli*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias, UNAM.
10. Gómez-Eichelmann, M. C. & R. Camacho-Carranza. 1995. El superenrollamiento del DNA y topoisomerasas en *Escherichia coli*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37:291-304.
11. Hayes, F. 2003. Toxin-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301: 1496-1499.
12. He, A. S., P. R. Rohatgi, M. N. Hersh & S. M. Rosenberg. 2006. Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutations. *DNA Repair* 5:258-273.
13. Hegde, S. S., M. W. Vetting, S. L. Roderick, L. A. Mitchenall, A. Maxwell, H. E. Takiff & J. S. Blanchard. 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308:1480-1483.
14. Lewin, B. *Genes VIII*. 2004. Pearson Prentice Hall, NJ. USA.
15. Luria S. E. & M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491-511.
16. Nakanishi, A., T. Oshida, T. Matsushita, S. Imajoh-Ohmi & T. Ohnuki. 1998. Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273:1933-1938.
17. Ramirez-Santos, J., V. García-Mata & M. C. Gómez-Eichelmann. 2006. Antimutator role of protein GyrI (SbmC), a DNA gyrase inhibitor, in starving *Escherichia coli* cells. Manuscrito en preparación.
18. Reyes-Domínguez, Y., G. Contreras-Ferrat, J. Ramírez-Santos, J. Membrillo-Hernández & M. C. Gómez-Eichelmann. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* 185:1097-1100.

De cómo *Candida glabrata* detecta y responde al estrés

Alejandro De Las Peñas,* Verónica Gallegos,* Brendan Cormack,** Irene Castaño*^{***}

* División de Biología Molecular. IPICYT. 78216 San Luis Potosí, SLP, México. Tel. (444) 834-2000, FAX (444) 834-2010.

** Department of Molecular Biology and Genetics. Johns Hopkins University. Baltimore, MD 21205, EUA.

*** E-mail: cano@ipicyt.edu.mx

Los hongos patógenos están emergiendo cada vez con mayor frecuencia como una de las causas más importantes y graves de infecciones hospitalarias. Diferentes especies de levaduras del género *Candida* son parte de la flora normal en humanos.¹⁵ Sin embargo, pequeños cambios en el sistema inmunológico pueden propiciar la invasión de tejidos más profundos por el microorganismo y desencadenar la enfermedad. El establecimiento de una infección exitosa es un proceso multifactorial que depende de eventos que se desencadenan tanto en el hospedero como en el hongo. *Candida glabrata* es un hongo patógeno oportunista, haploide, filogenéticamente muy cercano a la levadura de pan *Saccharomyces cerevisiae*. Para adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes del hospedero, *C. glabrata* tiene que detectar señales ambientales y traducirlas para reprogramar su expresión genética.

Recientemente hemos empezado a entender como *C. glabrata* interacciona con su medio ambiente para modular su patogenia. En experimentos utilizando modelos de infección en ratones, se determinó que la respuesta a estrés oxidativo y la expresión de la adhesina *EPA6* *in vivo*, está controlada por la maquinaria de silenciamiento subtelomérico (Fig. 1).^{3,5,6}

La maquinaria del silenciamiento subtelomérico en *C. glabrata* regula, a través de la estructura de la cromatina, la expresión de genes subteloméricos. Entre estos genes se encuentran los de la familia *EPA* que codifican para proteínas de pared [adhesinas].⁴ Este mecanismo regulatorio está mediado por el complejo Sir (Sir2p [desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺], Sir3p y Sir4p), Rap1p, Ku70p/80p, Hst1p [desacetilasa de histonas, parálogo de Sir2p y Hst2p]¹¹ y Rif1p^{3,5} (Fig. 1). *EPA6*, que es subtelomérico, está regulado por silenciamiento inducido *in vivo* por señales ambientales. *EPA6* se induce específicamente en vejiga y riñón durante infecciones del tracto urinario en ratones. En la orina hay niveles muy bajos de ácido nicotínico (NA) que reducen los niveles internos de NAD⁺ afectando la actividad de Sir2p.¹³ Esto relaja la estructura de la cromatina, permitiendo así la expresión de *EPA6*.⁶ La detección de los niveles de NA por parte de la maquinaria del silenciamiento subtelomérico y la inducción de la expresión de la adhesina *EPA6*, conecta claramente señales en el medio ambiente con la regulación específica de genes. Este esquema regulatorio permite responder a las condiciones del medio: factores nutricionales con adherencia. En general todos los miembros de la maquinaria del silen-

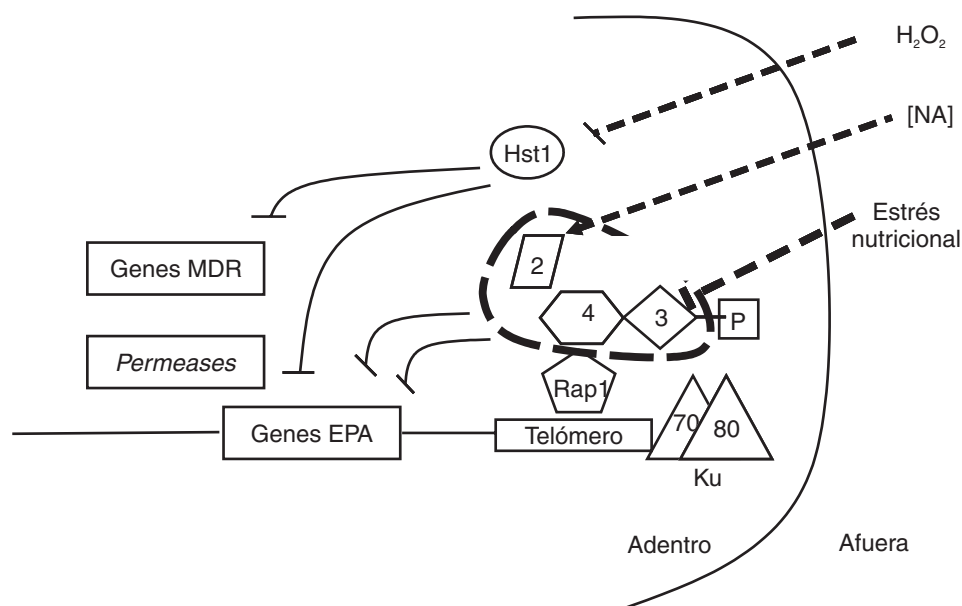


Figura 1. Detección de señales ambientales por la maquinaria del silenciamiento subtelomérico en *Candida glabrata*.

ciamiento subtelomérico podrían ser blanco de señales ambientales. De hecho, hay evidencia en *Saccharomyces cerevisiae* de que Sir3p se fosforila en respuesta a estrés nutricional y su actividad se ve afectada (Fig. 1).^{1,9,10,12}

La primera línea de defensa del hospedero contra una infección por *Candida* son las células fagocíticas,⁸ por lo tanto *C. glabrata* debe de tener un programa genético definido para responder y así evitar la muerte por estrés oxidativo generado por estas células.^{2,7,14} *C. glabrata* es capaz de protegerse y adaptarse al estrés oxidativo mediante la detección de las especies reactivas de oxígeno e inducción de la expresión de enzimas detoxificadoras y antioxidantes. Sorprendentemente, encontramos una intersección entre la síntesis de una adhesina y la respuesta a estrés oxidativo. La región subtelomérica del cromosoma donde se encuentran localizados *EPA1*, *EPA2* y *EPA3* está afectada por silenciamiento subtelomérico.⁵ Sin embargo, *EPA2* es el único de los *EPA* analizados que se induce en presencia de estrés oxidativo, sugiriendo una relación entre adherencia y respuesta a estrés oxidativo. Interessantemente, Hst1p es uno de los reguladores de la respuesta a estrés oxidativo y no sus parálogos Sir2p y Hst2p. Además de controlar los genes de la respuesta a estrés oxidativo, Hst1p controla también la expresión de algunas adhesinas como *EPA2*, genes que codifican para la resistencia a múltiples drogas (*MDR*) y permeasas de aminoácidos (Fig. 1). Esto sugiere que Hst1p podría estar funcionando como un sensor central para responder al estrés ambiental.

En general, *C. glabrata* debe de ser capaz de coordinar toda esta red regulatoria para sobrevivir y establecer una infección exitosa. Cómo se da el diálogo molecular entre

C. glabrata y su hospedero, son preguntas abiertas de la patogenicidad de *C. glabrata* que requieren ser estudiados.

REFERENCIAS

1. Ai, W., Bertram, P.G., Tsang, C.K., Chan, T.F., and Zheng, X.F. (2002) Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* 10: 1295-1305.
2. Avery, A.M., and Avery, S.V. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* 276: 33730-33735.
3. Castaño, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B.P. (2005) Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* 55: 1246-1258.
4. Cormack, B.P., Ghorri, N., and Falkow, S. (1999) An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578-582.
5. De Las Peñas, A., Pan, S.J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B.P. (2003) Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17: 2245-2258.
6. Domergue, R., Castaño, I., De Las Peñas, A., Zupancic, M., Lockatell, V., Hebel, J.R., Johnson, D., and Cormack, B.P. (2005) Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308: 866-870.
7. González-Parraga, P., Hernández, J.A., and Argüelles, J.C. (2003) Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* 20: 1161-1169.
8. Mansour, M.K., and Levitz, S.M. (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 5: 359-365.
9. Ray, A., Hector, R.E., Roy, N., Song, J.H., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2003) Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat Genet* 33: 522-526.

10. Roy, N., and Runge, K.W. (2000) Two paralogs involved in transcriptional silencing that antagonistically control yeast life span. *Curr Biol* 10: 111-114.
11. Smith, J.S., Brachmann, C.B., Celic, I., Kenna, M.A., Muhammad, S., Starai, V.J., Avalos, J.L., Escalante-Semerena, J.C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J.D. (2000) A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6658-6663.
12. Stone, E.M., and Pillus, L. (1996) Activation of an MAP kinase cascade leads to Sir3p hyperphosphorylation and strengthens transcriptional silencing. *J Cell Biol* 135: 571-583.
13. Tanny, J.C., and Moazed, D. (2001) Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 415-420.
14. Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., and Dawes, I.W. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6564-6569.
15. Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., and Gaynes, R.P. (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35: 627-630.

Un acercamiento a las condiciones ambientales de vida de *Escherichia coli*. Respuesta al estrés oxidativo y térmico en condiciones de limitación de oxígeno y fase estacionaria

Luis Delgado-Olivares,* Alondra Díaz-Acosta,* Jorge Membrillo-Hernández*,**

* Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Mex. D.F.

** E-mail: jmh@biomedicas.unam.mx.

Escherichia coli cuenta con la maquinaria esencial para sobrevivir ante los diferentes tipos de estrés ambiental. Para lo cual la expresión de un gran número de genes se encuentra bajo la dirección de σ^s el cual es codificado por el gen *rpoS*, mientras que el gen *rpoH*, que codifica el factor transcripcional σ^{32} , controla la expresión de los genes de respuesta al estrés térmico (Hsp, Heat-Shock-Proteins). Durante el crecimiento aeróbico el incremento en la temperatura se produce un estrés oxidativo¹ sin que hasta el momento se haya estudiado la relación del estrés térmico y oxidativo. Dado que en su hábitat natural *E. coli* se encuentra bajo condiciones anaeróbicas y limitación de nutrientes, estamos interesado en estudiar como afectan dichas condiciones de cultivo a la respuesta al estrés oxidativo y térmico en ésta bacteria.

Como se ha reportado con anterioridad, la cepa *rpoH::kan* es extremadamente sensible a un cambio súbito de temperatura cuando se encuentra en crecimiento exponencial aeróbico (30° a 47°C; Fig. 1 A), mientras que la cepa silvestre MC4100 como la mutante *rpoS* presentaron resistencia al estrés térmico (Fig. 1A). Durante la fase estacionaria, las tres cepas presentaron resistencia al cambio en temperatura (datos no mostrados). Para nuestra sorpresa, durante el crecimiento anaeróbico, la mutante *rpoH* fue resistente al estrés térmico (Fig. 1 B). Estos resultados sugieren que existe un mecanismo, en condiciones anaeróbicas, independiente de σ^{32} . El análisis de la cinética de síntesis *de novo* de Hsp durante el crecimiento en fase

exponencial en condiciones aeróbicas (Fig. 2 A) mostró que la síntesis inicia de 2 a 4 min y de 8 a 16 min, respectivamente, después de haber incrementado la temperatura. Mientras que, durante el crecimiento anaeróbico la respuesta fue inmediata (Fig. 2 B). Por otro lado, la mutante *rpoH* no presentó síntesis de las Hsp en ninguna de las condiciones de cultivo (Fig. 2 A y B). Estos resultados indican que durante el crecimiento en condiciones anaeróbicas la respuesta de síntesis de las Hsp es mucho más rápida y más sostenida que en condiciones aeróbicas.

Con la finalidad de analizar en daño oxidativo y su relación con el estrés térmico se analizó el patrón de carbonilación de proteínas (modificación irreversible provocada por la oxidación de proteínas) en los cultivos tratados con H₂O₂ y sujetos a estrés térmico (Fig. 3). Los resultados muestran una mayor sensibilidad al estrés oxidativo cuando las células se encuentran en la fase exponencial de crecimiento la cual incrementa cuando las células son expuestas al estrés térmico. Por otro lado es importante notar que únicamente la mutante *rpoH* muestra altos niveles de proteínas carboniladas durante la fase estacionaria.

Los resultados en conjunto muestran una mayor resistencia al estrés térmico y oxidativo durante creciendo en fase estacionaria. Observamos que la mutante *rpoH* fue más sensible a ambos tipos de estrés únicamente durante la fase exponencial. Por otro lado, los altos niveles de proteínas carboniladas en la mutante *rpoH* sugieren que las Hsp pueden

funcionar como escudos moleculares para proteger proteínas esenciales contra el daño oxidativo tal como se ha propuesto para DnaK.^{2,3} Por lo que es importante la identificación de estas proteínas para elucidar el mecanismo de protección ante el estrés oxidativo y térmico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por los donativos 42580-Q de CONACyT y 207703 de PAPIIT-UNAM. A D-A. es becaria de postgrado del CONACyT.

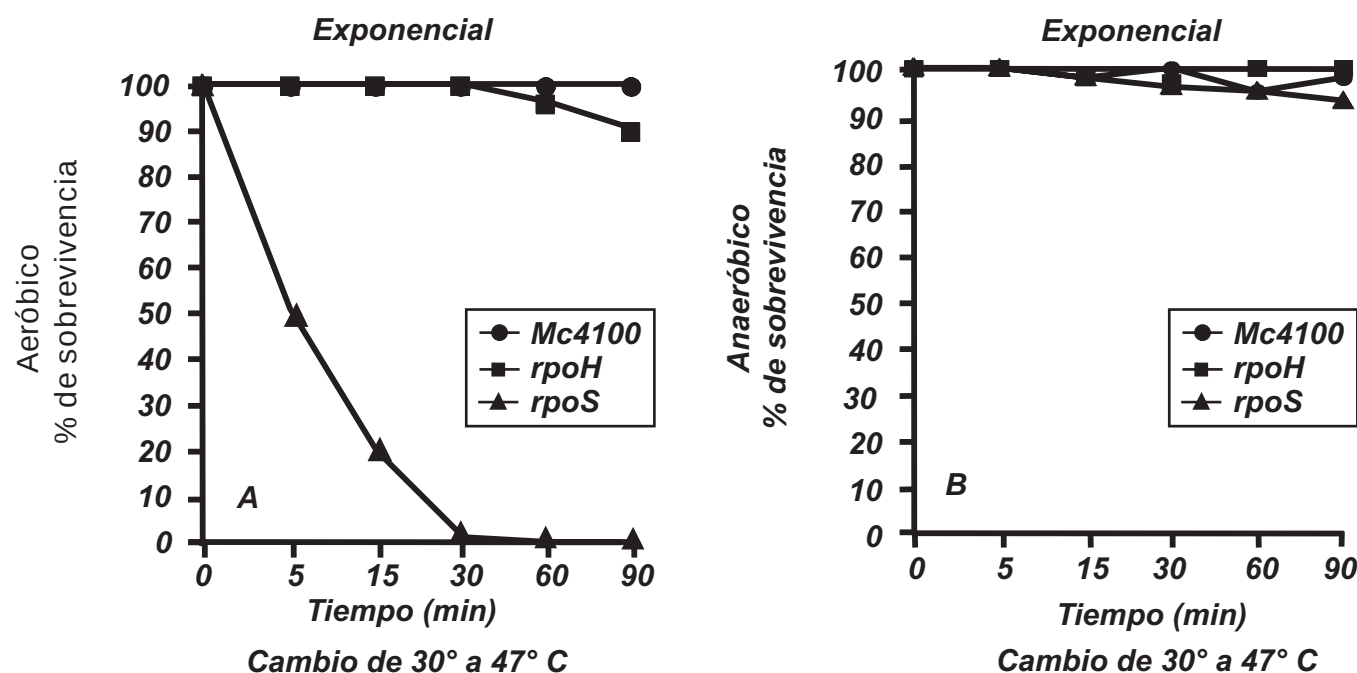


Figura 1. La resistencia de *Escherichia coli* al estrés térmico durante el crecimiento aeróbico es dependiente de la expresión del gen *rpoH*. Las células silvestre MC4100 (●) y las mutantes *rpoH* (■) y *rpoS* (▲), fueron cultivadas a 30°C en condiciones aeróbicas (A) o anaeróbicas (B) hasta que alcanzaron la DO_{600} de 0.25 (fase exponencial; A y C) cambiados a 47°C. 100 µl de cultivo fueron tomados a diferentes tiempos para determinar el porcentaje de sobrevivencia.

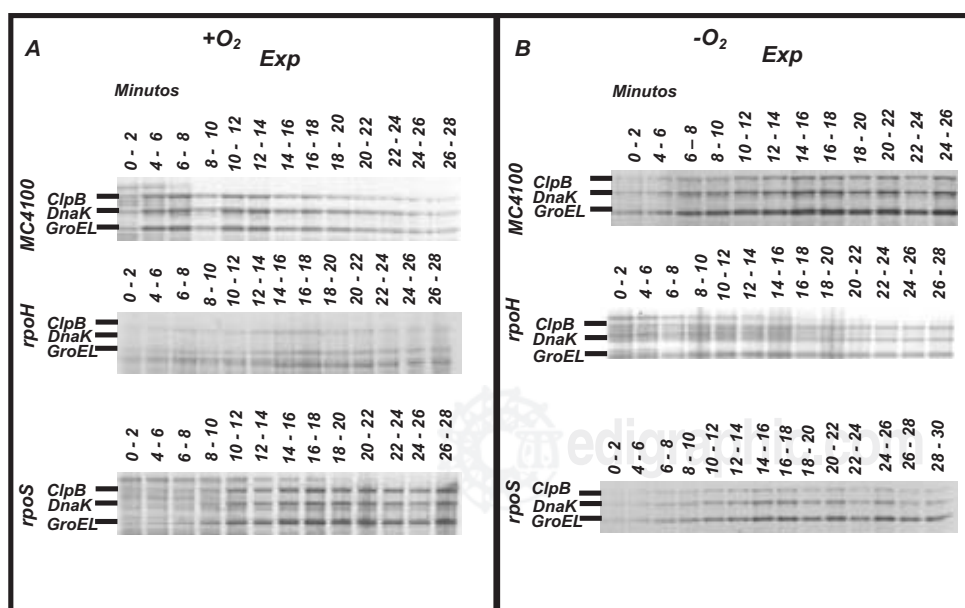


Figura 2. La mutante *rpoH* incapaz de sintetizar Hsp de novo después del estrés térmico. Las células silvestres MC4100 y las mutantes *rpoH* y *rpoS* fueron cultivadas a 30°C en condiciones aeróbicas (A) o anaeróbicas (B) en medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos excepto metionina, al llegar a fase exponencial fue cambiado a 47°C, al mismo tiempo un pulso de 25 µCi de L-[³⁵S]-metionina fue adicionado al cultivo y cazado a los tiempos indicados con 800 µg/ml metionina fría y 40 µg/ml de cloranfenicol. Las alícuotas fueron tomadas y los extractos celulares obtenidos para visualizar la radioactividad por la exposición a placas radiográficas.

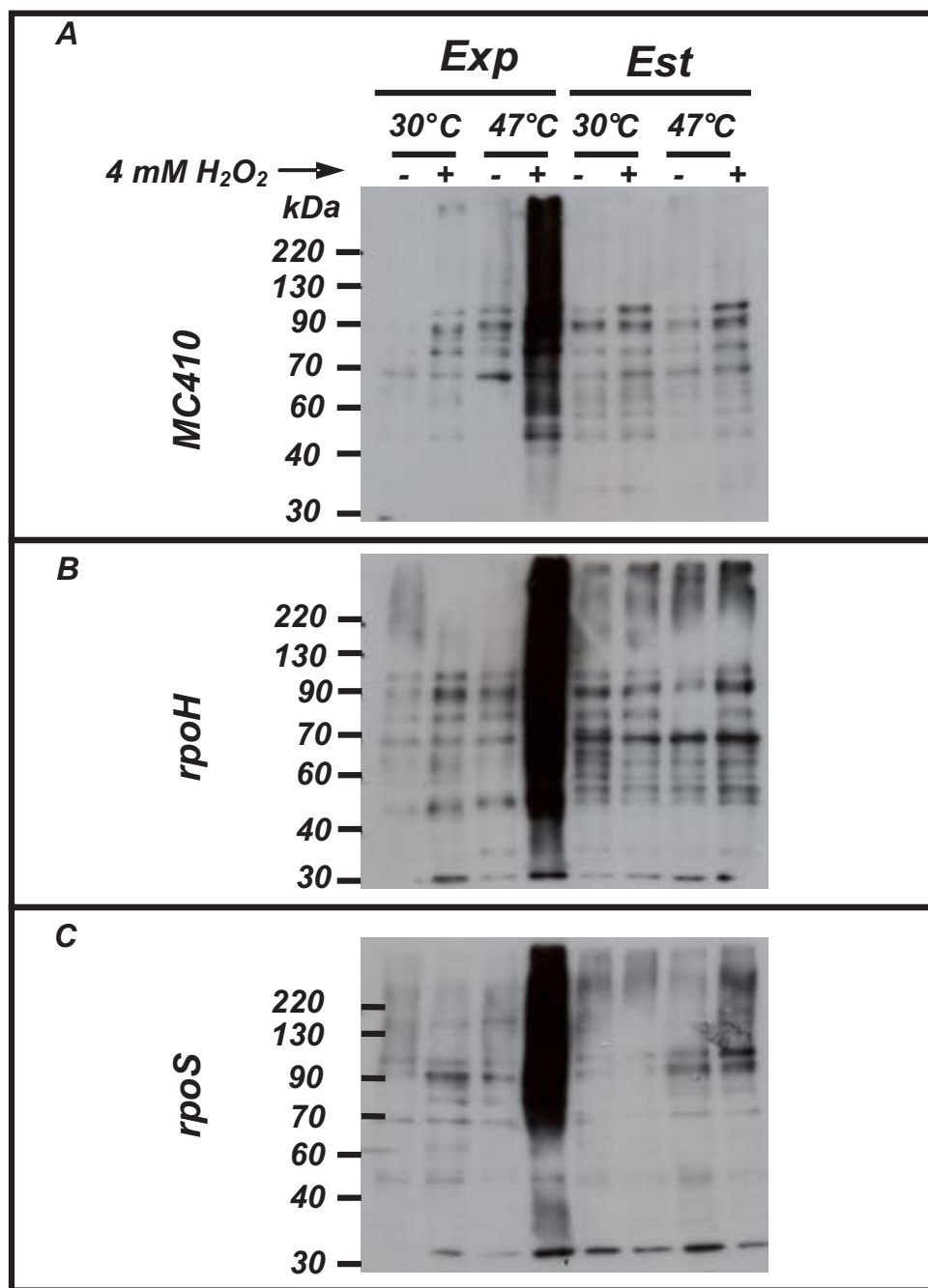


Figura 3. El daño a las proteínas por el estrés oxidativo se incrementa por el estrés térmico. Las células silvestre (A) y las mutantes rpoH (B) y rpoS (C) fueron cultivadas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial (exp) o estacionaria (est) y entonces cambiadas a 47°C. Al mismo tiempo se adiciono (+) o no (-) H₂O₂ a una concentración final de 4 mM. El cultivo continuo durante 1 hora adicional. Los extractos celulares derivatizados con 2,4-DNP. Las proteínas carbonizadas fueron visualizadas mediante el análisis de Wester-blot empleando anticuerpos anti-DNP.

Agradecemos infinitamente los comentarios de la Dra. Carmen Gómez-Eichelmann.

REFERENCIAS

1. Benov, L. & I. Fridovich. 1995. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. J Bacteriol 177:3344-3346.
2. Echave, P., M. A. Esparza-Cerón., E. Cabisco, J. Tamarit, J. Ros, J. Membrillo-Hernández & E.C.C Lin. 2002. DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductase evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 99:4626-4631.
3. Nyström, T. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J 24:1311-1317.

El choque frío y la regulación post-transcripcional en *Escherichia coli*

Fernando Fernández-Ramírez,* Rosa Bermúdez-Cruz,* Cecilia Montañez*,**

* Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508. Apdo. Postal 14-740, 07000. México, D.F. Tel. 5061-3800, Fax 5061-3392.

** Email cecim@cinvestav.mx

Durante el choque frío los parámetros fisicoquímicos en una célula cambian drásticamente, como es el caso de la difusión de solutos y el transporte, la fluidez membranal, la cinética enzimática, la topología, flexibilidad e interacciones de los ácidos nucleicos y proteínas. Para responder a estas condiciones nuevas, los microorganismos cambian su patrón de expresión genética. Esta reprogramación genética se lleva a cabo durante la fase de aclimatación, que es inmediata al choque frío y tiene una duración de 1-4 horas durante las cuales el crecimiento celular se detiene, llevándose a cabo procesos de regulación a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional.^{8,10}

En este trabajo se hace una revisión de algunos eventos importantes de regulación genética que ocurren durante la fase de aclimatación, enfocándonos en la actividad post-transcripcional de las RNasas fosforolíticas como es el caso de la polinucleótido fosforilasa (PNPasa) y la RNasa PH. Estos eventos de regulación tienen un efecto sobre la traducción del mRNA celular y consecuentemente en el reinicio del crecimiento celular, en donde participan sistemas de adaptación al frío como los ribosomas 70S y los factores de inicio de la traducción, el degradosoma de choque frío y las chaperonas de RNA.^{8,12,18}

LOS TERMÓMETROS DE RNA Y LA TRADUCCIÓN PREFERENCIAL DE RNAS DE CHOQUE FRÍO

Los termómetros de RNA son secuencias que generalmente se localizan en el extremo 5'-UTR de varios transcritos y son sensibles a los cambios de temperatura, adoptando distintas conformaciones.¹⁵ En general, a bajas temperaturas los termómetros de RNA forman estructuras secundarias estables que hacen inaccesibles los sitios de unión al ribosoma y en consecuencia previenen la traducción de esos transcritos. Este mecanismo funciona por ejemplo en la entrada de los microorganismos patógenos al hospedero, en donde un incremento de temperatura permite la traducción de transcritos relacionados con la virulencia.¹¹ También se ha descrito un termómetro antisentido que actúa en *trans*, alineándose y desestabilizando a las estructuras secundarias cercanas al sitio de unión del ribosoma, permitiendo así la traducción del transcrito

rpoS a bajas temperaturas.¹⁹ La consecuencia general de la estructuración de los RNAs celulares es la represión de la traducción de varias proteínas. Sin embargo, se ha observado un grupo particular de proteínas inducidas por el frío (CIPs), que se acumulan durante el choque frío: NusA, la PNPasa, la RNasa R, RecA, los factores de iniciación IF1, IF2 e IF3, la DNA girasa, y la helicasa Csd, entre otras.^{5,8,10,14,21} Durante la aclimatación de *E. coli* se expresan 24 proteínas, de las cuales 14 se expresan en forma transitoria. Esta respuesta dinámica al choque frío es análoga pero distinta a la del choque caliente, ya que algunas proteínas características del choque caliente como GroEL y DnaK se reprimen en el choque frío.¹⁰

En *Escherichia coli*, así como en otras bacterias como *Bacillus subtilis* y *Yersinia enterocolitica*, se ha identificado una familia de proteínas de choque frío (CSPs) que se expresan en niveles altos, siendo la más abundante CspA, que en ocasiones llega a constituir el 13% de la síntesis total de proteína durante la aclimatación.⁷ CspA, CspB, CspE y CspG son las principales CSPs en *E. coli*, y todas ellas presentan una traducción preferencial durante el choque frío debida principalmente a la acumulación del factor de iniciación IF3.⁸ Adicionalmente, la baja estructuración de su 5'-UTR, que es inusualmente larga y que presenta una secuencia conservada que se ha denominado "cold-box", le confiere una mayor traducibilidad respecto al resto de mRNAs celulares.¹² Sin embargo, se ha demostrado que la acumulación de CSPs responde fundamentalmente a la estabilización de sus transcritos a bajas temperaturas.³

CHAPERONAS DE RNA: FUNCIÓN CONSERVADA DE ALGUNOS DOMINIOS DE UNIÓN AL RNA

La familia de CspA en *E. coli* está compuesta por 9 genes homólogos, de las cuales 4 se inducen fuertemente durante el choque frío.¹⁷ CspA actúa como chaperona de RNAs, y cuando la proteína llega a una concentración óptima se une cooperativamente al RNA estructurado, de modo que lo desnaturaliza y facilita su traducción o procesamiento post-transcripcional.¹² También se encontró que CspE presenta una actividad similar a CspA en cuanto

a la desnaturalización de ácidos nucleicos.¹⁷ Lo anterior sugiere que las CSPs tienen una actividad redundante, y estudios de mutagénesis muestran que el fenotipo de sensibilidad al frío únicamente se obtiene por la inactivación genética simultánea de *cspA*, *cspB*, *cspE* y *cspG*. De modo interesante, este fenotipo se revierte por la expresión en *trans* de un homólogo estructural de CspA, el dominio de unión al RNA S1, que está ampliamente distribuido en distintas proteínas de diversos organismos.²¹ A nivel de aminoácidos, CspA tiene una identidad de 43% con otro dominio de choque frío (CSD) encontrado en la familia de proteínas eucariontes Y-box.¹² Esta familia de proteínas participa en el silenciamiento traduccional de los mRNAs maternos y se ha demostrado que el dominio CSD es el responsable de la actividad de unión a ácidos nucleicos.² Lo anterior sugiere que estos dominios estructurales juegan un papel importante en el metabolismo del RNA y su traducción, y que probablemente estén relacionados evolutivamente.²¹

DEGRADACIÓN FOSFOROLÍTICA DE LOS RNAs DE CHOQUE FRÍO

A la fecha se han descrito dos eventos de regulación post-transcripcional fundamentales para el reinicio del crecimiento celular después del choque frío, que son la degradación de los mRNAs de las CSPs y la regulación de los niveles de la RNasa R. Estudios en *Y. enterocolitica*, *B. subtilis* y *E. coli* muestran que la actividad fosforolítica, principalmente de la PNPasa (RNasa de la familia de la RNasa PH, que es dependiente de fosfato y que forma parte del degradosoma de RNA²⁰), se induce y es esencial para el crecimiento óptimo a bajas temperaturas.^{9,22,23} El crecimiento celular solamente se restablece cuando el mRNA de *cspA* es degradado, independientemente de la acumulación de las chaperonas de RNA en la célula, y se ha descrito que la PNPasa interviene en la degradación específica del transcrito *cspA*.^{16,22} A pesar de haberse identificado un degradosoma especializado para choque frío,¹⁸ se ha encontrado que esta actividad específica se realiza por vía independiente del degradosoma.²² En las mutantes nulas de PNPasa se acumula el transcrito *cspA*, y dada su traducción preferente en frío, los ribosomas son secuestrados y la traducción del mRNA celular se inhibe, abatiendo el crecimiento bacteriano.¹³ Por otro lado, se ha observado que durante el choque frío en cepas de *E. coli* mutantes para PNPasa, hay una degradación permanente del rRNA 23S, lo que genera ribosomas defectuosos que no presentan un ensamblaje adecuado.²³ La RNasa R es inducida por diversos tipos de estrés y se considera responsable del control de calidad del rRNA, el tRNA y otros RNAs estructurados.⁵ Su transcrito *rnr* se regula negativamente y

específicamente por la PNPasa de manera que la pérdida de regulación ocasiona un incremento permanente en los niveles de RNasa R,⁴ y en consecuencia la degradación extensiva del rRNA 23S. Por todo esto, resulta evidente que la degradación fosforolítica es fundamental para el crecimiento celular a bajas temperaturas. Considerando la amplia distribución de la PNPasa,¹ así como la ventaja energética de la fosforólisis del RNA respecto a la hidrólisis,⁶ es posible que este mecanismo se encuentre altamente conservado en la escala filogenética como un elemento de desarrollo a bajas temperaturas.

REFERENCIAS

1. Bermúdez-Cruz, R., F. Fernández-Ramírez & C. Montañez. 2003. Conserved domains in polynucleotide phosphorylase among eubacteria. *Biochimie* 87(8):737-45.
2. Bouvet, P., K. Matsumoto & A. P. Wolffe. 1995. Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J. Biol. Chem.* 270(47):28297-28303.
3. Brandi, A., P. Pietroni, C. Gualerzi & C. Pon. 1996. Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19:231-240.
4. Cairrao, F., A. Cruz, H. Mori & C. Arraiano. 2003. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol. Microbiol.* 50(4):1349-1360.
5. Chen, C. & M. Deutscher. 2005. Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *J. Biol. Chem.* 280(41):34393-34396.
6. Deutscher, M. & N. Reuven. 1991. Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3277-3280.
7. Goldstein, J., N. S. Pollitt & M. Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(1):283-287.
8. Giuliodori, A., A. Brandi, C. Gualerzi, C. Pon. 2006. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *RNA* 10(2):265-276.
9. Goverde, R., J. Huis in't Velt, J. Kusters & F. Mooi. 1998. The psychrotropic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of *pnp*, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5°C). *Mol. Microbiol.* 28(3):555-569.
10. Graumman, P., & M. A. Marahiel. 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* 166:293-300.
11. Hurme, R., & M. Rhen. 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation – what it all boils down to. *Mol. Microbiol.* 30:1-6.
12. Jiang, W., Y. Hou & M. Inouye. 1997. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272(1):196-202.
13. Jiang, W., L. Fang & M. Inouye. 1996. The Role of the 5'-End untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. *J. Bacteriol.* 178:4919-4925.
14. Jones, P.G., R.A. VanBogelen & F.C. Neidhardt. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:2092-2095.

15. Narberhaus, F., T. Waldminghaus & S. Chowdhury. 2006. RNA thermometers. FEMS Microbiol. Rev. 30:3-16.
16. Neuhaus, K., S. Rapposch, K. Francis & S. Scherer. 2000. Restart of exponential growth of cold-shocked *Yersinia enterocolitica* occurs after down-regulation of cspA1/A2 mRNA. J. Bacteriol. 182(11):3285-3288.
17. Phadtare, S., & K. Severinov. 2005. Nucleic acid melting by *Escherichia coli* CspE. Nucleic Acids Res. 33(17):5583-5590.
18. Prud'homme-Généreux, A., R. Beran, I. Iost, C. Ramey, G. Mackie & R. Simons. 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a cold shock degradosome. Mol. Microbiol. 54(5):1409-1421.
19. Repoila, F., N. Majdalani & S. Gottesman. 2003. Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. Mol. Microbiol. 48:855-861.
20. Symmons, M., M. Williams, B. Luisi, G. Jones & A. Carpousis. 2002. Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. Trends Biochem. Sci. 27(1):11-18.
21. Xia, B., H. Ke & M. Inouye. 2001. Aquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 40(1):179-188.
22. Yamanaka, K. & M. Inouye. 2001. Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183(9):2808-2816.
22. Zhou, Z., M. Deutscher. 1997. An essential function for the phosphate-dependent exoribonucleases RNase PH and polynucleotide phosphorylase. J. Bacteriol. 179:4391-4395.

Correspondencia:

M. Carmen Gómez Eichelmann
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal 70-228, 04510 México, D. F.
E-mail: cargom@servidor.unam.mx