

Daño térmico *in vivo* al nucleoide de *Escherichia coli**

J. R. Pellón ** y R. F. Gómez

Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, Massachusetts, 02139, U.S.A.

(Recibido el 31 de marzo de 1980)

J. R. PELLON and R. F. GOMEZ. *In vivo Heat Damage to the E. coli Nucleoid*. Rev. esp. Fisiol., 37, 189-196. 1981.

The effect of heat damage *in vivo* on the tertiary structure of *E. coli* folded chromosome or nucleoid was studied by sedimentation in neutral sucrose gradients. The heat treatment produced an increase in the amount of protein associated with the nucleoid together with an unfolding of the nucleoid structure as determined by the increase in speed dependence.

Durante muchos años, el mecanismo de inactivación térmica de las bacterias ha atraído una considerable atención, debido principalmente a que el calor ha sido y continúa siendo uno de los agentes más empleados en la esterilización de toda clase de materiales y en la producción y conservación de alimentos. Recientemente, el mecanismo por el cual el tratamiento térmico (42-45° C) actúa en células de mamíferos ha sido objeto de estudio (4, 7) por su empleo en el tratamiento clínico de diferentes tumores e incluso se ha dedicado a este tema un Congreso Internacional (6). Los avances técnicos de los

últimos años han hecho posible que, tanto la forma de administrar el calor como la medida exacta de la temperatura en el tumor puedan controlarse con relativa facilidad, siendo ambos parámetros fundamentales para una actividad terapéutica adecuada. Teniendo en cuenta los factores anteriores, es de un enorme interés práctico el conocimiento del mecanismo(s) de acción del tratamiento térmico a nivel molecular.

En las células bacterianas, el tratamiento térmico produce una gran variedad de alteraciones en su estructura y funcionalismo, por ejemplo, WOODCOCK y GRIGG (11) han demostrado la inducción de roturas sencillas (una cadena) y dobles (ambas cadenas) del ADN de *Escherichia coli*, después de un calentamiento a 52° C.

Para determinar el efecto del tratamiento térmico en las bacterias, se ha optado por observar los cambios producidos en su cromosoma, que es una es-

* Parte de este trabajo fue presentado en el VII Congreso Nacional de Microbiología. Cádiz, 1979.

** Dirección actual: Instituto Tecnológico de Postgraduados. Paseo Juan XXIII, 3. Madrid-3 (España).

estructura fundamental en el funcionalismo y la división celular. De la suerte que corra la integridad estructural del ADN en el cromosoma dependerán los demás componentes celulares, que se forman directa o indirectamente a partir del mismo y que, en caso de estar dañados, pueden ser repuestos en vez de reparados.

El cromosoma plegado o nucleóide es una estructura compacta y no viscosa (8) que comprende la totalidad del genoma bacteriano junto con ARN y proteína que colaboran en su organización estructural (fig. 1). Hoy en día se piensa que el nucleóide posee una estructura semejante a la del cromosoma *in vivo*. Además, y más importante para este estudio, los cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria del nucleóide se reflejan en cambios de sus propiedades de sedimentación.

El propósito de este trabajo es la investigación de los efectos que el tratamiento térmico tiene en el nucleóide de *E. coli*.

Material y métodos

Productos químicos y enzimas. El Sarkosyl NL-95 (N-laurilsarcosinato sódico) fue un obsequio de Ciba-Geigy Dyestuffs and Chemicals Division, Greensboro (N. Carolina, USA). El fluorinert FC-48 fue proporcionado gratuitamente por la compañía 3M (Saint Paul, Minn., USA). El Angio-Conray (iotalamato sódico) procede de la División Farmacéutica de Mallinckrodt. La sacarosa es especial para gradientes de densidad (libre de ribonucleasa) y se obtuvo de Schwarz-Mann. El resto de productos químicos proceden de Sigma. Metil-(¹⁴C) timidina (47,5 mCi/mol), L-(4,5-H³)-leucina (60 Ci/mol), aquasol y miniviales proceden de New England Nuclear (Boston, Mass., USA).

La lisozima (EC 3.2.1.17; muramidasa), procedente de clara de huevo, grado I, cristalizada 3X, 38.500 U/mg se obtuvo de Sigma.

Microorganismo. La cepa utilizada (KU105) (9) es una derivada de *Escherichia coli* K-12 de la colección de cultivos del Dr. Howard-Flanders, designada AB1157, que es *wild-type* en cuanto a capacidad de reparación (2) y fue obtenida a través del Dr. Botstein, del Departamento de Biología de MIT (cepa D5608). En su aislamiento se empleó una selección con trimetoprim (3) para obtener cepas capaces de crecer a una concentración de timina de 2 µg/ml (requerimiento escaso de timina). La cepa así obtenida se mantuvo en placas de agar luria a temperatura ambiente, sembrándose cada dos semanas en el mismo medio.

Medios microbiológicos y soluciones tampón. El buffer M9 contiene los siguientes componentes por litro: Po₄HNa 7 g, Po₄H₂K 3 g, ClNa 0,5 g, ClNH₄ 1 g, SO₄Mg·7H₂O 25 g. El medio agar luria contiene por litro: bacto-triptona 10 g, ClNa 10 g, bacto-extracto de levadura 5 g, y bacto-agar 15 g. Todos estos componentes se obtuvieron de Difco.

Condiciones de cultivo del microorganismo. El medio de cultivo (medio químicamente definido) se preparó inmediatamente antes de usarlo. Para ello se combinaron 10 ml del buffer M9 a doble concentración; 10 ml de una solución de aminoácidos que contenía disoluciones 2×10^{-3} M de L-arginina; L-histidina, L-leucina, L-prolina y L-treonina; 0,15 ml de una solución de glucosa al 40 %, 0,1 ml de una solución de tiamina (0,1 mg/ml; esterilizada por filtración); y 0,2 ml de una solución de timina (1 mg por ml).

Se prepararon cultivos inoculando una cantidad dada (20 ml) del medio descrito anteriormente con microorganismos procedentes de placas de agar luria; la incubación se llevó a cabo a 37° C durante 12-18 horas con agitación (220 rpm). A partir de este cultivo en fase estacio-

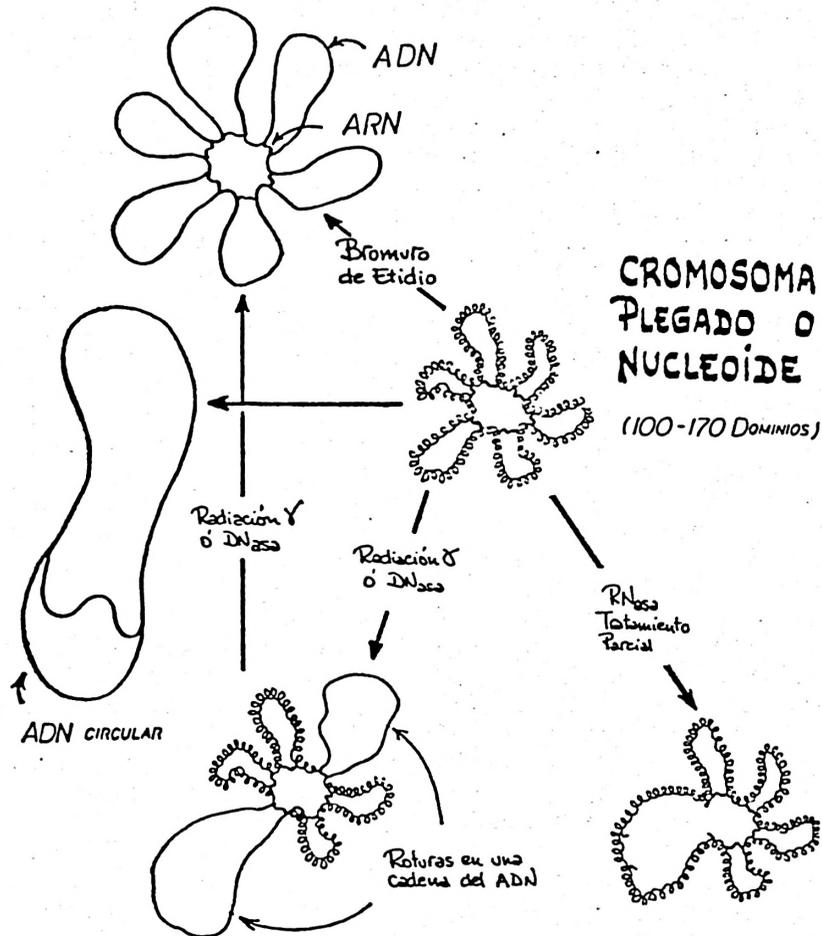


Fig. 1. Modelo de la organización del ADN en el cromosoma plegado o nucleoide de *Escherichia coli*.

Se observa una modificación, basada en datos obtenidos por ULMER *et al.* (10) en nuestro laboratorio, del modelo propuesto por PETTJOHN (5) para el nucleoide o cromosoma plegado de *E. coli*. Una (o más) molécula(s) de ARN unida a dos o más lugares del cromosoma definiría la posición de un pliegue del ADN e impediría la rotación de la doble hélice en los sitios de unión ADN-ARN. El ADN unido de esta forma a gran cantidad de moléculas de ARN (1.000-3.000) quedaría estructurado en dominios o regiones de superenrollamiento. Se observan también diferentes tratamientos que se han empleado para determinar la importancia de los diversos componentes en la estructura del nucleoide. Por ejemplo, el tratamiento con el agente intercalante bromuro de etidio produciría una pérdida del superenrollamiento del ADN, pero en cambio no reduciría el número de dominios o regiones del nucleoide.

naría se realizó un subcultivo (0,2 ml) en el mismo medio definido (20 ml), conteniendo esta vez la cantidad apropiada de material radiactivo y diferentes cantidades de glucosa (0,25 ml) y timina (10 μ l).

Marcaje radiactivo y tratamiento térmico. Los productos químicos radiactivos se añadieron al medio al realizar el subcultivo. Las cantidades de material radiactivo fueron 200 μ l (20 μ Ci) de C^{14} -timidina y 200 μ l (200 μ Ci) de H^3 -leucina. Al alcanzar los cultivos la fase exponencial (4 h, 37° C, 150 rpm) se transfirieron a un baño New Brunswick a 50° C ($\pm 0,20^\circ$ C, 150 rpm) durante períodos de tiempo diferentes (el tiempo para alcanzar la temperatura de trabajo fue de 60-90 segundos).

Aislamiento de los cromosomas plegados o nucleoides. Los cultivos tratados térmicamente (aproximadamente 4×10^9 células) se centrifugaron (7.000 rpm, 5 min, 4° C) y el sedimento se resuspendió en 3 ml de solución A a 0° C. La solución A estaba compuesta de 20 % (w/v) de sacarosa libre de ribonucleasa, 0,1 M de ClNa y 0,01 M de Tris-ClH buffer (pH 8,2). Una alícuota (0,2 ml) de esta suspensión celular fue transferida a tubos de ensayo (12 \times 75 mm) y mantenida a 0° C, temperatura a la que se añadieron 0,050 ml de solución B; a continuación los tubos se agitaron ligeramente. La solución B contiene 0,12 M Tris-ClH buffer (pH 8), 50 mM EDTA y 4 mg/ml de lisozima.

Los tubos de ensayo se transfirieron primero a un baño a 25° C durante 5 min con agitación ocasional y después a un baño a 0° C durante 1 min. Se añadieron 0,25 ml de solución C a 0° C, se agitaron ligeramente y mantuvieron 15 min a 0° C. La solución C contiene 1 % (w/v) de Brij-58 (polioxietileno 20-cetil éter), 0,4 % (w/v) de deoxicolato sódico, 2 % (w/v) de Sarkosyl NL-97 (lauril sarcosinato sódico), 2 M ClNa y 10 mM EDTA (pH

8,2). De este lisado celular se tomaron 0,1 ml con una pipeta Clay-Adams con punta plástica de boca ancha y se colocaron cuidadosamente en gradientes neutros de sacarosa.

Centrifugación en gradientes de sacarosa. Los gradientes de sacarosa (10-50 % w/v) se formaron con soluciones que contenían ClNa 1 M, solución Tris-ClH 0,01 M (pH 8,2), EDTA 1 mM y sacarosa especial para gradientes de densidad (libre de ribonucleasa). Se emplearon específicamente gradientes de 10 % a 50 % porque en ellos se pueden observar simultáneamente la presencia, en el perfil de sedimentación, de nucleoides libres de membrana y de nucleoides asociados a la membrana. Los gradientes se formaron individualmente a temperatura ambiente empleando una cámara mezcladora de gradientes Buchler y su correspondiente bomba peristáltica. Previamente a la formación de los gradientes (4,8 ml) se colocó en el fondo de los tubos de centrifuga una capa (0,3 ml) de alta densidad compuesta de sacarosa (50 % w/v) disuelta en angio-Conray (80 % iotalamato sódico). Todos los gradientes se formaron en tubos de centrifuga de nitrato de celulosa (2,3 \times 5,1 cm) y antes de usarse se enfriaron a 4° C durante 2 h como mínimo.

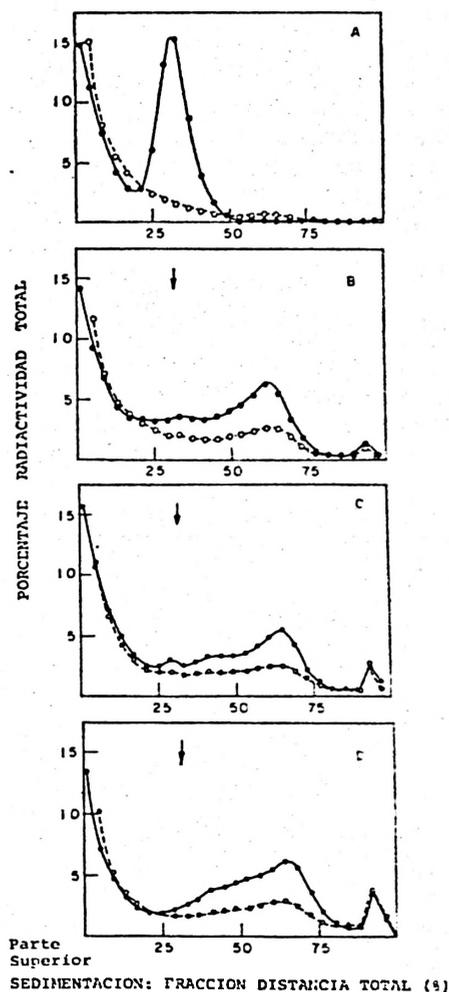
Los gradientes con el lisado celular se centrifugaron en una ultracentrifuga Beckman L5-75 con un rotor SW 50.1 de cubetas oscilantes. Su integrador es de ω^2t , de modo que cuando se usa en *Preset* integra automáticamente el campo centrífugo total (ω^2t total) sin tener en cuenta la velocidad del rotor (rpm). El ω^2t total fue siempre 6×10^9 rad²/s.

Los gradientes se fraccionaron por la parte superior usando un fraccionador ISCO modelo 640 Density Gradient Fractionator. Fluorinert FC-48, que es una solución densa y no miscible, se bombeó a través de la parte inferior del tubo de centrifuga a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones de 0,2 ml se recogieron en mi-

niviales y la radiactividad se contó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-230 después de añadir 3 ml de aquasol (más 10% w/v de H₂O) por fracción.

Resultados y discusión

El efecto del tratamiento térmico *in vivo* en los nucleoides se observa en la figura 2. Las células se marcaron radiactivamente con C¹⁴-timidina y leucina tritiada durante el crecimiento a 37° C, luego se calentaron a 50° C y después se lisaron para obtener sus nucleoides siguiendo la técnica descrita en Material y métodos. Esta técnica incluye dos fases: en la primera se obtienen esferoplastos mediante un tratamiento con lisozima en un medio equilibrado osmóticamente y en la segunda se lisan los esferoplastos en un medio de alta fuerza iónica. Los lisados se analizaron mediante sedimentación en gradientes neutros de sacarosa (10-50%). Los nucleoides de las células que no sufrieron tratamiento térmico (pico en el perfil de sedimentación del ADN, fig. 2 A) tienen un coeficiente de sedimentación de 1.800 S (1). Las figuras 2 B a 2 D muestran los perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células calentadas durante 15, 30 y 60 minutos a 50° C. En estos nucleoides se observa un incremento de su coeficiente de sedimentación (hasta 4.500 S) y una mayor cantidad de proteína cosedimentada con ellos. Cuando estos nucleoides se tratan con DNasa I y se someten posteriormente a sedimentación, el ADN y también la proteína aparece en la parte superior del gradiente indicando que la proteína está en



nencial, se transfirieron a un baño a 50° C y se recolectaron mediante centrifugación a 7.000 r.p.m. Las células fueron lisadas y los lisados centrifugados a 4.000 rpm y 4° C en gradientes neutros de sacarosa hasta un total de 6×10^2 rad²/s. Los gradientes se fraccionaron por la parte superior (0,2 ml/fracción). A: Células no calentadas (C¹⁴ = 6.400 CPM; H³ = 135.000 CPM). B: 50° C, 15 min (C¹⁴ = 9.400 CPM; H³ = 210.000 CPM). C: 50° C, 30 min (C¹⁴ = 7.700 CPM; H³ = 173.000 CPM). D: 50° C, 60 min (C¹⁴ = 6.800 CPM; H³ = 182.000 CPM). Las flechas en B, C y D indican la posición de los nucleoides procedentes de células sin calentar. ●-● C¹⁴-timidina; ○-○ H³-leucina.

Fig. 2. Perfiles de sedimentación de los nucleoides procedentes de células calentadas. Los cultivos se marcaron radiactivamente con C¹⁴-timidina y H³-leucina hasta su fase expo-

realidad asociada al ADN del nucleóide después del tratamiento térmico.

Los cambios estructurales en el nucleóide se pueden determinar estudiando la dependencia de su coeficiente de sedimentación en la velocidad a la que se lleva a cabo la centrifugación de los gradientes. La sedimentación de los nucleóides se llevó a cabo a 4.000 rpm; haciendo el mismo experimento a 3.000 rpm y marcando solamente el ADN de las células con C^{14} -timidina, se observa que los nucleóides tratados térmicamente aparecen como una población más homogénea y con un coeficiente de sedimentación mayor que a 4.000 rpm (fig. 3). La com-

paración de los perfiles de sedimentación de los nucleóides (figs. 2 y 3) indica que el coeficiente de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas es extremadamente dependiente de la velocidad de centrifugación, lo que a su vez es indicativo del desdoblamiento o despliegue de los dominios del ADN en el nucleóide como han demostrado HECHT *et al.* (1). Por el contrario, el coeficiente de sedimentación de los nucleóides no tratados térmicamente es prácticamente independiente de la velocidad de centrifugación en el rango 3.000-4.000 rpm.

De este trabajo se concluye: que el tratamiento térmico afecta al nucleóide de *Escherichia coli*, produciendo su asociación con proteína celular, y que el nucleóide sufre un desdoblamiento o despliegue de sus dominios de ADN.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer a los doctores A. Herrero y P. Hernández, del Instituto Tecnológico de Postgraduados de Madrid, sus discusiones y comentarios durante la preparación del presente manuscrito.

Resumen

Se ha investigado el efecto del tratamiento térmico (50° C), en la estructura terciaria del nucleóide de *Escherichia coli*, mediante el análisis de sus propiedades de sedimentación a baja velocidad en gradientes neutros de sacarosa. El tratamiento térmico origina la asociación de proteína celular al nucleóide, así como un desdoblamiento o despliegue de los dominios de ADN.

Bibliografía

1. HECHT, R. M., STIMPSON, D. y PETTIJOHN, D. E.: *J. Mol. Biol.*, 111, 257-277, 1977.
2. HOWARD-FLANDERS, P. y THERIOT, L.: *Genetics*, 53, 1137-1150, 1966.
3. MILLER, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., U.S.A., 1972, pp. 218-220.

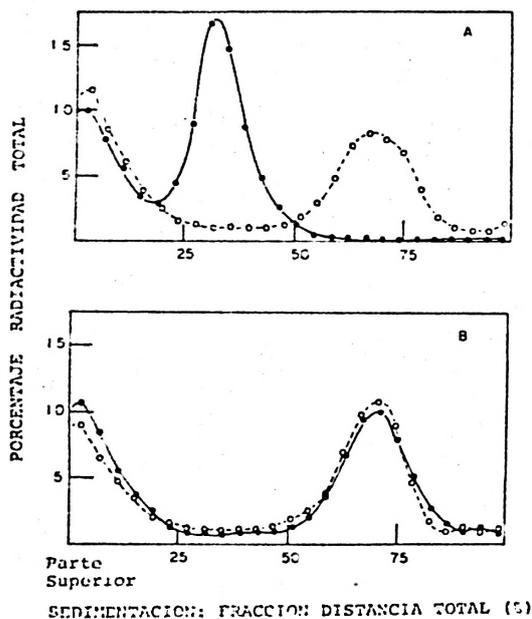


Fig. 3. Perfiles de sedimentación de los nucleóides procedentes de células calentadas. El procedimiento experimental fue el mismo descrito en la figura 3, con la excepción de la velocidad de centrifugación de los gradientes, que en este caso se llevó a cabo a 3.000 rpm. A: ●—● células no calentadas (C^{14} = 17.600 CPM); ○---○ 50° C, 15 min (C^{14} = 12.600 CPM). B: ●—● 50° C, 30 min (C^{14} = 12.700 CPM); ○---○ 50° C, 60 min (C^{14} = 11.300 CPM).

4. MONDOVI, B., FINAZZI-AGRO, A., ROTILIO, G., STROM, R., MORICCA, G. y ROSSI-FANELLI, A.: *Europ. J. Cancer.*, 5, 137-146, 1969.
5. PETTIJOHN, D. E.: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 4, 175-202, 1976.
6. Proceedings of the International Symposium on Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation, Washington, D.C., 1975. American College of Radiology, Chevy Chase, MD., 1976.
7. ROTI-ROTI, J. L. y WINWARD, R. T.: *Radiat. Res.*, 74, 159-169, 1978.
8. STONINGTON, O. G. y PETTIJOHN, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 6-9, 1971.
9. ULMER, K. M.: Doctoral Thesis. MIT, Cambridge, Mass. USA, 1978.
10. ULMER, K. M., GÓMEZ, R. F. y SINSKEY, A. J.: *J. Bacteriol.*, 138, 475-485, 1979.
11. WOODCOCK, E. y GRIGG, G. W.: *Nature New Biol.*, 237, 76-79, 1972.

