

## CARTA AL EDITOR

### Microscopía electrónica del ADN en los nucleoides después de un tratamiento térmico

La totalidad del ADN en el cromosoma bacteriano se puede aislar como una estructura particulada (compacta y no viscosa), lisando cuidadosamente las bacterias en un medio de alta fuerza iónica (1 M ClNa) y presión osmótica adecuada (8). La estructura así aislada se llama nucleoide y tiene el mismo tamaño, contenido en ADN y número de dominios o regiones de superhelicidad que el cromosoma *in vivo* (10, 12). El nucleoide como sistema modelo tiene la ventaja de mantener la estructura terciaria del ADN (superhelicidad y plegado); hoy se sabe que la estructura terciaria del ADN afecta a todas las funciones celulares relacionadas con el ADN y por lo tanto es fundamental en el funcionalismo bacteriano (6). Los cambios en la estructura terciaria del nucleoide se reflejan en cambios de sus propiedades de sedimentación (2, 9).

El calentamiento de las células bacterianas a temperaturas moderadas (50° C) origina la asociación de proteínas con el nucleoide (8). Esta asociación ocurre también en células de mamíferos después de un tratamiento térmico (11). Tanto en células procariotas como eucariotas se ha demostrado la disociación de la proteína del ADN durante un período de reparación celular a 37° C (7, 11). La similitud de la respuesta sugiere que se trata de un mecanismo generalizado de respuesta al calor. El estudio del mecanismo de acción

del tratamiento térmico (hipertermia) es importante en la actualidad debido a su uso como coadyuvante en el tratamiento clínico de cierto tipo de tumores (1).

El propósito del presente trabajo es la visualización, mediante microscopía electrónica, del efecto del tratamiento térmico en el ADN del nucleoide. La técnica empleada fue la de VOLLENWEIDER *et al.* (libre de proteína) (14), ya que la de KLEINSCHMIDT (monocapa de citocromo C) (3, 4) presentó dificultades en el momento de esparcir los nucleoides asociados con proteína, debido a que éstos no parecen mantenerse en la interfase aire-agua, que contiene la monocapa de citocromo C, bajo nuestras condiciones experimentales. La técnica de VOLLENWEIDER *et al.* utiliza cloruro de benzildimetilalkilamonio (CBA) para esparcir el ADN. El CBA tiene un peso molecular de 340-368, unas 35 veces inferior al del citocromo C y, debido a que no origina un engrosamiento detectable del ADN, es un método ideal para el estudio de las interacciones ADN-proteína (14).

Los nucleoides se obtuvieron según el procedimiento ya publicado (8), a partir de células de *E. coli* K-12 que han sufrido un tratamiento térmico a 50° C durante 30 minutos (8). Estos nucleoides, visualizados mediante la técnica que se describe en la figura 1, aparecen como corpúsculos de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro,

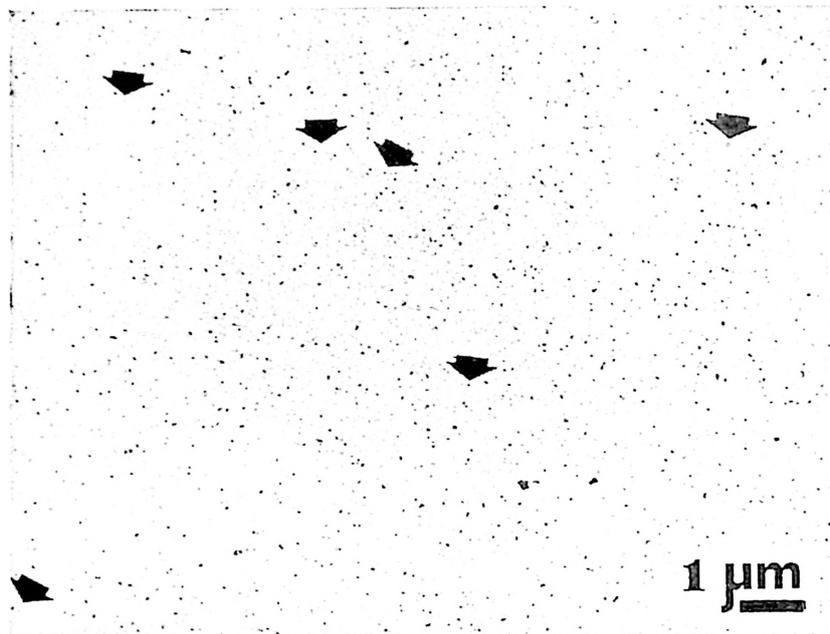


Fig. 1. Microscopia electrónica del ADN de nucleoides procedentes de células de *E. coli* K-12 que han sufrido un tratamiento térmico.

Cultivos de *E. coli* K-12, KU 105 (8) en fase exponencial sufrieron un tratamiento térmico a 50° C durante 30 min y posteriormente se lisaron las células para obtener sus nucleoides (8). Los lisados celulares con los nucleoides (0° C) se transfirieron a una fuente de radiación gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) (40 krad) en una Gammacell 220 (Atomic Energy Ltd., Canadá) (13). Un volumen de 0,3 ml de estos lisados se mezcló con 2,7 ml de una solución que contenía  $2,2 \times 10^{-4}$  % de CBA (Bayer, Leverkusen, Alemania), 1 M ClNa y 0,01 M Tris buffer (pH 8,2). Unas gotas de la mezcla (0,1 ml) se colocaron en Parafilm y en presencia de vapor de formaldehído se realizó el esparcido del ADN durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación las muestras se recogieron en rejillas (*grid*) de microscopio electrónico cubiertas con una capa de Parlodium (15-30 s). Las preparaciones se contrastaron con acetato de uranio/etanol (10  $\mu\text{l}$  de acetato de uranio al 2 % y 10 ml de etanol al 90 %) durante 20-30 s. Después de un lavado con etanol al 90 % (20-30 s), las muestras se sombrearon con platino-paladio con rotación a 10°. La micrografía electrónica se tomó en un microscopio electrónico Jeol JEM 100-B a 60 kV, a un aumento de 5.000 X. Las flechas señalan proteínas asociadas al ADN.

arrosariados y ramificados (5), por lo que para poder observar su ADN se los trató *in vitro* con radiación gamma, que ocasiona la rotura del ADN en trozos más pequeños. De esta forma se puede observar (fig. 1) la doble hélice de ADN en una forma lineal. La proteína que se asocia al nucleóide durante el tratamiento térmico (8, 9) y que, al menos en par-

te, parece ser proteína sintetizada durante el choque térmico (J. R. PELLÓN, datos sin publicar), no aparece cubriendo al ADN, aunque sí parece que algunas proteínas están asociadas al ADN (flechas).

#### Agradecimiento

El autor desea agradecer a la Dra. M.<sup>a</sup> A. Olagorta su ayuda durante la obtención de las micrografías.

## Bibliografía

1. CONFERENCE ON HYPERTERMIA IN CANCER TREATMENT. American Cancer Society: *Cancer Res.*, 39, 2231-2340, 1979.
2. HECHT, R. M., STIMPSON, D. y PETTIJOHN, D. E.: *J. Mol. Biol.*, 111, 257-277, 1981.
3. KAVENOFF, R. y BOWEN, B. C.: *Chromosoma*, 59, 89-101, 1976.
4. KLEINSCHMIDT, A.: *Methods Enzymol.*, 12-B, 361-379, 1968.
5. MATERMAN, E. C. y VAN GOOL, A. P.: *J. Bacteriol.*, 135, 703-706, 1978.
6. PELLÓN, J. R.: *Ibérica, Actualidad Científica*, 1982 (en prensa).
7. PELLÓN, J. R. y GÓMEZ, R. F.: *J. Bacteriol.*, 145, 1456-1458, 1981.
8. PELLÓN, J. R. y GÓMEZ, R. F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 189-196, 1981.
9. PELLÓN, J. R. y GÓMEZ, R. F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 463-468, 1981.
10. PETTIJOHN, D. E.: *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 4, 175-202, 1976.
11. ROTI-ROTI, J. L. y WINWARD, R. T.: *Radiat. Res.*, 74, 159-169, 1978.
12. SINDEN, R. R. y PETTIJOHN, D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 224-228, 1981.
13. ULMER, K. M., GÓMEZ, R. F. y SINSKEY, A. J.: *J. Bacteriol.*, 138, 475-485, 1979.
14. VOLLENWEIDER, H., SOGO, J. M. y KOLLER, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 83-87, 1975.

J. R. PELLÓN \*

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

(Recibido el 25 de enero de 1982)

---

\* Dirección actual: Instituto Tecnológico para Postgraduados; P.º Juan XXIII, 3; Madrid-3, España.

