

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética



Tesis Doctoral

*“Replicación inducida por estrés térmico en
cromosoma y plásmidos
de Escherichia coli”*

*Memoria presentada por la
Lcda. M^a del Rocío González Soltero
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Extremadura*

Badajoz, Marzo 2007

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

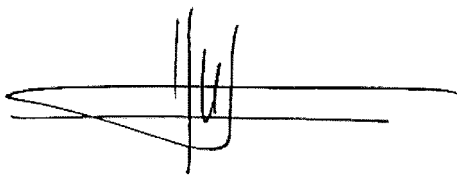
Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>

Alfonso Jiménez Sánchez, Catedrático de Genética
de la Universidad de Extremadura, y
Emilia Botello Cambero, Profesora Asociada de Genética
de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado "Replicación inducida por estrés térmico en cromosoma y plásmidos de *Escherichia coli*", ha sido realizado por la Lcda. M^a del Rocio González Soltero, bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de esta Universidad, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Badajoz a 12 de enero de 2007.



Fdo. Dr. Alfonso Jiménez Sánchez



Fdo. Dra. Emilia Botello Cambero

*A mis padres
A mi hermana*

*"Es necesario que haya uno o
varios principios y aún, en caso de
existir uno sólo, que éste sea inmóvil e
inmutable"*

Aristóteles

Índice

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA	3
1.1. Topoisomerasas de DnaA.....	4
1.1.1. Mecanismo de acción de la girasa	5
1.1.2. Inhibición de la girasa	6
2. CICLO CELULAR BACTERIANO	7
3. REPLICACIÓN CROMOSÓMICA	8
3.1. Estructura de <i>oriC</i>	8
3.2. Etapas de la replicación.....	10
3.2.1. Iniciación	10
3.2.2. Elongación.....	13
3.2.3. Terminación.....	16
3.3. Regulación del inicio de la replicación cromosómica	16
4. REPLICACIÓN Y RECOMBINACIÓN	18
4.1. Progresión de las horquillas de replicación.....	18
4.2. Reparación de roturas de doble cadena (DSBs) y replicación dependiente de recombinación	19
4.3. Múltiples vías de ensamblaje del primosoma para la reanudación de la horquilla de replicación.....	22
5. RESPUESTAS DE ESTRÉS	23
5.1. Respuesta SOS	23
5.2. Respuestas al estrés ambiental	25
5.3. Replicaciones de estrés: HIR y SDR.....	26
6. REPLICACIÓN DE MINICROMOSOMAS	28
7. REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS	29
7.1. Regulación por iterones.....	30
7.1.1. Replicación de F	31
7.1.2. Replicaciones de P1	33
7.1.3. Replicación de pSC101.....	33
7.2. Replicación por RNA antisentido	34
7.2.1. Replicación de R1.....	34
7.2.2. Replicación de ColE1	35
<u>OBJETIVOS</u>	37
<u>MATERIALES</u>	41
1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y FAGOS	43
1.1. Estirpes bacterianas	43

1.2. Plásmidos	49
1.3. Fago P1 <i>vir</i>	50
2. PRODUCTOS QUÍMICOS	50
2.1. Drogas	50
2.2. Desoxinucleótidos marcados.....	51
3. SOLUCIONES Y TAMPONES	51
3.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	51
3.2. Electroforesis de DNA	52
3.2.1. Electroforesis convencional	52
3.2.2. Electroforesis en campo pulsante.....	52
3.3. Medida de la síntesis de DNA <i>in vivo</i>	53
3.4. Citometría de flujo	53
3.5. Microarrays de DNA.....	54
3.6. Microscopía.....	54
3.7. Determinación de la actividad β -galactosidasa	54
4. MEDIOS DE CRECIMIENTO	54
5. ENZIMAS	55
6. MARCADORES DE DNA	56
6.1. Marcadores para electroforesis convencional	56
6.2. Marcadores para electroforesis en campo pulsante	56
7. OLIGONUCLEÓTIDOS.....	56
8. KITS	56
7. SECUENCIAS	57
<u>MÉTODOS</u>	59
1. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS	61
2. CRECIMIENTO BACTERIANO: DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE GENERACIÓN.....	61
3. CAMBIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	62
4. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO	62
4.1. Marcaje del DNA <i>in vivo</i>	62
4.2. Medida de la síntesis de DNA y análisis de HIR.....	63
4.2.1. En crecimiento exponencial	63
4.2.2. Tras la inhibición de inicios de replicación	63
4.2.3. Tras la inducción de inicios de replicación por estrés térmico: análisis de HIR ...	64
5. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	65

6. PURIFICACIÓN DE DNA	66
6.1. Extracción con fenol:cloroformo	66
6.2. Sistema de columnas microcon YM-30	66
7. ELECTROFORESIS DE DNA	66
7.1. Electroforesis convencional	66
7.2. Electroforesis en campo pulsante	67
7.2.1. Preparación y tratamiento de bloques de agarosa y DNA	67
7.2.2. Electroforesis y procesamiento del gel	68
8. TRANSFORMACIÓN	68
8.1. Electroporación	68
8.2. Método del $CaCl_2$	70
9. TRANSDUCCIÓN	70
9.1. Multiplicación de fagos	71
9.2. Transducción	71
10. CITOMETRÍA DE FLUJO	72
10.1. Fijación de las células	72
10.2. Tinción de las muestras	72
10.3. Análisis de las muestras	73
11. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE Y EPIFLUORESCENCIA	73
11.1. Preparación de las muestras	74
11.2. Análisis de las muestras	74
12. MICROARRAYS	74
12.1. Microarrays de DNA genómico para el estudio de la replicación del DNA	75
12.1.1. Impresión de microarrays	75
12.1.2. Toma de muestras	75
12.1.3. Preparación de DNA genómico	76
12.1.4. Marcaje de DNA genómico	77
12.1.5. Hibridación, lavado y secado de microarrays	77
12.1.6. Escaneado, captura de imágenes y análisis de datos	78
12.2. Microarrays de cDNA	78
12.2.1. Impresión de microarrays	79
12.2.2. Toma de muestras	79
12.2.3. Preparación de RNA	79
12.2.4. Obtención y marcaje de cDNA	80
12.2.5. Hibridación, lavado y secado de microarrays	80
12.2.6. Escaneado, captura de imágenes y análisis de datos	80
13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA	81
14. CUANTIFICACIÓN DE LA REPLICACIÓN EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS POR FLUOROMICROSCOPIA	82
14.1. Determinación del número de copias en cultivo exponencial	82
14.2. Medida de la inducción de la replicación en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico	83

15. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS	83
16. PREDICCIÓN DE SITIOS SIDD	83
RESULTADOS	85
CAPÍTULO 1: DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN <i>oriC</i> PARA EL INICIO DE HIR	87
1. EL INICIO DE HIR TIENE LUGAR SÓLO EN <i>oriC</i>	87
2. MUTACIONES FUNCIONALES DE <i>oriC</i> PERMITEN HIR	89
2.1. Mutaciones en la secuencia de unión de DnaA	89
2.2. Mutaciones en sitios de unión de las proteínas IHF y Fis	90
2.3. Mutantes de elección e inserción de <i>oriC</i>	91
3. HIR NO ESTÁ RELACIONADA CON EL FENOTIPO DE ASINCRONÍA	92
4. EL PLÁSMIDO R1 INTEGRADO EN EL CROMOSOMA PRESENTA HIR	93
5. LA INDUCCIÓN DE HIR REQUIERE EL 13mero-L DE <i>oriC</i>	93
6. EN EL 13mero-L DE <i>oriC</i> SE LOCALIZA UN SITIO SIDD	95
7. LA SECUENCIA DEL 13mero-L Y LA LOCALIZACIÓN DE SITIOS SIDD ESTÁN CONSERVADOS EN ENTEROBACTERIAS	98
CAPÍTULO 2: TOPOLOGÍA CROMOSÓMICA Y HIR	101
1. LA INDUCCIÓN DE HIR NO TIENE LUGAR POR CAMBIOS EN EL SUPERENROLLAMIENTO	101
1.1. <i>gyrBp</i> no presenta cambios en su expresión tras estrés térmico	102
1.2. Los genes sensibles al superenrollamiento (SSG) no cambian su expresión tras estrés térmico	103
2. LA INDUCCIÓN DE HIR DEPENDE DEL ESTADO DE LA SUPERHÉLICE PREVIO A LA SITUACIÓN DE ESTRÉS	104
3. LA INDUCCIÓN DE HIR ES FAVORECIDA TRAS LA INHIBICIÓN DE LA GIRASA	106
3.1. Inducción de HIR tras el tratamiento con novobiocina	106
3.1.1. Niveles de superenrollamiento tras el tratamiento con novobiocina	107
3.2. Inducción de HIR tras el tratamiento con ácido nalidixico	108
3.2.1. Niveles de superenrollamiento tras el tratamiento con ácido nalidixico	111
4. EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO NALIDÍXICO INDUCE REPLICACIONES DE ESTRÉS TÉRMICO DIFERENTES A HIR	112
4.1. Las replications termoinducidas en presencia de ácido nalidixico se deben al efecto específico del ácido nalidixico sobre GyrA	112

4.2. Las replicaciones termoinducidas extras obtenidas en presencia de nalidíxico son independientes de la inducción de la respuesta SOS	114
4.3. Las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico inician en <i>oriC</i> y requieren parcialmente la funcionalidad de <i>oriC</i>	116
4.4. Las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico no sintetizan cromosomas completos.....	118
CAPÍTULO 3: REQUERIMIENTOS FUNCIONALES DE HIR	121
1. INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN HIR	121
2. ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA	123
2.1. HIR requiere la actividad de ensamblaje del primosoma de PriA, pero no su actividad helicasa.....	124
2.2. La sobreproducción de PriA incrementa la inducción de HIR	125
2.3. El ensamblaje del primosoma de HIR tiene lugar vía PriA-PriB.....	125
2.4. <i>dnaC809</i> suprime la dependencia de PriA durante HIR	126
2.5. HIR requiere la actividad helicasa de Rep.....	126
3. EL REPLISOMA	128
3.1. HIR requiere las actividades del fragmento klenow y la exonucleasa 5' de Pol I128	
3.2. Pol III forma parte del replisoma en HIR	128
3.3. Las polimerasas translesionales Pol II y Pol V no son requeridas para HIR	130
4. REQUERIMIENTOS DE RECOMBINACIÓN	131
4.1. HIR es independiente de la inducción de la respuesta SOS	131
4.2. HIR requiere recombinación homóloga, pero no reparación por recombinación.....	131
4.3. HIR requiere RecA cuando RecD está presente.....	133
4.4. La proteína RecA parece tener un papel estructural en HIR	133
4.5. HIR requiere parcialmente la actividad helicasa de RecBCD	134
4.6. No se detectan intermediarios de replicación tipo Holliday durante HIR.....	136
4.7. No se generan roturas de doble cadena ni probablemente lazos-D durante el inicio y la elongación de HIR.....	137
CAPÍTULO 4: HIR EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS	139
1. ANÁLISIS DE HIR EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS POR FLUORIMETRÍA	139
1.1. La cuantificación de GFP <i>mut2</i> por espectrofluorimetría es un método válido para la medida de HIR en plásmidos.....	139
1.2. HIR es observada en minicromosomas	142
1.3. Plásmidos con control de replicación por iterones presentan HIR.....	144
1.4. Plásmidos controlados por rna antisentido presentan HIR	145
2. LOS REPLICONES PLASMÍDICOS PRESENTAN SITIOS SIDD	146
<u>DISCUSIÓN</u>	149
<u>CONCLUSIONES</u>	171

BIBLIOGRAFÍA 175

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS

ANEXOS

Introducción

1. ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA

El genoma de *Escherichia coli* consiste en un único cromosoma circular constituido por una doble hélice de 4.639 Kpb. Este tamaño, más de mil veces superior al de la célula y la alta complejidad de los procesos fisiológicos que tienen lugar en el cromosoma, demandan un alto grado de compactación y una importante organización. *In vivo*, la estructura secundaria del DNA en el cromosoma bacteriano, doble hélice de Watson y Crick, contiene menos de una vuelta de hélice por cada 10 pb, es decir, tiene un enlace topológico con un índice de enlace, L , menor que el de una molécula relajada con una vuelta de hélice o enlace topológico por cada 10 pb, L_0 . Esta disminución del índice de enlace causa una variación de la torsión, W , dando lugar a una torsión negativa, $W=L-L_0$. Para minimizar esta energía de torsión, el DNA con un defecto de vueltas adopta una configuración superenrollada. De esta forma, la doble hélice se organiza constituyendo una estructura terciaria en la que el eje central forma una hélice en sí misma o *superhélice*. Este superenrollamiento puede dar lugar a dos tipos de hélices: a una trenza dextrorsa, en la siempre se encuentran los cromosomas de bacterias, plásmidos y virus, o un solenoide sinistrorso, estructura de los nucleosomas eucarióticos (revisado en Jiménez-Sánchez y Jiménez-Martínez, 1998).

El nivel de superenrollamiento del DNA es una importante fuerza energética para muchas reacciones que ocurren en el cromosoma. La existencia de superenrollamiento negativo en la doble hélice y, por tanto, la tensión torsional impuesta por éste sobre la doble hélice influye en los procesos que implican la apertura de la doble hélice como son el inicio de la replicación, la formación de burbujas en el DNA y la transcripción. Otras reacciones que demandan reasociación de la doble hélice, como la regresión del DNA naciente en procesos de reversión de horquillas de replicación paradas, son favorecidas en moléculas superenrolladas positivamente (Espeli y Marians, 2004). Los fenómenos de apertura de la doble hélice son llevados a cabo gracias a la acción de las helicasas. Las helicasas son motores moleculares que traducen la energía de la hidrólisis de nucleósidos triposfatos en rotura de puentes de hidrógeno. En este proceso las helicasas son ayudadas por proteínas desestabilizadoras de la doble hélice que se unen preferentemente a DNA de cadena sencilla (ssDNA), como la proteína SSB y evitan así la degradación del DNA por endonucleasas celulares (Hwang y Kornber, 1992; Sherratt, 2003). El paso de la horquilla de replicación provoca cambios a nivel del superenrollamiento local de la zona que atraviesa, introduciendo vueltas de hélice que generan superenrollamiento positivo en la parte delantera de la horquilla y eliminando vueltas de hélice, aumentando el superenrollamiento negativo, de la región que va atravesando. La existencia de superenrollamiento negativo es también esencial para asegurar la segregación de los cromosomas (revisado en Jiménez-Sánchez y Jiménez-Martínez, 1998).

Un buen número de estímulos externos como el estrés osmótico, cambios nutricionales o de temperatura afectan al estado del superenrollamiento cromosómico. Esto sugiere que los cambios en el medioambiente celular podrían ser transmitidos al interior celular como cambios en el superenrollamiento y éstos ser utilizados como señal por las diversas funciones celulares, como la replicación y la transcripción, para ajustar su actividad y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Rui y Tse-Dinh, 2003; Peter *et al.*, 2004).

El cromosoma bacteriano se encuentra dividido en dominios topológicos separados por barreras que evitan que cambios de superenrollamiento a nivel local afecten a otras zonas del cromosoma. Estudios recientes han demostrado que los dominios no tienen un tamaño fijo, sino que las barreras topológicas siguen una distribución aleatoria y dinámica, aunque la media es de aproximadamente de 10 Kpb. El cromosoma estaría dividido, por tanto, en unos 450 dominios topológicos dinámicos (Postow *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005).

Por último, el cromosoma adquiere un nivel superior de complejidad estructural, la estructura cuaternaria, formando una estructura compacta denominada *nucleoide*. Los nucleoides contienen gran cantidad de RNA y proteínas. El RNA corresponde al que está siendo sintetizado o RNA naciente, y, de éste, aproximadamente la mitad corresponde a rRNA. Las proteínas son principalmente la RNA polimerasa, proteínas de membrana y las proteínas HU, IHF y H-NS, estas últimas con función similar a las histonas de los eucariontes.

1.1. TOPOISOMERASAS DE DNA

Las topoisomerasas de DNA tienen un papel principal en el mantenimiento de la arquitectura cromosómica y en el metabolismo del DNA. Las tres funciones principales de las topoisomerasas bacterianas son: (i) eliminar el exceso de superenrollamiento generado como consecuencia de la replicación del DNA; (ii) mantener la homeostasis cromosómica, y (iii) reducir el índice de enlace entre cromosomas hermanos a cero durante la partición cromosómica (Espeli y Mariani, 2004).

La acumulación de superenrollamiento positivo en la parte delantera de una horquilla de replicación en movimiento puede difundir al DNA recién replicado. Esta difusión requiere la rotación de la horquilla de replicación (revisado en Sherratt, 2003). Si el exceso de superenrollamiento positivo no es eliminado da lugar a superhélices de izquierda que puedan afectar al avance de la horquilla de replicación. Esta forma topológica fue sugerida por primera vez por Been y Champoux cuando propusieron que los replisomas constituyen por sí mismos barreras topológicas (Been y Champoux, 1980; Champoux, 2001).

La homeostasis topológica se ve también afectada por la transcripción. Liu y Wang propusieron el modelo del bidominio (*twin-domain model*) (Liu y Wang, 1987). Según este modelo, el movimiento de la RNA polimerasa sobre el DNA crea un efecto

tornillo que hace que se acumule superenrollamiento positivo en la zona que está siendo transcrita, a la vez que deja detrás mayor superenrollamiento negativo que debe ser eliminado.

Finalmente, el índice topológico entre los cromosomas hermanos tiene que ser llevado a cero para que tenga lugar la partición. Cambios en el índice topológico en este proceso dan lugar a errores en la segregación y a la aparición de células anucleadas (revisado en Espeli y Marians, 2004).

En *E. coli*, los niveles de superenrollamiento son mantenidos dentro de límites precisos durante la fase de crecimiento exponencial por la acción de cuatro topoisomerasas: girasa, topoisomerasa I (Topo I), topoisomerasa III (Topo III) y topoisomerasa IV (Topo IV). La girasa y Topo IV son topoisomerasas tipo II dependientes de ATP que introducen superenrollamiento negativo y eliminan superenrollamiento positivo respectivamente (Champoux, 2001). La topo I es una topoisomerasa tipo IA que elimina superenrollamiento negativo. Estas enzimas actúan conjuntamente para eliminar los cambios topológicos resultantes de la actuación de enzimas que se mueven sobre el DNA como la RNA polimerasa, manteniendo el superenrollamiento cromosómico en un nivel estacionario. Las topoisomerasas tipo I que hidrolizan un enlace fosfodiéster en una cadena, hacen pasar la otra cadena a través del corte y vuelven a unir los extremos de la primera; como resultado, el índice de enlace de la molécula de DNA aumenta o disminuye en una unidad. Las topoisomerasas de tipo II hidrolizan sendos enlaces fosfodiéster en ambas cadenas y hacen pasar la otra cadena a través del corte, resellando éste de nuevo; de este modo, el índice de enlace varía en dos unidades de una sola vez.

El nivel de superenrollamiento regula la expresión de los genes de la girasa (*gyrA* y *gyrB*) y Topo I (*topA*). La relajación del superenrollamiento induce la expresión de *gyrA* y *gyrB* y reprime la expresión de *topA* (Neumann y Quinones, 1997; Winstein-Fischer y Altuvia, 2007).

1.1.1. Mecanismo de acción de la girasa

Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican la girasa de *E. coli* que es la topoisomerasa tipo II más estudiada (Mizuuchi et al., 1984; Swanberg and Wang, 1987; Adachi et al., 1984). La girasa activa está formada por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB. Las estructuras descritas a partir de la obtención de cristales de las subunidades GyrA y GyrB bacterianas y de las topoisomerasas tipo II de eucariontes han permitido describir el mecanismo de acción de estas enzimas (D'Arcy et al., 1999; Lamour et al., 2002). En estas topoisomerasas, el DNA gira formando una hélice de derecha alrededor de la enzima. Esta conformación debe jugar un papel fundamental en la determinación de la posición de dos segmentos de DNA: el segmento-G, o segmento que va a ser cortado y el segmento-T, DNA que va a ser transportado. Las dos subunidades GyrB constituyen un

dímero por sus regiones de interacción dando lugar a la denominada puerta de entrada (puerta-N) del DNA que va a ser cortado (segmento-G). Cada subunidad GyrA interacciona a la vez con una subunidad GyrB. El esquema general que explica el mecanismo de acción se detalla en la figura 1. En primer lugar, el segmento G se une al dímero GyrA (Fig.1A) y esta formación es estabilizada por la unión de GyrB cuando esta se une a de ATP(Fig. 1B). La orientación relativa del DNA respecto a las dos tirosinas del sitio activo de la girasa determinan la reacción de corte de doble cadena y el transporte del segmento-T a la puerta de salida (puerta-C) conformada por dos subunidades de GyrB (Fig. 1C). En este momento se cierra la puerta de entrada del DNA (puerta-N) (Fig. 4D). Por cada ciclo catalítico se hidrolizan dos moléculas de ATP (Drlica y Malik, 2004; Maxwell *et al.*, 2005; Cozzarelli *et al.*, 2006).

1.1.2. Inhibición de la girasa

La inhibición de la actividad de la girasa puede ser debida a mutaciones que afecten a los genes *gyrA* o *gyrB*, o causada por la acción de drogas. Esta inhibición puede provocar daños en el DNA e incluso conducir a la muerte celular. Los efectos de la inhibición de la girasa se pueden detectar experimentalmente a tres niveles: (1) global sobre el crecimiento bacteriano, replicación, transcripción y traducción, (2) local a nivel de la transcripción de determinados genes, y (3) efectos sobre el superenrollamiento de moléculas circularmente cerradas como los plásmidos (Jeong *et al.*, 2006). La girasa es diana de dos tipos de compuestos antibacterianos, las quinolonas y las cumarinas.

Las *quinolonas* son fármacos antibacterianos utilizados ampliamente para el tratamiento de infecciones. La primera quinolona usada en clínica fue el ácido nalidixico, desarrollado en 1962 por Leshner (McChesney *et al.*, 1962). Las quinolonas tienen como diana la subunidad GyrA de la girasa a la que se unen covalentemente y bloquean la enzima tras el corte del DNA impidiendo la liberación del DNA (Fig.1C, 1D). Tras el tratamiento con quinolonas se forman complejos ternarios quinolona-enzima-DNA que bloquean la replicación del DNA y el crecimiento celular. Las quinolonas de primera generación, como el ácido nalidixico, bloquean la síntesis de DNA, pero no matan a la célula en ausencia de síntesis de proteínas (revisado en Malik *et al.*, 2006).

Las *cumarinas* son una familia de compuestos naturales aislados de ciertas especies de *Streptomyces*. Entre ellas se incluyen la novobiocina, la cumermicina A1 y la clorobiocina. Las cumarinas inhiben la actividad ATPasa de GyrB necesaria para la de la girasa, y, por tanto, el tratamiento con novobiocina reduce el nivel de superenrollamiento (Fig. 1A; Gellert *et al.*, 1976; Sugino *et al.*, 1978; Ali *et al.*, 1993; Maxwell, 1993; Lewis *et al.*, 1996). Las cumarinas inhiben *in vitro* la actividad de Topo IV, aunque a una concentración mayor que la necesaria para inhibir la girasa (Peng and Mariani, 1994; Hoshino *et al.*, 1994). Estos compuestos son más activos en bacterias Gram-positivas que en Gram-

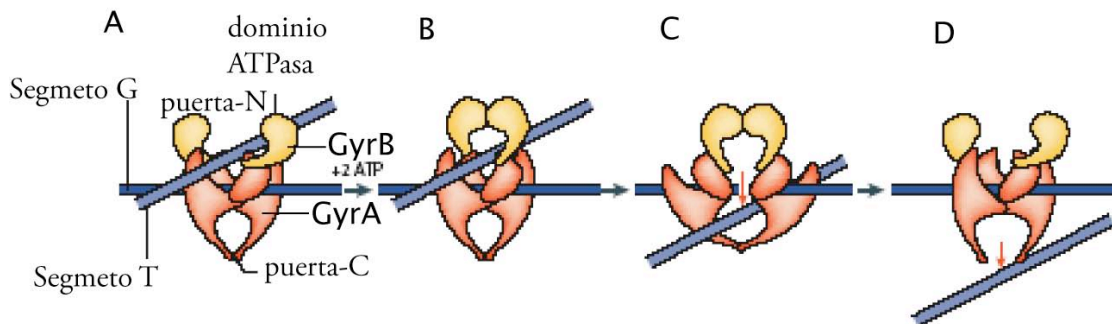


Figura 1. Cambios conformacionales durante el mecanismo de acción de la girasa (modificado de Cozzarelli *et al.*, 2006).

negativas, probablemente por diferencias en la estructura de las subunidades GyrB de sus girasas.

2. CICLO CELULAR BACTERIANO

E. coli, al igual que otros organismos unicelulares, posee un ciclo celular que se corresponde con su ciclo de vida. La vida de una célula bacteriana comienza con su nacimiento, a partir de una célula madre, y termina con la división celular por fisión binaria, dando lugar a dos células hijas idénticas a la madre. Entre estos dos procesos, la célula crece a medida que duplica sus componentes celulares que repartirá entre las dos células hijas. El ciclo celular bacteriano agrupa la progresión de varios procesos que incluyen: el crecimiento celular, la duplicación del genoma o replicación (denominado período *C* en bacterias y fase *S* en eucariontes), el reparto del material replicado, conocido como partición o segregación y la división celular (Donachie, 2001; Jacq y Holland, 1991). Sin embargo, si algo diferencia los ciclos celulares procariótico y eucariótico es la duración del período *C* bacteriano frente a la fase *S* eucariótica. Mientras que en bacterias el período *C* puede ser mayor que la duración total del ciclo celular o tiempo de generación (τ), en eucariontes la fase *S* es siempre inferior a la duración total del ciclo. Esto lleva en bacterias a que en un mismo cromosoma puedan existir varias rondas de replicación en marcha, coordinándose así la velocidad de replicación con el crecimiento celular.

Además del DNA cromosómico, las células pueden llevar otras moléculas de DNA extracromosómico, que son los plásmidos. Los plásmidos presentan un número de copias

característico y se replican de forma autónoma dentro del huésped. Se han descrito mecanismos dirigidos a establecer un equilibrio entre la replicación del DNA plasmídico, la replicación del cromosoma bacteriano y la división celular (del Solar *et al.*, 1998). Este equilibrio parece ser dinámico y el número medio de plásmidos por célula puede estar afectado por factores que afectan al crecimiento de las poblaciones hospedadoras, como son la fase de crecimiento del cultivo, la velocidad de crecimiento y la temperatura (Bremer y Lin-Chao, 1986; Wegrzyn y Wegrzyn, 2002).

En las células bacterianas, por tanto, los mecanismos dirigidos al mantenimiento de la periodicidad del ciclo celular y de los diferentes procesos que en él se encuadran, se encuentran perfectamente coordinados y controlados y, aún hoy, tras su *a priori* aparente simplicidad, constituyen un interesante y controvertido objeto de estudio.

3. REPLICACIÓN CROMOSÓMICA

La replicación cromosómica es un proceso fundamental dentro del ciclo celular. La replicación del cromosoma de *E. coli*, modelo de la replicación cromosómica bacteriana, ha sido objeto de una investigación intensa y de recientes revisiones (Leonard y Grimwade, 2005; Kato, 2005; Kaguni, 2006; Paulsson y Chatteraj, 2006). Una visión simplificada para el estudio de la replicación ha llevado a la división de este proceso en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. De estas etapas, la iniciación es la más compleja y la que está sujeta a un control más estricto durante el ciclo celular. El paso crítico de esta fase es la apertura estable de la secuencia de *oriC*. Errores en el inicio de la replicación dan lugar a condiciones de crecimiento celular subóptimo y, en muchos casos, a la muerte celular.

3.1. ESTRUCTURA DE *oriC*

El inicio de la replicación cromosómica en *E. coli* tiene lugar en una secuencia de 260 pb denominada *oriC*, situada en el minuto 84,57 de su mapa genético (Langer *et al.*, 1996). La replicación iniciada aquí procede bidireccionalmente, terminando en la región *ter*, diametralmente opuesta a *oriC* (revisado en Messer, 2002; Leonard y Grimwade, 2005; Paulsson y Chatteraj, 2006).

La apertura de la doble hélice en la región del origen supone un problema topológico de gran envergadura, ya que debe permitir el ensamblaje de todos los componentes enzimáticos del complejo de replicación y, por lo tanto, presenta tanto requerimientos estructurales como requerimientos funcionales.

Los orígenes de replicación son estructuras altamente conservadas. La determinación de estas secuencias en los genomas lleva a establecer características muy conservadas a lo largo de la evolución: (i) su definición genética, (ii) la secuencia

del DNA, (iii) el catálogo de factores bioquímicos requeridos para la iniciación y (iv) las interacciones DNA-proteína que dan lugar a la distorsión de la estructura de la doble hélice que caracteriza el proceso de apertura del DNA. El proceso de interacción del DNA con las proteínas de iniciación es un proceso altamente dinámico y determinado por las propiedades tanto de la secuencia del origen como de las proteínas (revisado en Mackiewicz *et al.*, 2004; Weigel y Seitz, 2006).

En el cromosoma de *E. coli*, la organización de la secuencia de *oriC*, de izquierda a derecha, es la siguiente: una secuencia de 12 pb rica en A+T; tres secuencias de 13 pb ricas en A+T o 13meros (L, M y R) que constituyen tres repeticiones directas, cada uno de las cuales comienza por un sitio GATC, reconocidos por la metilasa Dam; y cinco secuencias de unión de la proteína DnaA (R1, R5, R2, R3 y R4) con la secuencia consenso 5'-TTA₁TNCACA (Fig. 2). Además, a lo largo de su secuencia, *oriC* presenta otros nueve sitios GATC y tres secuencias de 6 pb de unión de DnaA-ATP (Schaper y Messer, 1995; Messer, 2002). Recientemente se han descrito otros sitios de unión para la proteína DnaA en *oriC*, que difieren en su secuencia consenso de las secuencias R y que se han denominado sitios I (McGarry *et al.*, 2004). Los sitios I unen DnaA-ATP con mayor afinidad que DnaA-ADP y se ha propuesto que juegan un papel fundamental en el establecimiento de los niveles de DnaA-ATP apropiados para que el proceso de apertura de *oriC* tenga lugar (Leonard y Grimwade, 2005).

Dentro de *oriC* hay otras secuencias que unen proteínas que contribuyen de forma importante a la regulación del inicio de la replicación cromosómica. Así, en la mitad izquierda de *oriC* se localiza una secuencia reconocida por la proteína IHF, mientras que en la zona derecha hay una secuencia diana para la proteína Fis (Fig. 2). La unión de IHF a *oriC* ocasiona un incremento de la curvatura del DNA, favoreciendo la iniciación (Rice *et al.*, 1996). La metilación de las secuencias GATC mejora la unión de IHF y, por tanto, favorece la iniciación (Polaczek *et al.*, 1998^a; Polaczek *et al.*, 1998^b). La proteína Fis actúan contrarrestando la acción de IHF. Extractos de Fis inhiben *in vitro* la apertura de *oriC* por DnaA, siendo esta acción suprimida por adición de IHF (Hwang y Kornberg, 1990; Hiasa y Marians, 1994). En la secuencia mínima de *oriC* se ha localizado entre las secuencias R3 y R4 un sitio de unión de la girasa (Lother *et al.*, 1984). Se han purificado proteínas de membrana que se unen específicamente a zonas dentro de *oriC*, tanto a DNA de cadena sencilla como doble (Polaczek *et al.*, 1998^b; Weigel y Seitz, 2002). Que el inicio de la replicación tenga lugar específicamente en *oriC* está garantizado por la acción de varias proteínas auxiliares entre las que se incluyen RNasa HI, la topoisomerasa I y la proteína HU (Ogawa *et al.*, 1984; Mizushima *et al.*, 1996; Bahloul *et al.*, 2001). Se ha descrito también la existencia de sitios de unión en *oriC* para las proteínas IciA, H-NS, ROB, SeqA y Cnu/Hha (Fig. 2; Lu *et al.*, 1994; Skarstad *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2005).

3.2. ETAPAS DE LA REPLICACIÓN

3.2.1. Iniciación

La replicación comienza con la unión altamente cooperativa de la proteína DnaA a *oriC*. DnaA pertenece a la familia de proteínas AAA+, altamente conservada en la escala evolutiva. En todos los organismos, bacterias, archeas y eucariontes, estudiados hasta el momento, la unión de una proteína de características similares a DnaA es necesaria para el inicio de la replicación (Giraldo, 2003). DnaA sólo es funcional en el inicio de la replicación unida a ATP, DnaA-ATP (Schaper y Messer, 1995; Messer, 2002). DnaA se une a cinco secuencias R en *oriC*, formando un complejo nucleoproteínico denominado *complejo inicial* (Fig. 3A). Este complejo posee una estructura elipsoidal con un núcleo compuesto por unos 30 monómeros de DnaA, rodeados por 220 pb que se corresponden con el extremo derecho de *oriC*. Se ha demostrado que existe un gradiente de afinidad de DnaA por las diferentes secuencias de unión en *oriC*, sugiriéndose que está unida a las secuencias R1, R2 y R4 durante la mayor parte del ciclo. La interacción de DnaA, a concentraciones saturantes, con la secuencia R3 parece ser la señal que

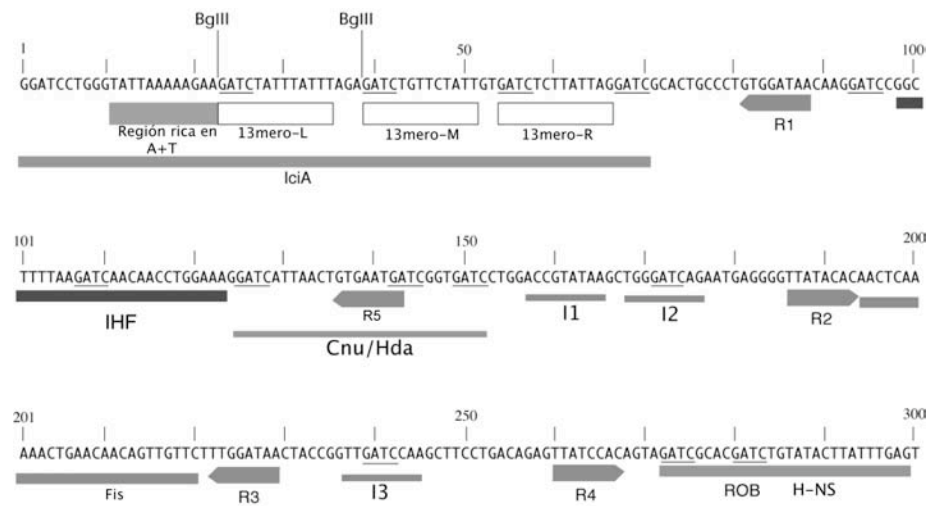


Figura 2. Estructura de *oriC*. El esquema muestra la secuencia rica en A+T, los 13meros (L, M y R), las secuencias R1-R5 e I1-I3 de unión de la proteína DnaA, los sitios de unión de IciA, IHF, Cnu/Hda, Fis, ROB y H-NS, y las secuencias GATC de metilación por Dam (modificado de Jiménez-Sánchez y Jiménez-Martínez, 1998).

establece el inicio de la replicación (Cashel *et al.*, 1996). El resultado es la desnaturalización de la zona rica en A+T comenzando en el trecémero derecho, 13mero-R, y procediendo hacia a la izquierda (Krause y Messer, 1999; Messer, 2002). Se produce así la transición de complejo inicial a *complejo abierto* (Fig. 3B) (revisado en Skarstad y Boye, 1994; Langer *et al.*, 1996; Kaguni, 1997). La región de los 13meros presenta alta afinidad de unión a DnaA-ATP cuando se encuentra en forma de cadena sencilla. El llenado de los sitios de unión de DnaA en las secuencias I y en la zona de los 13meros es necesario para el inicio de la replicación. Recientemente se ha determinado que la formación del complejo nucleoproteínico DnaA-*oriC*, junto con las proteínas que modulan esta unión determinaría la estructura necesaria para promover la apertura de *oriC* y la estabilización del mismo. A la formación de este complejo estable en *oriC* se le ha denominado *orisoma*. Se ha demostrado que en ausencia de esta formación oligomérica, la apertura de *oriC* puede tener lugar, pero resulta insuficiente para la carga de DnaB (Felczak y Kaguni, 2004; Leonard y Grimwade, 2005). Proteínas como Fis, IHF y HU modulan la interacción de DnaA con *oriC*. En la reacción *in vitro*, la proteína Fis tiene un efecto negativo (Hiasa y Marians, 1994; Wold *et al.*, 1996; Messer, 2002), mientras que HU e IHF a altas concentraciones de ATP (>2mM), alta temperatura (38°C) y en presencia de activación transcripcional, estimulan la apertura de *oriC* (Dixon y Kornberg, 1984; Baker y Kornberg, 1988; Sekimizu *et al.*, 1988; Messer, 2002). La zona de desnaturalización de *oriC*, de aproximadamente 44-46 pb, se estabiliza con la unión de la proteína SSB (Krause y Messer, 1999 (Fig. 3B).

El DNA de cadena sencilla cubierto con SSB es un sustrato pobre para la helicasa DnaB, que tiene que ser cargada con la ayuda de DnaC. La unión de DnaB a DNA de cadena sencilla cubierto por SSB es dependiente de ATP. Diferentes experimentos han demostrado la necesidad de la interacción entre DnaA y DnaB para que tenga lugar la carga de la helicasa en *oriC* (Marszalek y Kaguni, 1994). Se ha descrito que tras la unión de la helicasa se estabiliza la zona desnaturalizada de *oriC* (Speck y Messer, 2001). Un doble hexámero con DnaB y su cargador, DnaC, son posicionados por DnaA en cada extremo del complejo abierto formándose así el *complejo precebador* (Marszalek y Kaguni, 1994) (Fig. 3C). DnaC deja el complejo una vez que carga a DnaB, tras la hidrólisis de ATP. Esto activa a la helicasa cuyos hexámeros se desplazan en dirección 5'->3' en cada una de las cadenas del DNA, dando lugar a una burbuja de aproximadamente 65 nucleótidos (Wahle *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1999). Ahora la primasa DnaG puede entrar al complejo y sintetizar los dos cebadores, uno por cada cadena. El complejo constituido con la entrada de la helicasa y la primasa a la horquilla de replicación se le denomina *complejo cebador o primosoma* (Fig. 3D).

Se han descrito otros tipos de entrada de DnaB a la horquilla de replicación. En el caso del fago ϕ X174, el ensamblaje del primosoma se inicia tras el reconocimiento en el genoma del fago de una estructura en horquilla denominada sitio n' o n'-pas donde se une la proteína PriA. A este sitio se unen posteriormente las proteínas que componen el

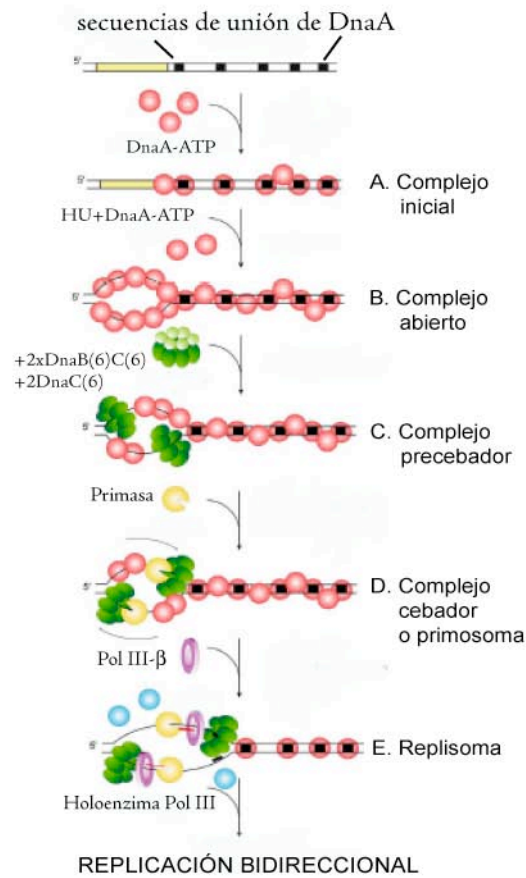


Figura 3. Iniciación de la replicación cromosómica en *E. coli*. **A)** Reconocimiento de los sitios de unión por la proteína DnaA en *oriC*. **B)** Oligomerización de DnaA y apertura de *oriC*. **C)** Entrada del complejo DnaB-DnaC en *oriC*. **D)** Translocación de la helicasa y entrada de la primasa. **E)** Entrada de la holoenzima DNA polimerasa III e inicio de la replicación bidireccional (modificado de Messer, 2002).

primosoma: PriB, PriC y DnaT. Un doble hexámero de DnaB-DnaC se une al primosoma, desplazándose a lo largo del DNA y asociándose a la primasa para generar el cebador de RNA a partir del cual tiene lugar el inicio de la replicación de ϕ X174 (Masai y Arai, 1996). En *E. coli* se ha demostrado la existencia de la maquinaria descrita para el primosoma de ϕ X174 en fenómenos de reanudación de horquillas de replicación dañadas o paradas (apartado 4 de Introducción) (Marians, 2000). Los dos tipos de entrada de DnaB descritos en *E. coli*, en *oriC* y en reanudación de horquillas de replicación paradas, se comparan en la tabla 1.

3.2.2. Elongación

Una vez ensamblado el complejo de replicación en *oriC*, la progresión de la horquilla de replicación requiere la acción coordinada de cuatro actividades básicas que conforman el replisoma: proteína de unión a cadena sencilla (SSB), DNA polimerasa, DNA helicasa y DNA primasa. El replisoma se define como el complejo de proteínas necesarias para que funcione una horquilla de replicación y se lleve a cabo la síntesis de DNA de las cadenas continua y discontinua (Sandler, 2000). El replisoma forma parte de un nivel de organización superior denominado hiperestructura de replicación. La hiperestructura de replicación resulta del ensamblaje de entre 25 y 30 proteínas, junto al DNA y que podría estar unida a la membrana plasmática. El modelo de la hiperestructura de replicación implica la una unión física no estable entre el replisoma, los componentes del complejo de síntesis de desoxinucleótidos (dNTP) y la maquinaria de segregación (Guzmán *et al.*, 2002; Riola *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 2007).

La polimerasa que lleva a cabo la síntesis principal del cromosoma de *E. coli* es la holoenzima Pol III. La unión de la holoenzima PolIII al complejo cebador determina el final de la etapa de iniciación y el comienzo de la elongación (Fig. 3e) (Seufert y Messer, 1987). La holoenzima Pol III está compuesta por diez péptidos que son: el núcleo enzimático (subunidades α , ϵ y θ), la abrazadera deslizante β y el complejo γ , cargador de la enzima en el molde. El complejo γ , abrazadera de carga de la enzima en el molde, es un complejo formado por cinco subunidades que se unen con una estequiometría definida $\gamma_3\delta_1\delta_1\chi_1\psi_1$.

Tabla 1. Características de los dos tipos de primosomas para la replicación cromosómica en *E. coli*.

Lugar de ensamblaje del primosoma	<i>oriC</i>	Reanudación de horquillas
Reconocimiento	DnaA	PriA
Proteínas auxiliares para la carga de la helicasa	HU	PriB PriC DnaT
Helicasa	DnaB/DnaC	
Primasa	DnaG	

Para la síntesis de las cadenas continua y discontinua se necesitan, al menos, dos polimerasas. En la horquilla de replicación se encuentran dos núcleos enzimáticos que se mantienen unidos por la subunidad τ (McHenry, 1982). La abrazadera β es necesaria para que el núcleo de la polimerasa aumente su procesividad. Unido a la subunidad β , el núcleo logra replicar el DNA a una velocidad de unos 759 nucleótidos por segundo y alcanza una procesividad de más de 50 Kb. El complejo γ proporciona la energía necesaria para unir la abrazadera β al DNA mediante la hidrólisis de ATP. Una vez que la subunidad β es cargada, el complejo γ se separa del DNA dejando la abrazadera ensamblada, unida al núcleo de la Pol III y al DNA (Hingorani y O'Donnell, 1998).

Debido a la naturaleza antiparalela de la molécula de DNA, la elongación de las nuevas cadenas crea una asimetría en el punto de replicación por el hecho de que la DNA polimerasa sólo polimeriza nucleótidos en el sentido 5'->3'. De esta forma una de las cadenas es sintetizada de forma continua mientras que la complementaria se sintetiza de manera discontinua en fragmentos de unas 2 Kb, los llamados fragmentos de Okazaki. Las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis de DNA *de novo* sin un cebador. La DNA primasa (DnaG) sintetiza pequeñas secuencias de RNA que son utilizadas para iniciar cada fragmento de Okazaki. Dado que un nuevo fragmento de Okazaki ha de iniciarse cada varios segundos, para asegurar que a esta velocidad la primasa tiene pleno acceso a las cadenas abiertas, se asocia al punto de replicación uniéndose a la helicasa DnaB (Tougu *et al.*, 1994). La proteína SSB es necesaria para mantener de forma uncatenaria las cadenas recién abiertas por la helicasa previo al paso de la horquilla de replicación (Glover y McHenry, 1998). Tras la síntesis de cada fragmento de Okazaki se eliminan los cebadores por la acción combinada de la RNasa HI y de la actividad exonucleasa-5' de la DNA polimerasa I (Lehman y Uyemura, 1976). Esta polimerasa sintetiza DNA para rellenar el hueco generado. Finalmente, la DNA ligasa une los fragmentos contiguos de DNA.

Se ha propuesto un modelo de la elongación de la replicación en *E. coli* que permite la integración de todos los elementos implicados en esta etapa. Las horquillas de replicación estarían ancladas a la membrana y el DNA replicándose es desplazado a través de la maquinaria de replicación estacionaria o *factoria de replicación* (Lemon y Grossman, 1998; Koppes *et al.*, 1999; Sawitzke y Austin, 2001; den Blaauwen *et al.*, 2006). La factoria de replicación estaría formada por dos replisomas permanecerían unidas por dos hexámeros de DnaB (den Blaauwen, 2006). Sin embargo, el análisis del DNA naciente en las inmediaciones de *oriC* mediante experimentos de peinado de DNA y de microarrays de DNA ha determinado que el 70% del tiempo que tarda en replicarse el cromosoma el replisoma de la izquierda está desplazado del replisoma que se desplaza en dirección opuesta. Además, cuando se bloquea la progresión de uno de los replisomas, el otro continúa avanzando (Breier *et al.*, 2005). A pesar de la controversia planteada en estos últimos años, la *factoria de replicación* es el modelo más aceptado.

Aunque la holoenzima Pol III lleva a cabo la síntesis mayoritaria del DNA durante la replicación cíclica en *E. coli* se ha descrito la actividad de otras 4 polimerasas: Pol I (*polA*), Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*) y Pol V (*umuDC*).

La DNA polimerasa I (Pol I) es la polimerasa más abundante en *E. coli*, con unas 400 moléculas por célula. Esta enzima está constituida por dos dominios: (i) uno combina la actividad polimerasa y la actividad exonucleasa 3', denominado fragmento Klenow y (ii) otro que incluye la actividad ExoI o exonucleasa 5'. Ambos dominios son funcionalmente independientes, aunque *in vivo* actúan de forma coordinada. Pol I presenta una procesividad muy limitada de 15 a 20 nucleótidos, que se correlaciona *in vivo* con la síntesis de pequeños fragmentos de DNA como son los que unen los fragmentos de Okazaki (revisado en Patel *et al.*, 2001). Recientemente se ha propuesto que Pol I podría tener mayor procesividad. Existen evidencias de que Pol I se une a la subunidad β , que estimula su procesividad. Por tanto, a día de hoy, un papel de la proteína Pol I en la extensión de grandes fragmentos de DNA no puede ser excluido, considerando además la abundancia relativa de esta proteína en la célula. De hecho, Pol I es la responsable de la replicación en plásmidos tipo ColE1 (revisado en Camps y Loeb, 2004).

Pol II forma parte de los sistemas de reparación del DNA. Estirpes mutantes en el gen *polB* no muestran defecto ni en el crecimiento ni en la replicación. La síntesis de Pol II es inducida en fase estacionaria, donde tanto el crecimiento como la replicación son procesos lentos y donde se incrementan los daños sobre el DNA, acumulándose pequeños huecos que pueden bloquear a Pol III. En estas circunstancias, Pol II soluciona el problema al reiniciar la síntesis de DNA en los pequeños huecos. Esta polimerasa tiene una tasa de error baja, pero su velocidad de síntesis de DNA es más lenta que la de la replicación normal. Cuando células de *E. coli* son expuestas a niveles elevados de radiación o a la presencia de ciertos mutágenos, se induce la respuesta SOS. Entre los genes inducidos se encuentran *dinB*, *umuC* y *umuD*, cuyos productos conforman la DNA polimerasa IV (Pol IV) y la DNA polimerasa V (Pol V). Ambas polimerasas reparan el DNA y su actividad es propensa a error al no presentar actividad exonucleasa 3' correctora de pruebas. Además, requiere las subunidades β , para la procesividad, y γ de Pol III para aumentar su procesividad y alcanzar una actividad óptima.

Por último, la circularidad del cromosoma de *E. coli* impide que la molécula de DNA tenga libertad de giro a medida que la DnaB helicasa va abriendo la doble hélice. Esto supone un incremento del superenrollamiento positivo delante de la horquilla según avanza la replicación. En este paso es necesaria la acción de las topoisomerasas (ver apartado 1.2 de Introducción).

3.2.3. Terminación

Cuando el complejo de replicación que se formó en *oriC* llega a la región diametralmente opuesta, la región del término, la replicación se detiene. Ésta es la etapa de terminación de la replicación. Si un punto de replicación alcanza la zona del término antes que el otro es frenado por los complejos Tus-*Ter*. Estos complejos se forman por la unión de la proteína Tus a las secuencias terminadoras *Ter*. Estas secuencias se han localizado tanto en el cromosoma como en algunos plásmidos. Estos complejos actúan sobre el replisoma bloqueando su avance de forma polar. Existen evidencias que Tus posee la actividad contraria a la helicasa y que interacciona físicamente con DnaB (Neylon *et al.*, 2005).

Una vez que la replicación llega a su fin se produce la segregación de los cromosomas recién replicados, fenómeno que depende frecuentemente de procesos de recombinación. Los cromosomas hermanos se encuentran en forma de círculos concatenados y Topo IV es la enzima que lleva a cabo la decatenación de los mismos (Li *et al.*, 2002). En bacterias con cromosomas circulares, el entrecruzamiento por recombinación homóloga genera cromosomas díméricos que no pueden ser segregados a las células hijas a menos que se conviertan en monómeros previamente a la división celular. Esto se consigue por el sistema de recombinación de sitio específico Xer altamente conservado en la evolución. La resolución de dímeros también requiere FtsK, una proteína localizada en el septo de división celular, que utiliza la energía generada por la hidrólisis de ATP para activar la reacción de resolución de dímeros (Sherratt *et al.*, 2004). La ausencia de proteínas de recombinación resulta en una segregación inadecuada y en fenómenos de inestabilidad cromosómica. Esta función de segregación debe estar englobada en la hiperestructura de replicación dado que alteraciones de la actividad de la NDP reductasa afectan a esta función (Riola *et al.*, 2007).

3.3. REGULACIÓN DEL INICIO DE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA

En el ciclo celular pueden definirse tres periodos de tiempo respecto a la replicación cromosómica: el tiempo que transcurre entre dos inicios de replicación consecutivos o tiempo de interiniciación, t ; el tiempo en el que se realiza la replicación del cromosoma, período C ; y el tiempo necesario entre la finalización de una ronda de replicación y la división celular siguiente, definido como período D (Helmstetter, 1987). Para mantener un crecimiento celular equilibrado es necesario y suficiente que un inicio de replicación, y sólo uno, tenga lugar en cada ciclo celular. Esta iniciación se da simultáneamente en todas las copias de *oriC* presentes en cada célula y ocurre en un momento preciso del ciclo celular (Skarstad *et al.*, 1986). El control de la frecuencia de inicios responde, por tanto, a la relación $\phi = \tau / t = 1$ (Jiménez-Sánchez *et al.*, 1993).

Los diferentes mecanismos que evitan la aparición de reinicios actúan fundamentalmente a dos niveles: (i) limitar la disponibilidad de la secuencia de *oriC* para el ensamblaje de nuevos complejos replicativos y (ii) disminuir la cantidad de proteína DnaA disponible en su conformación activa.

Cuando un cultivo celular crece rápidamente ($\tau < C+D$), las rondas de replicación se solapan de tal forma que dos, cuatro o incluso ocho orígenes pueden coexistir por cromosoma. Tras la iniciación de la replicación los orígenes recién replicados son inmediatamente inactivados por el secuestro de orígenes hemimetilados en la membrana por parte de la proteína SeqA. SeqA bloquea la unión de DnaA a los denominados sitios débiles (I2, I3 y R5), pero no afecta a la unión de los sitios fuertes (R1, R2 o R4). SeqA previene así la apertura de *oriC* (Nievera *et al.*, 2006). La posterior metilación de las secuencias GATC por la metilasa Dam finaliza el período de secuestro (Campbell y Kleckner 1990; Boeneman y Crooke, 2005; Morigen *et al.*, 2005).

Además del secuestro, tras la iniciación tiene lugar una reducción del potencial iniciador, es decir, de la cantidad de DnaA en su conformación activa necesaria para la iniciación. De esta forma cuando los orígenes son liberados, estos no pueden ser reiniciados hasta una generación más tarde. Esta reducción del potencial iniciador tiene lugar mediante dos mecanismos: (i) reduciendo la disponibilidad de DnaA y (ii) reduciendo la actividad de DnaA. La disponibilidad de DnaA viene determinada por la unión de DnaA a sitios específicos en el propio *oriC* y en el resto del cromosoma, en particular al sitio *datA* que contiene cinco secuencias de unión a DnaA y disminuye en gran medida la disponibilidad de DnaA *in vivo* (Morigen *et al.*, 2005). La reducción de la actividad de DnaA se lleva a cabo mediante el mecanismo RIDA (inactivación reguladora de *dnaA*) que es dependiente de la subunidad β de Pol III y de la proteína Hda. Estas proteínas, de forma conjunta, hidrolizan DnaA unida a ATP que pasa a su forma inactiva DnaA-ADP (Katayama *et al.*, 1998; Kato y Katayama, 2001; Su'etsugu *et al.*, 2004; Morigen *et al.*, 2005). También se ha descrito que la presencia de fosfolípidos ácidos en determinados dominios dentro de la membrana plasmática contribuyen a la regulación del intercambio DnaA-ADP a DnaA-ATP. La pérdida de fosfolípidos ácidos provoca la parada del ciclo celular y ésta puede ser restaurada por la mutación L366K en la proteína DnaA que afecta al dominio de unión de DnaA a la membrana. La existencia de estos dominios de membrana ricos en fosfolípidos es dependientes del momento del ciclo celular y se ha detectado que un dominio rico en fosfolípidos ácidos aparece en el centro de la membrana celular justo antes de la formación del complejo de replicación en *oriC* localizado también en la parte central (Boeneman y Crooke, 2005; Boeneman y Crooke, 2006).

4. REPLICACIÓN Y RECOMBINACIÓN

La existencia de una conexión directa entre replicación y recombinación fue sugerida por primera vez a comienzos de los 90 tras observar que el bloqueo de la replicación estimula la recombinación homóloga (Bierne y Michel, 1994; Horiuchi *et al.*, 1994). Esta observación llevó a proponer que la parada de la replicación crea sustratos para la recombinación. Estudios posteriores propusieron el término RDR o replicación dependiente de recombinación, en procariontes, o replicación inducida por daño en eucariontes, que permite a las proteínas de recombinación reparar daños en el DNA y reanudar horquillas de replicación paradas. Es decir, estos sustratos de recombinación resultantes de la parada de la horquilla de replicación podrían ser usados como estructuras de reinicio de la replicación. La importancia del estudio de las relaciones entre replicación y recombinación radica en que este tipo de procesos está presente en todos los organismos estudiados hasta el momento (Kogoma, 1996; Haber, 1999; Kreuzer, 2000; Rothstein *et al.*, 2000; revisado en Cox, 2001). De esta forma, el estudio de estos procesos en *E. coli* es válido y apropiado para discernir los mecanismos moleculares que permiten a la replicación recuperarse tras daño en el DNA o en la maquinaria de replicación y puede hacerse extensible a eucariontes, incluyendo a humanos (Courcelle y Hanawalt, 2003).

4.1. PROGRESIÓN DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN

La replicación del cromosoma de *E. coli* no es un proceso continuo. La horquilla de replicación, en su avance desde el origen de replicación hasta el término, se puede detener en sitios distintos a *Ter*, debido a la existencia de obstáculos como pueden ser lesiones o estructuras secundarias en el DNA o la presencia de proteínas unidas al DNA (revisado en Maisnier-Patin *et al.*, 2001). Cuando la horquilla de replicación se detiene, la replicación debe reanudarse para conseguir la replicación completa del genoma previa a la división celular.

Los primeros estudios genéticos de mutantes *priA* demostraron que estos mutantes son deficientes en recombinación homóloga y en reparación de roturas de doble cadenas (revisado en Mariani, 2003). La caracterización bioquímica de la proteína PriA sugería que sustratos de recombinación podrían ser usados por esta proteína para la reiniciación de la replicación (Kogoma *et al.*, 1996; Sandler, 1996). PriA presenta dos dominios funcionalmente diferentes: (i), dominio N-terminal o de reconocimiento de estructuras en lazo-D y ensamblaje del primosoma y (ii), dominio helicasa con actividad ATPasa (Tanaka *et al.*, 2003). Mutantes nulos de la proteína PriA presentan diferentes fenotipos que incluyen bajo crecimiento, sensibilidad a medio rico, recombinación homóloga reducida, filamentación e inducción constitutiva de la respuesta SOS (Lee y Kornberg, 1991; Masai *et al.*, 1994; Kogoma *et al.*, 1996; McCool y Sandler, 2001;

Soultanas, 2002). Kogoma propuso un modelo mediante el que PriA podría ensamblar horquillas de replicación en intermediarios de recombinación tipo lazo-D (Kogoma *et al.*, 1996). Este modelo quedó establecido cuando se mostraron evidencias bioquímicas sobre la unión de PriA a lazos-D (McGlynn *et al.*, 1997). Mutantes en el dominio helicasa son capaces de iniciar la replicación a partir de una estructura tipo lazo-D sintética y, por tanto, este dominio es innecesario para la actividad de ensamblaje del primosoma vía PriA (Liu *et al.*, 1999; Zavitz y Mariani, 1992).

Marians y col. observaron replicación a partir de lazos-D *in vitro* en presencia de las proteínas de ensamblaje del primosoma del fago ϕ X174, PriA, PriB, PriC y DnaT, y de las proteínas de replicación, DnaC, DnaB, DnaG, SSB y la holoenzima Pol III. Demostraron entonces que PriA permitía el ensamblaje de las horquillas de replicación procesivas en estructuras en lazo-D (Liu *et al.*, 1999). A partir de este estudio a estas proteínas se las denomina proteínas de reensamblaje del primosoma o RRP (Sandler y Mariani, 2000). PriA parece ser el principal factor que coordina la interconexión entre los procesos de carga de DnaB y reanudación de la replicación.

4.2. REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA (DSBs) Y REPLICACIÓN DEPENDIENTE DE RECOMBINACIÓN (RDR)

Estudios de diferentes laboratorios han mostrado que la parada de las horquillas de replicación puede tener lugar en diferentes condiciones (Kuzminov 1999; Cox, 1999; Kowalczykowski, 2000; Rothstein *et al.*, 2000; Luseti y Cox, 2002). Las horquillas de replicación paradas pueden dar lugar a la regresión de las cadenas sintetizadas que podrían reasociarse generando un intermediario de Holliday. Alternativamente se ha propuesto que tras la parada de la horquilla de replicación, el DNA podría romperse y dar lugar a un colapso de la horquilla de replicación (Horiuchi y Fujimura, 1995). Esta rotura de horquillas requiere la resolvasa RuvC (Seigneur *et al.*, 1998), aunque la rotura podría también ser espontánea.

Se han descrito dos modelos que explican la reanudación de una horquilla de replicación parada. El primero propone la necesidad de proteínas de recombinación, mientras que el segundo implica una recuperación sin recombinación que sólo necesita la estabilización estructural de la horquilla por parte de la proteína RecA, previa a su reanudación por otro mecanismo independiente de recombinación como puede ser la excisión de nucleótidos (Courcelle y Hanawalt, 2003).

En condiciones de colapso de la horquilla de replicación, la única vía para restablecer la replicación cromosómica es mediante una reacción de recombinación entre las cadenas homólogas, donde la cadena rota invade a su homóloga intacta. Esta reacción sería posible gracias a la acción combinada de las actividades de la proteína RecA y de RecBCD. El lazo-D formado durante este evento de recombinación puede servir de sustrato para PriA para la reversión de la horquilla de replicación (Fig. 4). La

proteína RecA juega un papel fundamental en el proceso de recombinación y ella sola puede mediar las funciones de reconocimiento e intercambio de cadenas (Lusetti y Cox, 2002). El primer paso es la nucleación de la proteína RecA en forma monomérica sobre el DNA (Fig. 4C). Este paso es más rápido sobre DNA de cadena sencilla (ssDNA), como en los casos donde se forma un hueco en la doble hélice, que sobre DNA de cadena doble (dsDNA) (Lusetti and Cox, 2002; Fig. 4). Sin embargo, el proceso sobre dsDNA se acelera bajo una situación de apertura parcial de la doble hélice y atiende a las siguientes características: (1) sensibilidad al pH; (2) sensibilidad a sales; (3) gran dependencia de la temperatura; (4) sensibilidad a la topología del DNA; y (5) dependencia de la longitud del DNA. La unión de la proteína RecA a regiones de cadena sencilla, donde la replicación está bloqueada, sirve tanto de señal de daño en el DNA, como para mantener la integridad estructural de la horquilla de replicación hasta que la horquilla sea reanudada (Courcelle y Hanawalt, 2003). *In vitro*, el filamento nucleoproteínico DNA-RecA puede mediar la reacción de reconocimiento homólogo, invasión e intercambio entre fragmentos de DNA en ausencia de otras proteínas (Fig. 4C y D). El intermediario formado por el DNA invasor y la molécula homóloga invadida son sustratos para las DNA polimerasas y sus proteínas accesorias que incorporan los nucleótidos que faltan en un proceso de reparación por recombinación. Las moléculas recombinantes dan lugar a una estructura en X denominada *intermediario de Holliday* (Fig. 4D). El complejo proteínico RuvAB es una helicasa de DNA y actúa como un motor molecular haciendo migrar la unión de Holliday, resultando en un DNA heterodúplex (West, 2003). Alternativamente a RuvAB, RecG posee la misma actividad, aunque extiende el heterodúplex de DNA en la dirección opuesta. La proteína RuvC es una endonucleasa específica de intermediarios de Holliday que resuelve este intermediario y libera dos moléculas recombinantes. Se completa así el proceso de recombinación (Fig. 4). Por tanto, la proteína RecA tiene un doble papel, el de sensor de problemas en la replicación, y el estructural, protegiendo la horquilla de replicación de la degradación. En ausencia de daño exógeno sobre el DNA se ha estimado que la necesidad de RecA para mediar recombinación es extremadamente baja. Además, esto es consistente con la observación de que altos niveles de recombinación no son beneficiosos en un ciclo de vida asexual como es el caso de *E. coli* (Courcelle y Hanawalt, 2003).

Durante la recombinación homóloga, el desenrollamiento del DNA, la actividad nucleolítica y la carga de RecA son procesos llevados a cabo en coordinación con el complejo RecBCD (Kowalczykowski, 2000; Smith, 2001). La enzima RecBCD es una proteína multifuncional que reconoce específicamente cortes en la doble hélice de DNA. RecBCD presenta actividad helicasa en las subunidades RecBC, actividad nucleolítica dependiente de ATP, para la degradación de extremos de DNA de cadena sencilla o de cadena doble, y la capacidad de reconocimiento de la secuencia χ (Fig. 4A). La actividad helicasa de RecBCD es esencial para el proceso de recombinación homóloga a partir de roturas de cadena doble (DSBs), ya que, junto con la actividad

exonucleasa de RecD, genera moléculas de cadena sencilla a las que se unirá RecA. χ es una secuencia octamérica que actúa en *cis* y cuando es encontrada por RecBCD, atenúa la actividad nucleasa de esta proteína pero no su actividad helicasa (Fig. 4B). De esta forma χ estimula la recombinación homóloga mediada por RecBCD (revisado en Sun *et al.*, 2006).

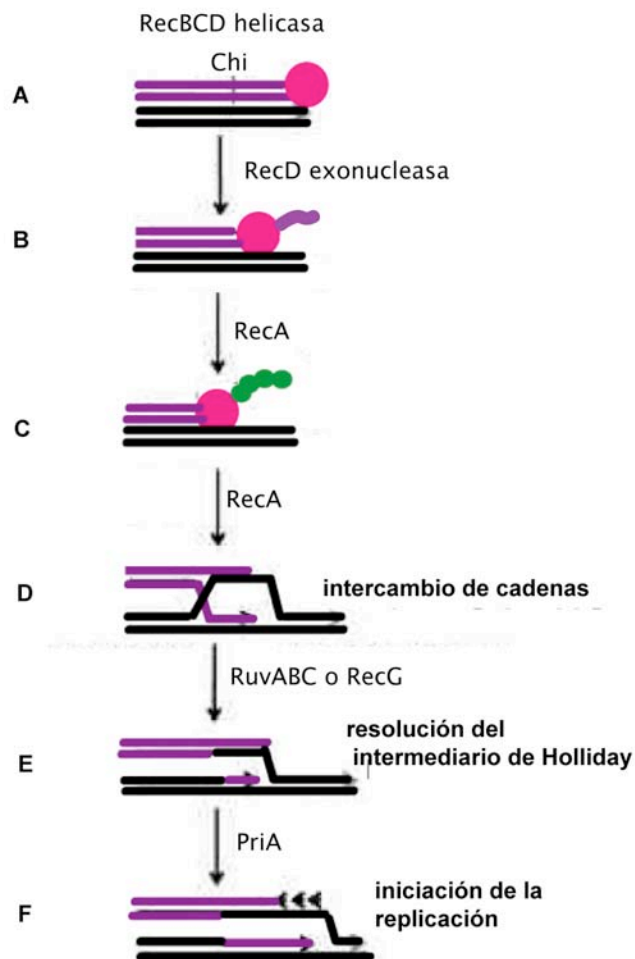


Figura 4. Recombinación en extremos de roturas de doble cadena (DSBs) en bacterias (Michel *et al.*, 2004).

El complejo RecBCD es la vía principal de reparación de cortes de DNA en la célula. La acción de RecBCD genera un extremo de DNA monocatenario 3' libre donde RecBCD carga a la proteína RecA (Amundsen y Smith, 2003). Bajo determinadas circunstancias estos pasos llevados a cabo por RecBCD pueden sucederse mediante la acción secuencial de otras proteínas. Un extremo de DNA competente para la recombinación homóloga puede producirse gracias a la actividad conjunta de la helicasa RecQ, actividad nucleolítica de RecJ y el complejo RecFOR (proteínas RecF, RecO y RecR), que cargarían a la proteína RecA (Amundsen y Smith, 2003; Ivancic-Bace *et al.*, 2003; Morimatsu y Kowalczykowski, 2003). Esta vía de ensamblaje de RecA al DNA se ha denominado vía RecFOR / RecQJ y se induce en un fondo genético *recBC sbcBC*. Otra vía con funcionamiento similar ha sido descrita en un fondo *recBC sbcA*. Esta vía se denomina RecET y comprende a las proteínas RecE, que convierte extremos de doble cadena en extremos 3' de cadena sencilla, y RecT, que promueve la recombinación alineando moléculas de DNA homólogas (Kolodner *et al.*, 1994; Kusano *et al.*, 1994).

Marians y col. han propuesto que los componentes para la replicación dependiente de recombinación (RDR) serían las proteínas RecA, RecBCD, SSB, girasa, la holoenzima Pol III, PriA, PriB, BnaB, DnaC, DnaG y DnaT. La proteína PriC no es requerida pero estimula la reacción (Marians *et al.*, 2000). Esta reacción es estimulada por RecO y RecD y está implicada en fenómenos de post-replicación y reparación de huecos (Clark y Sandler, 1994). Otras observaciones indican que estas proteínas son expresadas tras rotura del DNA provocadas por radiación UV (Courcelle *et al.*, 1997).

4.3. MÚLTIPLES VÍAS DE ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA PARA LA REANUDACIÓN DE LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN

Para la reanudación de la horquilla es necesario el ensamblaje de un nuevo replisoma que requiere, en primer lugar, la carga de la helicasa DnaB. DnaB coordina varios eventos en la horquilla, no sólo estabiliza la apertura del dúplex, sino que interactúa directamente con las proteínas encargadas de la síntesis de DNA como la primasa DnaG y la holoenzima Pol III.

La comparación de los fenotipos de mutantes en *priB* y *priC* con mutantes *priA*, el análisis de las combinaciones entre estos mutantes y la aparición de mutaciones supresoras de estos fenotipos han llevado a la propuesta de múltiples vías para el ensamblaje del primosoma (Fig. 5; Sandler, 2000). Los primeros indicios de la existencia de múltiples vías residen en el hecho de que los mutantes *priA*, aunque con muchos problemas, continúan siendo viables. Sin embargo, mutaciones en *priB* o *priC* apenas presentan problemas, aunque el doble mutante *priB priC* presenta aún más problemas que el mutante *priA*. Las combinaciones *priA priC* y *priA rep* son letales, mientras que *priA priB* y *priC rep* son viables. Al igual que PriA, Rep es una helicasa de DNA 3'→5'. Seigneur y col. mostraron, mediante el análisis *in vivo* de situaciones que conducen a la formación de

DSBs, que las combinaciones *rep recB* resultan letales y sugirieron que en ausencia de Rep las paradas de la horquilla de replicación son más frecuentes (Seigneur *et al.*, 1998). Tomando como conjunto todas estas observaciones, se han propuesto dos vías de restauración de la horquilla de replicación dependientes de PriA y de una vía independiente de PriA, que requiere, al menos, las proteínas Rep y PriC (Fig. 5; McCool y Sandler, 2001). Marians y colaboradores mostraron que, al igual que PriA, Rep es capaz de unirse a estructuras en lazo-D, incluso en presencia de SSB, e identificaron que la reacción de apertura de estructuras en lazos-D requiere Rep, PriC, DnaB y DnaC, sugiriendo que PriC sería capaz de cargar a DnaB (Marians, 2003).

5. RESPUESTAS DE ESTRÉS

Las células de *E. coli* han desarrollado sistemas que les permiten detectar y responder a diferentes estímulos físico-químicos para sobrevivir y adaptarse a diferentes condiciones ambientales. La capacidad de adaptarse a condiciones cambiantes es fundamental para el crecimiento y la supervivencia de la bacteria. La homeostasis celular es controlada por multitud de sensores y efectores que son capaces de responder a cambios en la temperatura, el pH, disponibilidad de nutrientes, osmolaridad, etc. Una compleja red de sistemas reguladores asegura una respuesta efectiva y coordinada.

Entre estas respuestas se incluyen la respuesta SOS, la respuesta a la carencia de nutrientes (respuesta restringida y respuesta de estrés general), la respuesta de choque térmico y la respuesta al estrés oxidativo (Hengge-Aronis, 1999; Wick y Egli, 2004; Foster, 2005).

5.1. RESPUESTA SOS

Existen una gran variedad de datos bioquímicos, genéticos y estructurales sobre los diferentes componentes de la respuesta SOS y las interacciones entre ellos. Esto hace del sistema SOS un paradigma para el estudio y un modelo de regulación de la reparación tras daño en el DNA (Sassanfar y Roberts, 1990; Gardner *et al.*, 2003). La respuesta SOS en *E. coli* depende de la inducción de más de 30 genes que llevan a cabo diversas funciones en respuesta a daños en el DNA o a paradas de la replicación y que incluyen la reparación por excisión de nucleótidos, replicación translesional del DNA, la recombinación homóloga y la inhibición de la división celular (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000; Courcelle *et al.*, 2001).

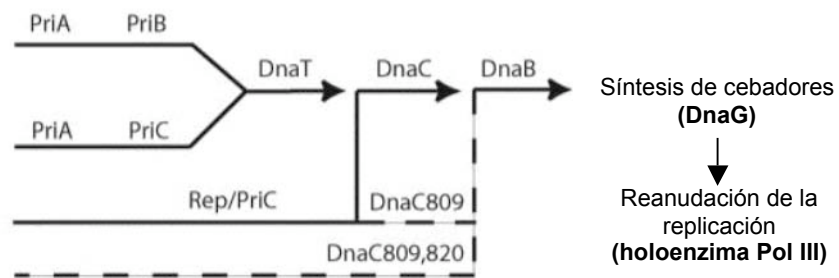


Figura 5. Vías de entrada de DnaB para la reanudación de las horquillas de replicación en *E. coli*. Estas vías son PriA-PriB, PriA-PriC y Rep-PriC. Las líneas discontinuas representan vías alternativas que se dan en presencia de las mutaciones supresoras que se indican (Sandler, 2000).

La expresión de los genes SOS está regulada por el represor LexA. Tras el daño en el DNA, se forma un filamento nucleoproteínico por la unión de la proteína RecA a DNA de cadena sencilla (ssDNA). Este filamento promueve la autoproteólisis del represor LexA, conduciendo a la inducción de la expresión de los genes SOS (Fig. 6). A medida que los daños se van reparando y la cantidad de DNA lineal capaz de activar a RecA va reduciéndose, desaparece la proteína RecA en su conformación activa y tiene lugar un descenso en la velocidad de degradación de LexA y, consecuentemente, disminuye la inducción de la respuesta SOS. Mientras que los estadios iniciales están bien caracterizados, se sabe poco sobre la coordinación temporal de los diferentes eventos que se suceden durante la respuesta SOS. Entre los genes del regulón SOS se encuentran genes relacionados con recombinación y reparación: *recA*, *recN*, *ruvAB*, *uvrAB*, *uvrD* y las polimerasas translesionales codificadas por los genes *polB* (Pol II), *dinB* (Pol IV) y *umuDC* (Pol V). En ausencia de respuesta SOS, las células son más sensibles a agentes que dañan el DNA. Una característica importante de la reparación inducida por la respuesta SOS es que es mutagénica (Radman, 1975; Fijalkowska *et al.*, 1997).

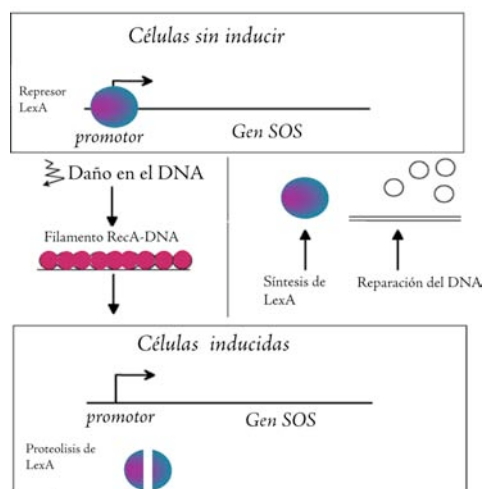


Figura 6. Inducción de la respuesta SOS en *E. coli*. En células sin inducir, el represor LexA se une a la secuencia promotora de los genes que conforman el regulón SOS y así permanecen reprimidos. En presencia de daño en el DNA, la formación del filamento nucleoproteínico RecA-ssDNA activa la autoproteólisis del represor LexA que deja libre los promotores, lo que induce la respuesta SOS.

5.2. RESPUESTAS AL ESTRÉS AMBIENTAL

Los organismos han desarrollado sistemas de respuesta al estrés causado por la variación de parámetros extracelulares. La temperatura es un factor ambiental muy importante; en *E. coli*, cuando se aumenta la temperatura de incubación a un cultivo bacteriano, las células adaptan su crecimiento rápidamente, sin pasar por un estado de transición, a la nueva temperatura (revisado en Neidhardt *et al.*, 1996). Las células de *E. coli* responden a una subida rápida de la temperatura de crecimiento induciendo la síntesis de un conjunto de proteínas conocidas como las proteínas de choque térmico, fenómeno que ha sido denominado respuesta de choque térmico. La respuesta de choque térmico es el más universal de los mecanismos de estrés conocidos, encontrándose desde bacterias hasta el hombre (Arsene *et al.*, 2000). En *E. coli*, la respuesta de choque térmico induce la expresión de aproximadamente 30 genes, regulados por la subunidad σ^{32} . La expresión de los genes de choque térmico tiene un pico máximo situado entre los 5 y 10 minutos posteriores al cambio de temperatura (Moreita *et al.*, 2000). La regulación de la expresión de σ^{32} es compleja e incluye la regulación por el factor transcripcional σ^E o σ^{24} que regula la respuesta a estrés periplásmico. La concentración del factor σ^E es proporcional a la concentración de precursores de proteínas de la membrana externa en el periplasma (Mejía *et al.*, 1995). Se ha comprobado que existe un aumento en la fluidez de la membrana plasmática

que precede al incremento en la expresión de los genes de choque térmico. La membrana de *E. coli* muestra una variación en la composición de sustituciones en los grupos acilos de los fosfolípidos que depende de la temperatura de crecimiento. Se ha determinado que a mayor temperatura de crecimiento, más bajo es la relación de ácidos grasos insaturados respecto a los saturados. Considerando el efecto regulador de los cambios en la fluidez de la membrana, Sinensky propuso que las bacterias se enfrentan a variaciones térmicas mediante respuestas adaptativas, tras cuantificar de la respuesta de la membrana para mantener la homeostasis frente a determinados cambios de temperatura (Sinensky, 1974). En *E. coli* la fluidez de la membrana juega un papel fundamental en la regulación del inicio de la replicación cromosómica. El nivel de fluidez de la membrana afecta a la relación ATP-DnaA, forma activa de DnaA, respecto a ADP-DnaA, la forma inactiva. Los ácidos grasos insaturados son capaces de promover la liberación de ADP unida a DnaA, reactivando a DnaA, pasándola a su forma unida a ATP. Esta actividad presenta dependencia de la temperatura (Aranovick, 2006).

Se ha propuesto que tras un cambio de temperatura tienen lugar cambios a nivel del superenrollamiento del DNA que juegan un papel esencial en la respuesta de la célula frente a una situación de estrés térmico (López-García y Forterre, 2002). Un aumento de temperatura también incrementa la flexibilidad y el movimiento Browniano de las proteínas, teniendo importantes consecuencias en las interacciones proteína-DNA, además de facilitar la apertura de la doble hélice de DNA (Adamcik *et al.*, 2002). Recientemente ha sido descrito que los cambios de temperatura en bacterias son detectados por componentes extracelulares que han sido denominados termómetros extracelulares (revisado en Rowbury, 2004). Estos componentes activarían la mayoría de los procesos inducidos por temperatura, incluida la síntesis de las proteínas de choque térmico.

5.3. REPLICACIONES DE ESTRÉS: HIR Y SDR

Entre las respuestas inducidas en *E. coli* por un aumento en la temperatura de incubación, es importante considerar los cambios en la replicación cromosómica. Un incremento de 10°C o más en la temperatura de crecimiento de un cultivo de *E. coli* induce rondas de replicación extras. Esta replicación se denominó HIR (heat induced replication) (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). A semejanza de la replicación cíclica, HIR inicia en *oriC* (Fig. 7 y Fig. 8). No requiere, sin embargo, la actividad de la RNA polimerasa ni síntesis de proteínas *de novo* que son necesarias para el inicio de la replicación cíclica. Su inducción es transitoria y requiere las proteínas RNasa HI y RecA. Se ha visto que HIR no está relacionado con la inducción de la respuesta de choque térmico (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

T. Kogoma describió un modo alternativo de replicación que se conoce como replicación estable (SDR) (Asai *et al.*, 1994). En los mutantes *rnhA*, carentes de la

actividad de la RNasa HI, la replicación puede ser iniciada continuamente en ausencia de síntesis de proteínas, de manera independiente a DnaA, desde varios lugares en el cromosoma diferentes a *oriC*, que se han denominado *oriK*. Este tipo de replicación se ha denominado replicación estable constitutiva (cSDR). Por otro lado, la inducción de la respuesta SOS en *E. coli* altera el modo de iniciación de la replicación cromosómica induciendo rondas de replicación a partir de los denominados *oriM*, que se localizan en *oriC* y *terC*, y tiene lugar en células silvestres. Este modo de replicación se denominó replicación estable inducida (iSDR).

Las diferencias principales entre los mecanismos de replicación descritos hasta la fecha en *E. coli* están en la forma mediante la cual tiene lugar la apertura de la doble hélice y en la estructura necesaria para el ensamblaje del primosoma (Fig. 8). Mientras que para las replications estables se ha propuesto la necesidad de estructuras en lazo-D (iSDR) o lazo-R (cSDR) como sustratos para el ensamblaje de las horquillas de replicación, en el caso de HIR, se ha propuesto que una alteración termodinámica de la estructura de *oriC* generaría la estructura necesaria para permitir el ensamblaje del primosoma en *oriC* (Kogoma, 1997; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). El trabajo de investigación presentado en esta memoria se inició para profundizar en el conocimiento de la replicación HIR.

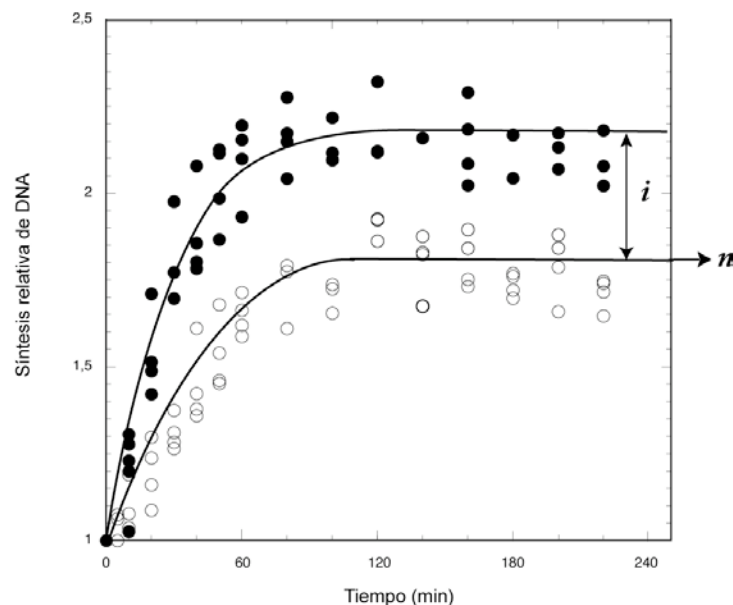


Figura 7. HIR en la estirpe silvestre AB1157 de *E. coli*. La gráfica representa la síntesis relativa de DNA (ΔG) tras la inhibición del inicio de la replicación por adición de rifampicina a tiempo 0 en un cultivo bacteriano creciendo a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●). A partir de la síntesis relativa obtenida a 30°C se calcula n o número de ciclos de replicación por cromosoma. Dado n y el valor de síntesis relativa obtenida a 41°C se calcula i como el porcentaje de orígenes inducidos tras el

cambio de temperatura que dan síntesis de cromosomas completos. El valor de i en tanto por ciento será una medida de HIR .

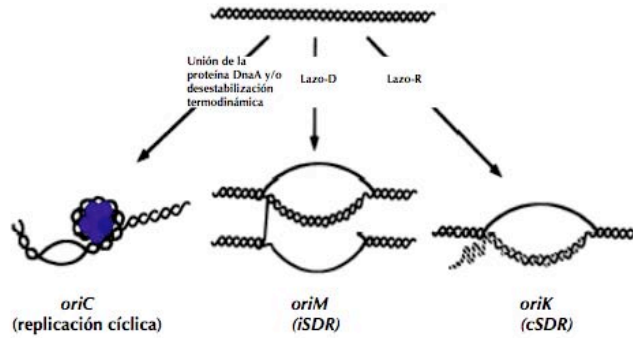


Figura 8. Mecanismos de inicio de la replicación cromosómica en *E. coli*. En el caso de la replicación cromosómica cíclica, el filamento nucleoproteínico formado por la oligomerización de DnaA en *oriC* facilita la apertura del DNA necesaria para el ensamblaje del primosoma. En el caso de iSDR y cSDR, dos estructuras, denominadas lazo-D y lazo-R, son las necesarias para el ensamblaje del primosoma en *oriM* y *oriK* respectivamente .

6. REPLICACIÓN DE MINICROMOSOMAS

Desde su construcción, los minicromosomas han servido de modelo para comprender cómo *oriC* controla la replicación del cromosoma bacteriano (revisado en Dasgupta y Lobner-Olesen, 2004). Al ser más fácil su manipulación que la del cromosoma, su uso ha posibilitado la obtención de mutaciones en la secuencia de *oriC* y se han considerado como esenciales aquellas regiones donde una mutación impide la funcionalidad del minicromosoma para replicarse y mantenerse en la célula.

Sin embargo, han sido establecidas algunas diferencias funcionales entre *oriC* en el cromosoma y clonado en minicromosomas (Weigel *et al.*, 2001). Así, los minicromosomas tienen un requerimiento absoluto de R4 y necesitan un espaciamiento correcto entre R3 y R4 para replicarse (Langer *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se delecionó R4 del origen cromosómico se obtuvieron replications funcionales, aunque con alguna perturbación (Bates *et al.*, 1995). Se han encontrado diferencias en el requerimiento de otras secuencias como R2, R5 y en la secuencia de unión de IHF que no son estrictamente requeridas en minicromosomas y dispensables para la replicación del cromosoma (Weigel *et al.*, 2001). La actividad de la RNA polimerasa, así como la presencia de superenrollamiento negativo, son necesarias tanto para la replicación en cromosoma como en minicromosomas. Se ha demostrado que los minicromosomas no pueden iniciar la replicación en ausencia de girasa (Leonard *et al.*, 1985). Aparentemente, el inicio de la replicación en minicromosomas presenta mayores

requerimientos topológicos que la replicación cromosómica, que pueden ser debidos al menor tamaño de la molécula y a que compiten con el cromosoma por las proteínas que ejercen una función estructural sobre el inicio de la replicación.

Los minicromosomas mantienen en un número de copias por célula cercano a diez durante un crecimiento equilibrado. La presencia de minicromosomas no produce cambios significativo en los parámetros celulares o en la sincronía de replicación indicando la ausencia de incompatibilidad entre cromosoma y minicromosomas (Skarstad y Lobner-Olesen, 2003).

7. REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómicas que se pueden mantener en las bacterias con un número de copias característico. Estas moléculas están presentes en los tres dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Woese *et al.*, 1990). Los plásmidos pueden representar más del 25% del material genético de la célula en algunos miembros de *Archaea* (Holmes *et al.*, 1995; Zillig *et al.*, 1994). Pueden incorporar y eliminar genes por recombinación o transposición, favoreciendo así el intercambio genético entre poblaciones. La abundancia de la información genética contenida en plásmidos, su impacto en las comunidades microbianas y el potencial de estos elementos para actuar como vectores de clonación ha estimulado una intensa investigación de los mismos, no sólo a nivel fundamental, sino también por su implicación en clínica, interés biotecnológico y medioambiental. Su estudio ha sido favorecido al tratarse de elementos con una organización genética aparentemente simple y al hecho de ser fácilmente manipulables (revisado en del Solar *et al.*, 1998).

En cuanto a su estructura genética, los plásmidos contienen una región esencial con genes y secuencias implicados en su replicación y el control de la misma. La organización de esta región es determinante y corresponde, en general, a la descrita en el modelo del replicón (Jacob *et al.*, 1963). Entre las regiones imprescindibles del plásmido, se encuentra *el replicador* u el origen(es) de replicación, genéricamente llamado *ori*, que es característico de cada replicón y éste sería el elemento que actúa *in cis* según el citado modelo. Algunos plásmidos codifican proteínas implicadas en el inicio de la replicación plasmídica, denominadas proteínas Rep, siendo éstas el elemento que actúa *in trans*.

Una característica que define a los plásmidos es su replicación autónoma y autocontrolada. Existen tres mecanismos básicos de replicación de plásmidos circulares: tipo *theta*, desplazamiento de la cadena y círculo rodante. Los mecanismos de regulación de la replicación de plásmidos difieren de los del cromosoma bacteriano en el número de nuevos plásmidos que se añaden por cada ciclo celular que depende del número de plásmidos preexistentes en la célula: a mayor número, menor número de

copias son hechas. Esto permite a los plásmidos mantener su número de copias dentro de unos intervalos. Los plásmidos presentan mecanismos de control negativo para ajustar las fluctuaciones en su número de copia (revisado en Nordstrom y Dasgupta, 2006). Este mecanismo de control lo llevan a cabo inhibidores que son producidos constitutivamente y cuya concentración se incrementa con el número de copias del plásmido. Al igual que en el cromosoma, y a pesar de presentar diferentes mecanismos de control, los plásmidos usan un mecanismo que tiende a limitar la concentración de la proteína iniciadora. Este mecanismo es suficiente para el control de la iniciación en varios plásmidos donde el mecanismo inhibidor de la replicación es un RNA antisentido (del Solar y Espinosa, 2000). En otros sistemas, como en los plásmidos tipo ColE1, el propio iniciador resulta ser una molécula de RNA, no una proteína y el inicio de la replicación es controlado por este RNA (Eguchi *et al.*, 1991).

Los plásmidos analizados en este trabajo se replican mediante el mecanismo Theta y, respecto al control de la replicación, se pueden agrupar en regulados por iterones y regulados por RNA antisentido.

7.1. REGULACIÓN POR ITERONES

En algunos plásmidos, la región del origen de replicación contiene secuencias directamente repetidas, denominadas iterones, que son sitios de unión para la proteína Rep codificada por el plásmido. Los iterones son secuencias cortas de aproximadamente 20 pb y constituyen elementos de control de la replicación en estos plásmidos. La saturación de los sitios de unión en el origen por la proteína iniciadora permite el inicio de la replicación. La presencia de iterones extras resulta en un descenso del número de copias del plásmido, al contrario que la delección que resulta en un incremento del número de copia. Como resultado de esta observación, se ha propuesto que los iterones son inhibidores de la replicación (Chattoraj, 2000). El mecanismo de control de la replicación en plásmidos con iterones combina los mecanismos de limitación del iniciador y la inactivación de orígenes.

Se han propuesto cuatro mecanismos que podrían limitar el inicio de la replicación en plásmidos que presentan iterones (Fig. 9A): (1) autorrepresión transcripcional que reduce la síntesis del iniciador, (2) dimerización del iniciador que reduce la concentración de monómeros, la forma activa de la proteína iniciadora, (3) dilución de la proteína iniciadora que previene la saturación del origen y (4) el secuestro por emparejamiento de orígenes (*handcuffing*). El mecanismo de secuestro de orígenes en plásmidos difiere del mecanismo del secuestro de *oriC* mediado por SeqA. Mientras que en cromosoma incluye la unión a membrana, en plásmidos, constituye un mecanismo de emparejamiento de iterones pertenecientes a varios orígenes, causando un impedimento estérico para el inicio de la replicación (Paulsson y Chattoraj, 2006). El mecanismo de secuestro por emparejamiento de orígenes de replicación está apoyado

por la caracterización de mutantes con alto número de copias de plásmidos que presentan defectos en la reacción de emparejamiento *in vitro* (Uga *et al.*, 1999).

Entre los plásmidos restringidos a una o pocas especies de enterobacterias, han sido descritos iterones en varios replicones como P1, F, pSC101 y R6K (Abeles *et al.*, 1995; Murotsu *et al.*, 1981; Tolun y Helinski, 1981, Churchward *et al.*, 1984; Germino y Bastia, 1983; Stalker *et al.*, 1982). También se han encontrado en replicones de amplio espectro como RK2/RP4, pCU1, pSa y pPS10 (Pansegrau *et al.*, 1994, Stalker *et al.*, 1981; Kozlowski *et al.*, 1987; Tait *et al.*, 1983; Fernández-Tresguerres *et al.*, 1995). Se pueden encontrar iterones fuera del origen de replicación en plásmidos como F, RK2, R6K, Rts1 y pCollV-K30.

7.1.1. Replicación del plásmido F

Al ser el plásmido F una molécula de gran tamaño, en condiciones de laboratorio y para estudios de su mecanismo de replicación, suele trabajarse con moléculas más pequeñas denominadas plásmidos mini-F. Los plásmidos mini-F poseen todas las funciones necesarias para la replicación de plásmidos F (Helmstetter *et al.*, 1997). El plásmido F contiene dos orígenes de replicación: *oriS*, también llamado *ori2*, y *oriV*. El replicón básico mínimo de F lo componen *oriS*, *repE* y los lugares *incB* (iterones) e *incC* (repeticiones invertidas) (Fig. 9B).

El origen de replicación *oriS* presenta dos secuencias de unión a DnaA, seguidas de una región rica en A+T y cuatro iterones de 19 pb a los que se une la proteína iniciadora RepE como monómero. El mecanismo de regulación implica la unión de cuatro monómeros de RepE a los cuatro iterones localizados en *oriS*. La unión de estas proteínas ocasiona la distorsión de esta región, favoreciendo la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T. Esta distorsión es favorecida por la unión de HU y DnaA (Kawasaki *et al.*, 1996). La apertura de la doble hélice es esencial para el inicio de la replicación de F.

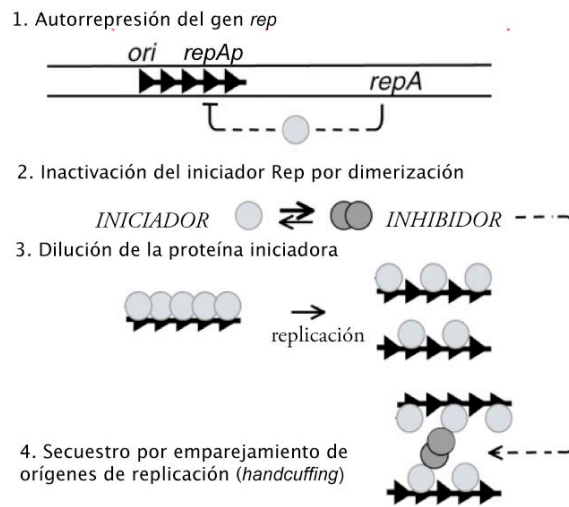
La cantidad celular de RepE es controlada a nivel transcripcional (Fig. 9A.1; Sogaard-Andersen *et al.*, 1987). La proteína RepE está presente también en conformación de homodímero, inactiva para el inicio de la replicación, pero activa para la autorrepresión (Fig. 9A.2). De hecho, las moléculas de RepE recién sintetizadas tienden a formar dímeros. También pueden formarse dímeros entre proteínas unidas a plásmidos diferentes. Estos dímeros pierden la capacidad de unión a iterones (Fig. 9A.4). La autoconversión en monómero depende de las chaperonas celulares DnaK, DnaJ y GrpE (Kawasaki *et al.*, 1990). El requerimiento de RepE en conformación activa puede ser un mecanismo para retrasar la iniciación.

Se ha propuesto que la formación de una estructura en lazo entre la región de iterones *incB* localizada en *oriS* y la región *incC* localizada fuera de *oriS*. Estudios recientes han mostrado que RepE, monómero o dímero, es capaz de promover *in vitro* la

Introducción

formación de este lazo entre *incB-incC*. Se ha demostrado que la formación de este lazo regula

A.



B.

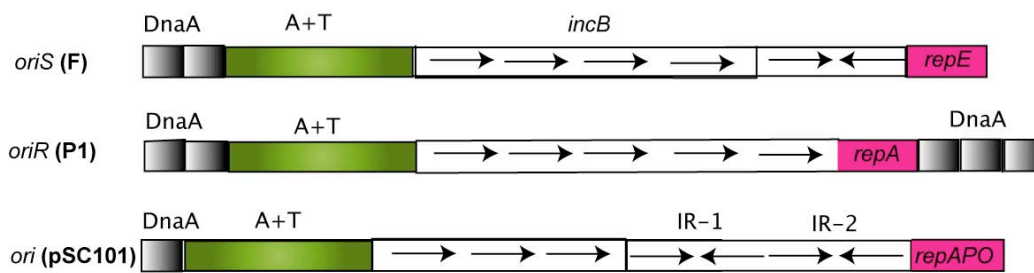


Figura 9. A) Mecanismos de regulación del inicio de la replicación en plásmidos regulados por iterones (modificado de Paulsson y Chattoraj, 2006). **B)** Estructura de los orígenes de replicación *oriS*(F), *oriR*(P1) y *ori* (pSC101) regulados por iterones. De izquierda a derecha, las secuencias incluyen secuencias de unión de la proteína iniciadora del hospedador (DnaA), una región rica en A+T, los iterones (→), secuencias invertidas (→←) y el gen estructural de la proteína iniciadora Rep.

negativamente la replicación del plásmido inhibiendo la formación del complejo abierto que es el paso clave en el control del inicio de la replicación del plásmido F (Zzaman y Bastia, 2005).

7.1.2. Replicación de P1

oriR, el origen de replicación del plásmido P1, contiene dos grupos de secuencias de unión de DnaA, uno en cada extremo de su secuencia. A continuación de las secuencias de la izquierda se encuentra una zona rica en A+T, que contiene sitios de metilación GATC. Adyacentes se encuentran los iterones que consisten en cinco repeticiones de 19 pb que unen a la proteína RepA. A la derecha de la zona de iterones se localiza la secuencia codificante de la proteína RepA (Fig. 9B; Abeles y Austin, 1988; Brendler *et al.*, 1995).

La replicación del plásmido P1 es dependiente, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la proteína iniciadora del hospedador DnaA (Hansen y Yarmolinsky, 1986; Wickner y Chatteraj, 1987).

RepA sola es incapaz de abrir el origen, de ahí que existan dos repeticiones en tándem o secuencias de unión de la proteína DnaA en cada extremo de *oriR*. La unión de monómeros activos de RepA a los cinco iterones del origen conlleva la torsión del DNA alrededor de los monómeros de DnaA que interaccionan unos con otros. Sólo una de las regiones de unión de DnaA es requerida durante la replicación, aunque la replicación eficiente requiera la presencia de los dos grupos de secuencias (Messer, 2002). La carga de DnaB, dependiente de DnaA, ocurre preferentemente en una de las hebras lo que explica que el modo de replicación del plásmido P1 sea unidireccional (Mukhopadhyay *et al.*, 1993).

El control de la replicación se lleva a cabo por un mecanismo de secuestro por emparejamiento de orígenes (*handcuffing*). En el caso de P1 existen también iterones fuera de la región del origen de replicación para los que se ha descrito que ejercen un control negativo del inicio de la replicación más eficiente que el ejercido por los presentes en el origen de replicación (Park *et al.*, 2001).

7.1.3. Replicación de pSC101

El origen de replicación del plásmido pSC101 presenta una secuencia de unión de la proteína DnaA, separada de la zona de tres iterones por una secuencia rica en A+T. En la secuencia rica en A+T, existe un sitio de unión de la proteína IHF, codificada por el hospedador, y cuya interacción es esencial para la replicación. A continuación

se encuentran tres iterones para la unión de RepA seguidos de dos secuencias de repeticiones invertidas IR-1 e IR-2 que se solapan con el promotor de RepA. La proteína RepA existe como monómero y como dímero. El monómero de RepA parece ser la forma activa y se une a los iterones para determinar el inicio de la replicación. Los dímeros de RepA se unen a la primera repetición invertida y actúan como estímulo para el inicio de la replicación; sin embargo, la unión de dímeros a la segunda repetición invertida actúa como autorrepressor de la expresión de RepA (Fig. 9B; Stenzel *et al.*, 1987; Gamas *et al.*, 1986; Murakami *et al.*, 2000). La proteína RepA es requerida tanto para la replicación plasmídica, como para el reparto de plásmidos a las células hijas durante la división celular (Biek and Cohen, 1989).

DnaA es requerida para la apertura del origen y la carga de la helicasa DnaB. La unión de DnaA es estabilizada por la proteína IHF. DnaA parecen interaccionar con RepA *in vitro* (Lu *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). RepA se une también a la primasa DnaG de *E. coli* y a la subunidad τ de la holoenzima Pol III (Miron *et al.*, 1994; Datta *et al.*, 1999).

7.2. REGULACIÓN POR RNA ANTISENTIDO

En los plásmidos cuyo control de la replicación es ejercido por RNA antisentido (asRNA), estas pequeñas moléculas de RNA complementarias de otras moléculas de RNA juegan un papel fundamental en el inicio de la replicación. La unión del RNA antisentido a su diana tiene diferentes consecuencias dependiendo del plásmido. Mientras que en plásmidos tipo ColE1 inhibe la formación de una molécula de RNA esencial para la replicación, en otros plásmidos, como los pertenecientes a la familia IncB inhibe la traducción del RNA mensajero de la proteína RepA que lleva a cabo el primer paso de la replicación que es la apertura del origen (Betteridge *et al.*, 2004).

7.2.1. Replicación de R1

La región mínima requerida para el inicio de la replicación del plásmido R1 se denomina *oriR1* (Masai *et al.*, 1983). Esta región de 188 pb consta de una secuencia de unión de DnaA de 9 pb, a la que le sigue una región de 100 pb donde interacciona la proteína iniciadora RepA. A continuación se encuentra una región rica en A+T con tres repeticiones de 9 pb. La región de unión de RepA presenta dos secuencias palindrómicas de unión para esta proteína denominados sitio preferente o sitio 1, cercano a la secuencia de unión de DnaA, y el sitio 2 o de menor afinidad. Estas secuencias se localizan en una región de curvatura potencial de DNA. Es de señalar que el inicio de la replicación ocurre en una zona que se encuentra a 400 pb corriente abajo de *oriR1* (Fig. 10A).

La replicación del plásmido R1 requiere, tanto *in vivo* como *in vitro*, de la proteína iniciadora RepA (Díaz *et al.*, 1981; Kollek *et al.*, 1978; Masai *et al.*, 1983; Uhlin y Kordström,

1978). La interacción de las diferentes moléculas de RepA podrían ser responsables de la curvatura de la región donde se localiza *oriR1*. Una vez unida RepA a sus sitios de unión en *oriR1*, otras moléculas de RepA podrían unirse a la región intermedia por interacción cooperativa proteína-proteína, generando un complejo de orden superior. Estas interacciones son necesarias para el inicio de la replicación. La interacción RepA-*oriR1* promueve el ensamblaje del primosoma en el denominado sitio G donde la primasa DnaG llevaría a cabo la síntesis de la cadena continua (del Solar *et al.*, 1998).

In vitro, la replicación de R1 requiere la proteína DnaA del hospedador. La proteína DnaA se une a una la secuencia de unión de DnaA, sin embargo, *in vivo* la replicación no requiere la proteína DnaA aunque en su ausencia la replicación es menos eficiente (Tang *et al.*, 1989, Bernander *et al.*, 1991, Ortega-Jiménez *et al.*, 1992). La unión RepA-DnaA favorece la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T (Masai y Arai, 1988).

El control del número de copias del plásmido R1 es ejercido a nivel de la síntesis de la proteína RepA, que es regulada por los productos de los genes *copA* y *copB*, siendo *copA* el principal. Tanto *copA* como *copB* inhiben la expresión de *repA*. *copA* se transcribe desde un promotor constitutivo cuyo producto final es un RNA antisentido con una vida media de dos minutos. Este RNA antisentido es complementario a la región CopT del mRNA de RepA. El híbrido inhibe la síntesis de RepA, al impedir la traducción del péptido líder *tap*, acoplado a *repA*. La completa inactivación de CopA conduce a una replicación incontrolada. El dúplex CopA-CopT es cortado específicamente por la RNasa III, siendo este paso fundamental para el control de la síntesis de RepA. La estabilidad estructural juega un papel protector en la degradación por RNasa III. El segundo elemento regulador, CopB, juega un papel auxiliar en condiciones normales. Cuando el número de copias cae o es bajo, la represión vía CopB no es eficiente restaurándose en un mayor número de copias de plásmido (revisado en del Solar *et al.*, 1998).

7.2.2. Replicación de *ColE1*

ColE1 es el prototipo de plásmido multicopia que replica mediante mecanismo tipo theta. Entre los plásmidos *ColE1* se encuentran los plásmidos artificiales pBR, pUC o pBluescript. A diferencia de otros plásmidos, no requiere proteína iniciadora del huesped, DnaA, pero sí la DNA polimerasa Pol I del hospedador para la replicación. El origen de replicación abarca una zona de aproximadamente 1kb que incluye: (i) secuencias que promueven la síntesis de RNA II, el cebador de la cadena de síntesis continua, (ii) secuencias que permiten la hibridación estable de RNA II al DNA, (iii) secuencias que permiten el procesamiento del dúplex RNA-DNA por la RNasa HI, que genera el extremo 3' necesario para el comienzo de la síntesis de DNA por Pol I, (iv) un sitio para el ensamblaje del primosoma, sitio *pas*, que permite la carga de la helicasa DnaB y la

Introducción

primasa DnaG para la síntesis de la cadena discontinua, (v) cercana al sitio *pas* existe una secuencia de unión a DnaA, que puede ser usado para la carga del complejo DnaB-DnaC vía DnaA, además de una secuencia rica en A+T, (vi) un sitio de unión de IHF y (vii) una secuencia de terminación de la cadena discontinua *terH*, que determina la unidireccionalidad de la replicación. El origen de replicación se encuentra situado a 555pb del inicio de síntesis del RNA II (Fig. 10B). Este RNA II es procesado específicamente por la RNasa H, procesamiento requerido para la transición de la síntesis de RNA a la de DNA, que es llevada a cabo por Pol I. La disponibilidad de extremos 3'-OH libres para Pol I es limitante para el comienzo de la síntesis. La hibridación del RNA II con un RNA I antisentido impide que el precebador RNA II hibride con el DNA, inhibiendo el inicio de la replicación. El RNA I es sintetizado a partir de un promotor constitutivo por lo que el número de copias de RNA I depende del número de copias del plásmido. La proteína Rop/Rom interactúa con el RNA antisentido y con el precebador incrementando la eficiencia de formación del complejo RNA I/RNA II (Figura 10; revisado en del Solar *et al.*, 1998).

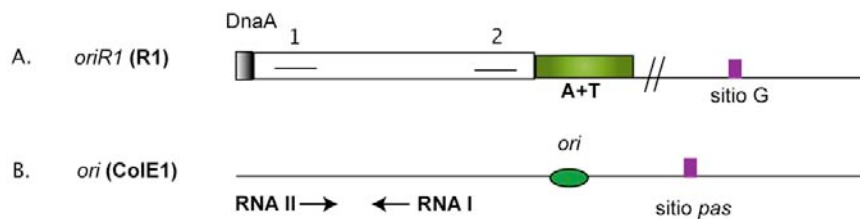


Figura 10. Organización de los orígenes de replicación de los plásmidos controlados por asRNA R1 y ColE1. **A)** Origen *oriR1* del plásmido R1. De izquierda a derecha, la secuencia presenta las siguientes características estructurales: secuencia de unión de la proteína DnaA, sitios 1 y 2 de unión de la proteína RepA y región rica en A+T. A 400 pb de *oriR1* se encuentra el sitio G, de ensamblaje del primosoma, donde tiene lugar el inicio de la replicación del plásmido R1. **B)** Región del origen de replicación *ori* de ColE1. De izquierda a derecha se presentan los lugares de síntesis de RNA II y RNA I, la zona del origen de replicación (*ori*) y el sitio de ensamblaje del primosoma.

***Objetivos y
aproximación
experimental***

OBJETIVOS Y APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación describieron el inicio de replications extras desde *oriC* inducidas tras un aumento de diez o más grados centígrados de la temperatura de incubación de un cultivo de *E. coli*. Esta replicación termoinducida se denominó HIR (heat induced replication) (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). La inducción de HIR es transitoria y no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis *de novo* de proteínas para su iniciación. HIR no está relacionada con la respuesta de choque térmico y requiere la funcionalidad de las proteínas RecA y RNasa HI para su inducción. Teniendo en cuenta estos datos y basándose en la baja estabilidad termodinámica de la región de *oriC*, al tratarse de una secuencia rica en A+T, se propuso que una alteración de la región de *oriC* podría conducir a la apertura de la doble hélice de DNA en esta zona y promover el ensamblaje replisomas responsables de la replicación HIR (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Partiendo de esta hipótesis, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de los factores que determinan que la inducción de HIR tenga lugar en *oriC* y no en otras zonas del cromosoma de *E. coli*. Se han analizado los requerimientos de la estructura del DNA y las proteínas que interaccionan con la región de *oriC*. Se ha estudiado la dependencia de HIR de las funciones de proteínas y complejos que actúan tanto en el inicio como en la elongación de la replicación.

Por otro lado, considerando la relación existente entre los procesos de replicación y recombinación, y teniendo en cuenta la necesidad de RecA para HIR a diferencia de la replicación cíclica, se ha estudiado la relación existente entre la inducción de HIR y la función de proteínas de recombinación.

La existencia de moléculas con replicación autónoma en el citoplasma bacteriano como son los plásmidos y ya que éstos regulan su replicación en el contexto del ciclo celular bacteriano, llevó a estudiar si la replicación acíclica HIR puede inducirse en otros replicones diferentes al cromosoma de *E. coli*.

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos propuestos inicialmente para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Determinar si en ausencia de *oriC*, otras regiones cromosómicas pueden funcionar como orígenes de replicación para HIR. Definir las secuencias de *oriC* necesarias para el inicio de la replicación termoinducida.
2. Determinar si existe una dependencia entre HIR y el estado topológico del cromosoma.
3. Caracterizar los requerimientos funcionales de HIR para tratar de explicar su mecanismo de iniciación y elongación.
4. Estudiar la replicación termoinducida en minicromosomas y plásmidos para determinar si HIR es un mecanismo general de estrés o está restringido al cromosoma de *E. coli*.

Para la consecución de estos objetivos se han empleado las siguientes aproximaciones metodológicas y experimentales:

1. El análisis de las secuencias de *oriC* y de las proteínas necesarias para la replicación HIR se abordó mediante la medida de la síntesis de DNA tras estrés térmico. Cultivos de diferentes estirpes portadoras de mutaciones en la secuencia de *oriC* o que expresan proteínas mutantes necesarias para procesos de replicación, recombinación o reparación se sometieron a un cambio de temperatura de 30°C a 41°C al tiempo que se inhibían nuevos inicios de replicación con rifampicina. La comparación de la síntesis de DNA en estas condiciones a 30°C y tras el cambio a 41°C permitió cuantificar el número de orígenes de replicación inducidos por estrés térmico, *i*, cuyo valor se utilizó para definir la necesidad de cada secuencia o función proteínica en esta replicación.

2. Para el estudio de la relación entre la topología cromosómica y la inducción de la replicación por estrés térmico se llevaron a cabo análisis de la expresión de genes sensibles al superenrollamiento (SSG). Para ello, se analizó la expresión del promotor del gen *gyrB* mediante el ensayo de la actividad de la β -galactosidasa y de los genes SSG del genoma completo de *E. coli* mediante experimentos de microarrays de DNA en las condiciones experimentales de inducción de HIR. Se ha analizado la replicación termoinducida en mutantes topológicos y en condiciones de inhibición de las subunidades A y B de la girasa con drogas específicas.

3. Para la determinación de la inducción de HIR en minicromosomas y plásmidos se analizó el número de copias de estas moléculas tras estrés térmico por espectrofluorimetría. Para ello se han utilizado plásmidos que expresan la proteína GFP*mut2* (Lobner-Olesen, 1999).

Estos estudios han permitido describir el lugar y los requerimientos estructurales de la iniciación de la replicación termoinducida, así como de las funciones requeridas para que tenga lugar.

Materiales

1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y FAGOS

1.1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas usadas en este trabajo son derivadas de *Escherichia coli* K-12 y se recogen en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Tabla 2. Estirpes de *E. coli* K-12 utilizadas para la determinación de secuencias esenciales en *oriC* para HIR (capítulo 1 de Resultados).

ESTIRPE	GENOTIPO	Referencia / Origen
CM1565	<i>ilv192, asnB32, relA1, spoT1, thi-1, lys, fuc</i>	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM1588	CM1565/min 85::pCM197 (pCM197: replicón F (<i>oriS, oriV</i>), <i>ilv+</i>)	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM1671	CM1588 $\Delta oriC1071$ (Δ desde <i>gidB</i> a <i>asnA</i> , 4 Kb) <i>asnA</i> ::Tn10/min85::pCM197	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM1793	CM1565/min 89::pKN500 (pKN500: derivado R1 de 26 kb (<i>oriR1</i>), <i>asn+</i>)	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM1843	CM1793 $\Delta oriC1071$ (Δ desde <i>gidB</i> a <i>asnA</i> , 4 Kb)/min 89::pKN500 (pKN500: derivado de R1(<i>oriR1</i>), <i>asn+</i>)	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM735	<i>metE46, trp3, his4, thi1, galk2, lacY1, mtl1, ara9, tsx3, ton1, rps8, supE44</i>	Eliasson <i>et al.</i> , 1996
CM735 intFs-B	CM735 $\Delta oriC$::pAE15 (pAE15: replicón miniF (<i>oriS</i>) $\Delta oriC16$ pb, <i>bla</i>)	Eliasson <i>et al.</i> , 1996
CM735 intP1-B	CM735w $\Delta oriC$::pAE9 (pAE9: replicón P1 (<i>oriR</i>) $\Delta oriC$ 16 pb, <i>bla</i>)	Eliasson <i>et al.</i> , 1996
ER	<i>asnA31 asnB32 thi-1 relA1 spoT1</i>	CGSC ⁽¹⁾
LK211	ER $\Delta oriC$::pKN1562 (pKN1562: replicón R1 (<i>oriR1</i>) $\Delta oriC$ 16pb, <i>asn+</i> , <i>neo</i>)	Koppes y Nordström, 1986
WM2482 (=MG1655)	<i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2759	WM2482 <i>oriC160 asnA</i> :: <i>Km</i> <i>oriC160</i> : Δ 275-352	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2762	WM2482 <i>oriC13 asnA</i> :: <i>Km</i> <i>oriC13</i> : R2 modificada	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2763	WM2482 <i>oriC14 asnA</i> :: <i>Km</i> <i>oriC14</i> : R3 modificada	Weigle <i>et al.</i> , 2001

Materiales

WM2764	WM2482 <i>oriC15 asnA::Km</i> <i>oriC15</i> : R4 modificada	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2765	WM2482 <i>oriC21 asnA::Km</i> <i>oriC21</i> :R1 en R3	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2766	WM2482 <i>oriC131 asnA::Km</i> <i>oriC131</i> : sitio Fis mutado	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2767	WM2482 <i>oriC132 asnA::Km</i> <i>oriC132</i> : sitio IHF mutado	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2768	WM2482 <i>oriC136 asnA::Km</i> <i>oriC136</i> : R4 invertida	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2844	WM2482 <i>oriC17 asnA::Km</i> <i>oriC17</i> : M modificada	Weigle <i>et al.</i> , 2001
WM2845	WM2482 <i>oriC162 asnA::Km</i> <i>oriC162</i> : +14pb R3/R4	Weigle <i>et al.</i> , 2001

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas para los estudios topológicos de HIR (capítulo 2 de Resultados).

ESTIRPE	GENOTIPO	Referencia / Origen
AB1157	F- <i>thr-1 leuB6 Δ(gpt- proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 rfbD1 mgl-51 kdgK51 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44</i>	Bukao y Walker, 1989
IC2014	AB1157 <i>topA10</i>	Aleixandre <i>et al.</i> , 1989
IC2076	AB1157 <i>gyrA904/pIUC90 (Ap^R)</i>	Aleixandre <i>et al.</i> , 1989
IC2026	AB1157 <i>topA10 gyrA926 zid::Tn10</i>	Aleixandre <i>et al.</i> , 1989
MG1655	silvestre	Colección lab. A. B. Khodursky
WM3110 <i>gyrBp-bla</i> <i>gyrBp-lacZ</i>	W3110 <i>gyrBp-bla</i> (min. 1,8) <i>gyrBp-lacZ</i> (min.7,8)	Hardy y Cozzarelli, 2005
GY773	AB1157 <i>lexA3 (Ind-)</i>	Dr. J. E. Rebollo (obtenida de R. Devoret)
IC2076	AB1157 <i>gyrA904/pIUC90 (Ap^R)</i>	Aleixandre <i>et al.</i> , 1989
JK607	JS1018 <i>nrdA+ yfaL::Tn5 = thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl su yfaL::Tn5</i>	Transducción de <i>nrdA+ yfaL::Tn5</i> desde MG1655 <i>yfaL::Tn5</i> a JS1018
JK876	JK607 <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i> de JRW27 a JK607
CM1588	CM1565/min 85::pCM197 (pCM197: replicón F (<i>oriS</i> , <i>oriV</i>), <i>ilv+</i>)	von Meyenburg y Hansen, 1980

CM1671	CM1588 Δ oriC1071 (Δ desde <i>gldB</i> a <i>asnA</i> , 4 Kb) asnA::Tn10/min85::pCM19	von Meyenburg y Hansen, 1980
CM735	<i>metE46, trp3, his4, thi1, galk2, lacY1, mtl1, ara9, tsx3, ton1, rps8, supE4</i>	Eliasson <i>et al.</i> , 1996
LK211	ER Δ oriC::pKN1562 (pKN1562: replicación R1 (<i>oriR1</i>) Δ <i>oriC</i> 16pb, <i>asn+</i> , <i>neo</i>)	Koppes y Knordström, 1986
RG801	LK211 <i>dnaA858::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA858::Tn10</i> desde AQ5496 a LK211
JS1018	<i>nrdA101 thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl</i>	Este laboratorio
JRW27	C600 <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i>	Dr. James R. Walker
AQ5496	AQ4241 <i>mhA224 dnaA858::Tn10 mhA224 thyA deoB(C) trp his metE thi ara galk mtl rbs+ rpsL tonA sup-38</i>	Dr. T. Kogoma

Tabla 4. Estirpes de *E. coli* utilizadas para analizar los requerimientos funcionales de HIR (capítulo 3 de Resultados)

ESTIRPE	GENOTIPO	Referencia / Origen
JK607	JS1018 <i>nrdA+</i> <i>yfaL::Tn5</i> = <i>thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl su yfaL::Tn5</i>	Transducción de <i>nrdA+</i> <i>yfaL::Tn5</i> desde MG1655 <i>yfaL::Tn5</i> a JS1018
JK876	JK607 <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i> de JRW27 a JK607
JK894	JK607 <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i> /p (<i>dnaAR281A</i>)	Transformación de JK876 con pRB100 (<i>dnaAR281A</i>)
JK915	JK607 <i>dnaA5 tnaA300::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA5 tnaA300::Tn10</i> de SS1750 a JK607
JK916	JK607 <i>dnaA508 tnaA300::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA508 tnaA300::Tn10</i> desde JC12390 a JK607
RG801	LK211 <i>dnaA858::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA858::Tn10</i> desde AQ5496 a LK211
SS1750	AB1157 <i>dnaA5 tnaA300::Tn10</i>	Dr. S. Sandler
JC12390	AB1157 <i>dnaA508 tnaA300::Tn10</i>	Dr. S. Sandler

Materiales

AQ5496	AQ4241 <i>rnhA224 dnaA858::Tn10 rnhA224 thyA deoB(C) trp his metE thi ara galK mtl rbs+ rpsL tonA sup-38</i>	Dr. T. Kogoma
AB1157	F- <i>thr-1 leuB6 Δ(gpt- proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 rfbD1 mgl-51 kdgK51 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44</i>	Bukao y Walker, 1989
GY773	AB1157 <i>lexA3</i> (Ind-)	Colección Laboratorio
JC10289	AB1157 <i>Δ(recA-srlR)306 srlR301::Tn10-84</i>	Larminat <i>et al.</i> , 1992
GY7313	<i>[sulA::lacZ+ cl (Ind-)]Δlac sulA211 ΔrecA306 srl::Tn10 thr-1 leuB6 his-4 argE3 ilvts galK2 ara-15 xyl-15 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44</i>	Asai <i>et al.</i> , 1993
GY8202	GY7313 / miniF <i>recA428</i>	Asai <i>et al.</i> , 1993
GY8322	AB1157 <i>sulA11 ΔrecA306::Tn10</i> / miniF <i>recA+</i>	Asai <i>et al.</i> , 1993
RG620	JC10289 / pCC6111 (pGB2 <i>recA611</i>) pCC6111: pGB2 (RecA611)	Transformación de JC10289 con pCC6111
IC400	AB1157 <i>recA430</i>	Armengod, 1982
RG623	JC10289 / pCC6941 (pGB2 <i>recA694</i>) pCC6941:pGB2 (RecA694)	Transformación de JC10289 con pCC6941
GY8201	GY7313 / miniF <i>recA423</i>	Ishimori <i>et al.</i> , 1996
RG805	AB1157 <i>recD1903::Tn10</i>	Transducción de <i>recD1903::Tn10</i> desde DPB271 a AB1157
DPB271	MG1655 <i>recD1903::mTn10</i>	Dr. J. Zyskind
JC7623	AB1157 <i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC201</i>	Gillen <i>et al.</i> , 1981
RG739	AB1157 <i>recF400::Tn5</i>	Transducción de <i>recF400::Tn5</i> desde JJC451 a AB1157
RG738	AB1157 <i>recO1504::Tn5</i>	Transducción de <i>recO1504::Tn5</i> desde JJC2135 a AB1157
RG799	AB1157 <i>recR252::Tn10-9</i>	Transducción de <i>recR252::Tn9-10</i> desde JJC2142 a AB1157
JJC451	JJC40 <i>recF400::Tn5</i>	Grompone <i>et al.</i> , 2004
JJC2135	JJC40 <i>recO1504::Tn5</i>	Grompone <i>et al.</i> , 2004
JJC2142	JJC40 <i>recR252::Tn10-9</i>	Grompone <i>et al.</i> , 2004

BIK2680	AB1157 <i>recQ1803::Tn3</i>	Handa y Kobayashi, 2003
RG736	AB1157 <i>recJ234::Tn10</i>	Transducción de <i>recJ234::Tn10</i> desde RIK200 a AB1157
RIK200	<i>thr-1 araC14 leuB6(Am) del(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 qsr'-0 glnV44(AS) galK2(Oc) Rac-0 hisG4(Oc) rfbD1 mgl-51 rpoS3%6(Am) recB1067(Δ1067A) recJ284::Tn10 rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 argE3(Oc) thi-1</i>	CGSC ⁽¹⁾
JC8679	AB1157 <i>recB21 recC22 sbcA23 rpsL</i>	Asai <i>et al.</i> , 1993
BIK3884	AB1157 <i>recB21 recC22 sbcA23 recT101::Tn10</i>	Handa y Kobayashi, 2003
JC8691	AB1157 <i>recB21 recC22 sbcA23 recE159</i>	Gillen <i>et al.</i> , 1981
BIK2565	AB1157 <i>recN1502::Tn5</i>	Handa y Kobayashi, 2003
JJC40	AB1157 <i>hsdR</i>	Bierne <i>et al.</i> , 1997
JJC432	JJC40 <i>recD::Tn10 recA::Cm</i>	Bierne <i>et al.</i> , 1997
BIK1620	AB1157 Δ <i>ruvAB100::Cm</i>	Handa y Kobayashi, 2003
RG743	AB1157 Δ <i>ruvC::Cm</i>	Transducción de Δ <i>ruvC::Cm</i> desde AVG783 a AB1157
RG740	AB1157 Δ <i>ruvABC::Cm</i>	Transducción de Δ <i>ruvABC::Cm</i> desde AVG754 a AB1157
RG734	AB1157 <i>recG263::Km</i>	Transducción de <i>recG263::Km</i> desde N3793
JJC357	JJC40 <i>recA938::Cm</i>	Bierne <i>et al.</i> , 1997
HRS2006	AB1157 Δ (<i>srl-recA</i>) <i>306::Tn10</i>	Shibata <i>et al.</i> , 2005
RG840	HRS2006 / p7.7 (<i>recAS25P</i>)	Transformación de HRS006 con p7.7 (<i>recAS25P</i>)
JJC1431	AB1157 <i>priA300 pflD::miniTn10Km</i>	Grompone <i>et al.</i> , 2003
RG731	AB1157 <i>priA2::kan</i>	Transducción de <i>priA2::Km</i> desde JJC1398 a AB1157
JJC520	deoA21 cat lac624 lacY1	Flores <i>et al.</i> , 2002
RG742	AB1157 <i>priA2::Km</i> / pAM (<i>priA</i>)	Transformación de RG731 con pAM(PriA+)
JJC1506	JJC520 Δ <i>priB302 zif-599::Tn10</i>	Flores <i>et al.</i> , 2002

Materiales

JJC1507	JJC520 $\Delta priC303::kan$	Flores <i>et al.</i> , 2002
JC19008	AB1157 <i>priA2::kan dnaC809 sulA::Mud lacZ</i>	Grompone <i>et al.</i> , 2003
RG737	AB1157 $\Delta rep::kan$	Transducción de $\Delta rep::Km$ desde JJC213 a AB1157
JJC213	JJC40 $\Delta rep::km$	Michel <i>et al.</i> , 1997
MC4100	F- <i>relA1</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 deoC1 araD139 rpsL150 flbB301 ptsF25 rpsR</i>	CGSC ⁽¹⁾
MC4100	MC4100 <i>polA::Tn5</i>	Dr. S. Dasgupta
poIA::Tn5		
KMBL1789	<i>bioA2 pheA97 argA103 thyA305 endA101 polA107 deoB301</i>	CGSC ⁽¹⁾
CM5409	Δ (<i>galK-bioD</i>) <i>76 relA1 spoT1 zig-1863::Tn10 polA1(Am) thi-1</i>	CGSC ⁽¹⁾
JJC1954	JJC40 <i>dnaE486 zae502::Tn10</i>	Dr. B. Michel
AVG783	MG1655 $\Delta ruvC::Cm$	Dr. J. Zyskind
AVG754	MG1655 $\Delta ruvABC::Cm$	Dr. J. Zyskind
N3793	<i>thr-1 araC14 leuB6(Am) (gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 qsr'-0 glnV44(AS) galK2(Oc) LAM- Rac-0 hisG4(Oc) rfbD1 mgl-51 rpoS396(Am) rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 recG263(::kan) argE3(Oc) thi-1</i>	CGSC ⁽¹⁾

⁽¹⁾CGSC: banco genético de *E. coli*, Universidad de Yale (EEUU).

Tabla 5. Estirpes de *E. coli* K-12 utilizadas para el análisis de la replicación termoinducida en plásmidos (capítulo 4 de Resultados).

ESTIRPE	GENOTIPO	Referencia / Origen
MC1000	silvestre	Lobner-Olesen, 1999
ALO1454	MC1000/pALO261 (pALO261: oriR1 Ap ^R araC pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1455	MC1000/pALO264 (pALO264: oriC Km ^R araC pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1456	MC1000/pALO267 (pALO267: oriC sop Km ^R araC pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1458	MC1000/pALO269 (pALO269: ori (pBR322) Ap ^R araC pBAD+GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1459	MC1000/pALO270 (pALO270: oriR(P1) Δ incA Cm ^R araC Δ incA pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1460	MC1000/pALO269 (pALO269: ori (pBR322) Ap ^R araC pBAD+GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1465	MC1000/pALO280 (pALO280: oriS oriV sopABC Km ^R araC pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999
ALO1469	MC1000/pALO284 (pALO284: ori (pSC101) Km ^R araC pBAD-GFP ^{mut2})	Lobner-Olesen, 1999

1.2. PLÁSMIDOS

pRB100 (*dnaAR281A*). Cedido por el Dr. Jon M. Kaguni. pRB100 es un plásmido de alto número de copias derivado de pBR322. *dnaAR281A* expresa una proteína DnaA mutante en la caja VII del dominio III de la proteína DnaA (Felczak y Kaguni, 2004).

pAM(*priA+*). Cedido por la Dra. Bénédicte Michel. El plásmido pAM(*priA+*) es un derivado de pBR322 que replica a partir de un origen de replicación condicional que sólo está activo en presencia de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosidasa) y lleva el alelo silvestre del gen *priA*. El gen *aadA* clonado en el plásmido confiere resistencia a la espectinomicina. La proteína PriA silvestre se expresa al inducir su expresión con IPTG 500μM (Gil y Bouche, 1991).

pCC6111 (pGB2 (*recA611*)). Cedido por la Dra. Martine Defais. pGB2 es un plásmido de bajo número de copias derivado de pSC101 que presenta resistencias a espectinomicina y estreptomycin (Churchward, 1984). El alelo *recA611* expresa la proteína RecA611 con inducción residual de la respuesta SOS y un 0,3% de la actividad recombinasa. La proteína RecA611 es dominante sobre RecA silvestre (Larminart *et al.*, 1992).

pCC6941 (pGB2 (*recA694*)). Cedido por la Dra. Martine Defais. pGB2 es un plásmido de bajo número de copias derivado de pSC101 que presenta resistencias a

Materiales

Espectinomicina y Estreptomycin (Churchward, 1984). El alelo *recA694* expresa la proteína RecA694 con inducción de la respuesta SOS similar a RecA silvestre y un 75% de la actividad recombinasa.

p7.7 (*recAS25P*): Cedido por el Dr. Takashi Hishida. Éste es un plásmido derivado de pT7-7 que contiene al promotor T7 y el alelo *recAS25P*. La proteína RecAS25P es funcional para las actividades proteasa y recombinasa, pero deficiente en la actividad estabilizadora de las horquillas de replicación asociada a RecA (Shibata *et al.*, 2005).

1.3. FAGO P1 *vir*

El fago P1 *vir* pertenece a la colección de este laboratorio. Este fago es incapaz de lisogenizar a la bacteria huésped y, por ello, se emplea frecuentemente para realizar intercambio genético por transducción generalizada. Permite construir estirpes y cartografiar genes que se encuentren a menos de 2 minutos en el cromosoma.

2. PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los productos químicos utilizados, salvo aquellos donde se indica su procedencia, se obtuvieron de la compañía Sigma Chemical. Las sales y los azúcares se obtuvieron de Panreac, los productos radiactivos fueron suministrados por ICN Radiochemicals y los compuestos fluorescentes, por Amersham.

2.1. DROGAS

- **Ácido nalidixico (Nal)**. Preparada a 100 mg/ml en NaOH 1M:agua (1:3) y conservada a -20°C. Se utilizó a diferentes concentraciones según el requerimiento experimental: 5, 10, 30, 50 µg/ml.
- **Cefalexina (Cpx)**. Preparada a 10 mg/ml en agua. Se utilizó a 50 µg/ml.
- **Cloranfenicol (Cm)**. Preparado a 5 mg/ml en etanol:agua (1:1) y conservado a -20°C. Se utilizó a 10 µg/ml.
- **Espectinomicina (Sp)**. Preparado a 50 mg/ml en agua y conservado a -20°C. Se utilizó a 25 µg/ml.
- **Estreptomycin (St)**. Preparado a 50 mg/ml en agua y conservado a -20°C. Se utilizó a 25 µg/ml.
- **Hidroxiurea (HU)**. Preparada a 1M en el mismo medio utilizado para el crecimiento del cultivo. Se utilizó a una concentración final de 100 mM.

- **Kanamicina (Km).** Preparada a 25 mg/ml en agua y conservada a -20°C . Se utilizó a 25 $\mu\text{g/ml}$.
- **Novobiocina (Nov).** Preparada a 100 mg/ml en agua. Se utilizó recién preparada a una concentración de a 1mg/ml.
- **Rifampicina (Rif).** Preparada a 50 mg/ml en metanol. Se utilizó recién preparada a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$.
- **Tetraciclina (Tc).** Preparada a 10 mg/ml en etanol:agua (1:1) y conservada a -20°C . Se utilizó a 10 $\mu\text{g/ml}$.

2.2. DESOXINUCLEÓTIDOS MARCADOS

- **Timidina-(metil- ^3H) ($^3\text{H-TdR}$).** Suministrada con una actividad específica de 20 Ci/mmol y a una concentración de 1mCi/ml en una solución de etanol:agua (7:3). Se utilizó a una actividad de 1 $\mu\text{Ci/ml}$.
- **Cy3-dUTP.** Se utilizaron 0,3 μl y 1,2 μl del *Value Pack* de Amersham (No. Cat. PA55322) para el marcaje de cada muestra de DNA genómico y cDNA en los experimentos de microarrays.
- **Cy5-dUTP.** Se utilizaron 0,3 μl y 1,2 μl del *Value Pack* de Amersham (No. Cat. PA55322) para el marcaje de cada muestra de DNA genómico y cDNA en los experimentos de microarrays.

3. SOLUCIONES Y TAMPONES

3.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

- **Solución EDTA-tritón-lisozima.** EDTA 100 mM (pH 8,0), Tritón X-100 0,1% (p/v) y lisozima 2 mg/ml (adicionada inmediatamente antes de usar) en agua destilada.
- **Solución PEG-NaCl.** PEG 8000 20% (p/v) y NaCl 1 M en tampón TE.
- **Solución Tris-sacarosa.** Tris HCl 50 mM (pH 8,0) y sacarosa 25% (p/v) en agua destilada.

- **Tampón TE.** Tris HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (pH 8,0) en agua destilada.
- **Mezcla de fenol.** Se preparó mezclando fenol:cloroformo:isoamil alcohol en la proporción 25:24:1 y 50 mg/100 ml de 8-hidroxiquinoleina. Esta mezcla se equilibró a pH 7,8 – 8,0 añadiendo Tris HCl 1M (pH 8,0) hasta alcanzar, tras agitar y permitir la separación de la fase orgánica y acuosa, el pH deseado en la fase acuosa. Esta solución se conservó en la oscuridad a 4°C.

3.2. ELECTROFORESIS DE DNA

3.2.1. Electroforesis convencional

- **Tampón TAE (50X).** Se añadieron 242 g de Tris Base a 57,1 ml de ácido acético y 100 ml de EDTA 0,5M hasta un volumen de un litro. El volumen final de la mezcla se ajustó a pH 8.0. Se utilizó diluido 1X.
- **Tampón TES.** Tris HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 5 mM (pH 8.0) y NaCl 50 mM en agua destilada ajustando el pH a 8.0.
- **Solución BBF (6X).** Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y sacarosa 40% (p/v) en agua destilada. Conservada a 4°C.
- **Solución de bromuro de etidio.** Preparado a 5 mg/ml en TES, se utilizó a 0,5 µg/ml. Se almacenó en oscuridad a 4°C
- **Gel de agarosa.** Se preparó al 0,8% (p/v) en tampón TAE 1X. La mezcla se fundió en el microondas y tras añadir bromuro de etidio (0,5 µg/ml) , se vertió en el molde del gel.

3.2.2. Electroforesis en campo pulsante

- **Tampón TEE.** Tris HCl 1 M (pH9), EDTA 0,5 M (pH8) y EGTA 0,1 M (pH 7,5) en agua destilada.
- **Tampón M9.** Se preparó mezclando 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,01 M, 10 ml de MgSO₄ 0,1 M y 880 ml de agua destilada, esterilizadas por separado y mezcladas en el momento de su utilización.

La solución salina M9 se preparó disolviendo 60 g de HNa_2PO_4 , 30 g de H_2KPO_4 , 5 g de NaCl y 10 g de NH_4Cl , en este orden, en un volumen final de agua destilada de 1000 ml (Miller, 1992). Se ajustó su pH a 7,2 y se esterilizó, dividida en volúmenes de 200 ml.

- **Soluciones para la lisis celular en bloques de agarosa. Solución I.** Lisozima 5 mg/ml y sarcosyl 0,5 mg/ml en tampón TEE.
- **Solución II.** Proteinasa K 1mg/ml y SDS 1%(p/v) en TEE.
- **Gel de agarosa.** Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) en tampón TAE 1X previamente filtrado. La mezcla se fundió en el microondas y posteriormente se vertió sobre el soporte para el gel de electroforesis de campo pulsante.
- **Mezcla de centelleo para muestras líquidas (geles).** Se disolvieron 7,5 g de PPO y 150 mg de POPOP, en este orden, en 1000 ml de tolueno y se mantuvo un mínimo de dos horas en agitación en la oscuridad y a 4°C. A continuación se añadieron 500 ml de Tritón X-100 a la mezcla y se almacenó en oscuridad y a 4°C.

3.3. MEDIDA DE LA SÍNTESIS DE DNA *in vivo*

- **Mezcla de centelleo para muestras sólidas (filtros).** Se disolvieron 4 g de PPO y 100 mg de POPOP, en este orden, en 1000 ml de tolueno en oscuridad y a 4°C, condiciones en las que se almacenó.

3.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

- **Tampón de tinción (TrisMg).** Se mezclaron Tris HCl 10 mM (pH 7,4) y MgCl_2 10 mM. La solución se pasó a través de filtros de 0,22 mm de diámetro de poro.
- **Solución de bromuro de etidio.** Se preparó a 400 mg/ml en tampón de tinción previamente filtrado. Se utilizó a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- **Solución de mitramicina.** Se preparó a 1 mg / ml en tampón de tinción previamente filtrado. Se utilizó a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- **Solución de tinción.** Solución de bromuro de etidio a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y solución de mitramicina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón de tinción. Se preparó justo antes de utilizarla.

3.5. MICROARRAYS DE DNA

- **DNA de esperma de salmón.** Suministrado por invitrogen a 10 mg/ml en H₂O libre de DNasas o RNasas. Se tomaron 0,75 µl (7,5 µg) por cada reacción de hibridación.
- **SSC 20X.** Se preparó añadiendo 175,3 g de NaCl y 88,22 g de Citrato Sódico a H₂O bidestilada hasta volumen de un litro. El pH de la solución se ajustó a 7.0 con HCl. En la reacción de hibridación se utilizó diluido como SSC 3X.
- **SDS 10%.** Se preparó añadiendo 10 g de sodio dodecil sulfato a 100 ml de agua estéril. Se incubó a 42°C hasta la disolución total del mismo.
- **H₂O bidestilada tratada con DEPC (Diethyl pirocarbonato).** Se añadió DEPC al agua bidestilada a una concentración del 0,1% (v/v), se dejó reposar toda la noche y se autoclavó al día siguiente para la destrucción del DEPC. Este H₂O se utilizó en todas las soluciones que requirieron ausencia de RNasas.

3.6. MICROSCOPIA

- **Preparación del portaobjetos.** Se utilizó agar al 1% en NaCl 0,9%. La solución se filtró a través filtros de 0,8 mm de diámetro de poro. A 1 ml de la solución fundida se añadió DAPI a una concentración de 0,5 µg/ml y se extendió en el portaobjetos, cubriéndolo con un cubreobjetos para obtener una superficie lisa donde disponer la muestra.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

- **Tampón Z.** Se añadió Na₂HPO₄ 60mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 40mM, MgSO₄ 1mM en agua destilada, ajustanda a pH 7,0. Se hirvió durante 5 minutos. Inmediatamente antes de ser utilizado, se añadió β-mercapto-etanol hasta una concentración de 50 mM.
- **ONPG.** Disuelto en tampón Z sin β-mercapto-etanol a 4 mg/ml y pH 7,0.

4. MEDIOS DE CRECIMIENTO

- **Medio mínimo M9.** Se preparó añadiendo 100 ml de la solución salina M9, 10ml de una solución de CaCl₂ 0,01 M, 10ml de MgSO₄ 0,1 M, 10 ml de una solución de los aminoácidos requeridos por la estirpe a 2 mg/ml y 10 ml de una solución de

tiamina a 0,2 mg/ml a 860 ml de agua destilada que contenían 4 g de glucosa. Todas las soluciones se esterilizan previamente por separado. Este medio se enriqueció en algunos casos con una solución de caseína hidrolizada (casaminoácidos) hasta una concentración del 0,1% (p/v) final.

- **Medio rico Luria-Bertani (LB).** Se disolvieron 10 g de bacto triptona (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid) y 10 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada, el pH de la solución se ajustó entre 7,2 y 7,4 y se autoclavó.
- **Medio rico LB TG.** Se preparó añadiendo glucosa al 0,1% final y Td-R a 5 mg/ml a 1000 ml de LB.

Estos medios se utilizaron para el crecimiento de las estirpes bacterianas tanto en líquido como en placa. Para solidificar los medios se añadieron 20 g de agar (Panreac) a 1000 ml del medio líquido antes de esterilizar.

- **Agar de cobertera.** Se añadieron 8 g de agar a 1000 ml de LB. Después de su esterilización se añadieron CaCl_2 a una concentración final de 5 mM, glucosa 0,1% final y Td-R a 5 $\mu\text{g/ml}$.
- **LA10.** Se preparó añadiendo 10 g de agar a 1000 ml de LB. Después de su esterilización se añadieron CaCl_2 a una concentración final de 5 mM, glucosa 0,1% final y Td-R a 5 $\mu\text{g/ml}$.

5. ENZIMAS

- **Lisozima.** Se utilizó en soluciones recién preparadas a 2 mg/ml, que se mantuvieron a 0°C hasta su uso.
- **RNasa II-A pancreática.** Se preparó a 2 mg/ml en Tris HCl 10 mM (pH 7,5). Se incubó 10 minutos a 90°C para eliminar las posibles DNasas. La solución se conservó a -20°C.
- **DNasa I.** Suministrada por QIAGEN (Nº Cat. 79254) como polvo liofilizado que contiene 1500 U que se disuelven en agua libre de RNasas.

Materiales

- **Fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I.** Suministrada por Promega a una concentración de 9 U/ μ l. Se utilizó 1 μ l (9 U) para cada reacción de marcaje de DNA genómico por extensión de cebadores al azar.
- **Superscript II .** Suministrada por de Gibco BRL (Nº Cat. 18064-071) a 200 U/ml. Se utilizaron 2 μ l (0,4 U) para cada reacción de retrotranscriptasa.

6. MARCADORES DE DNA

6.1. MARCADORES PARA ELECTROFORESIS CONVENCIONAL

- **Marcador λ HindIII.** Suministrado por Stratagene, presenta ocho fragmentos de DNA con un rango de tamaño entre los 125 pb y los 23,13 Kb.
- **Marcador Hi-Lo.** Suministrado por Bionexus. Presenta 16 fragmentos cuyo rango de tamaños se encuentra entre 50 pb y 10 kb.

6.2. MARCADORES PARA ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE

- **CHEF DNA size marker, *H. wingei*.** Suministrado por Bio-Rad, este marcador contiene cromosomas de *Hansenula wingei*, cuyo rango de tamaños se encuentra entre 1 y 3,1 Mb.

7. OLIGONUCLEÓTIDOS

- **Hexanucleótidos (pdN6).** Suministrados por GE Healthcare Life Sciences, se utilizaron para la reacción de marcaje de DNA con las sondas fluorescentes en los experimentos de microarrays.

8. KITS

- **Mini Kit RNeasy.** Suministrado por de Qiagen (Nº Cat. 74104), contiene 50 minicolumnas RNeasy, tubos para la recogida de muestras (1.5 ml and 2 ml), y reactivos y tampones libres de RNasa. Se utilizó para los aislamientos de DNA genómico en los experimentos de microarrays.

- **Kit QIAamp DNA Mini Kit.** Suministrado por Qiagen (Nº Cat. 51304), contiene 50 columnas QIAamp Mini Spin, Proteínasa K, reactivos, tampones y tubos de recolección de 2ml.

9. SECUENCIAS

Las secuencias utilizadas en este trabajo para el análisis evolutivo de orígenes de replicación y para la localización de sitios SIDD se listan en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de orígenes de replicación con el correspondiente número de acceso, la base de datos de la que han sido extraídas y la referencia de los nucleótidos analizados.

ORIGEN	Número de acceso	Base de datos (nucleótidos analizados)
<i>oriC (E. coli K-12)</i>	K01789	NCBI (Gille y Messer, 1991)
<i>oriC (Salmonella typhimurium)</i>	J01808.1	NCBI
<i>oriC (Shigella flexneri)</i>	X67659	NCBI
<i>oriC (Pectobacterium carotovorum)</i>	V00255	NCBI
<i>oriC (Klebsiella pneumoniae)</i>	J01744	NCBI
<i>oriC (Enterobacter aerogenes)</i>	J01576	NCBI
<i>oriS (F)</i>	NC_002483	NCBI (48136..48352)
<i>oriR-RepA (P1)</i>	NC_005856.1	NCBI (61771..62929)
<i>ori (pSC101)</i>	K00042	NCBI
<i>oriR1(R1)</i>		Proporcionada por el Dr. de la Cueva
<i>ori (ColE1)</i>	V00270.1	EMBL

Métodos

1. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

La conservación de las estirpes durante largos periodos de tiempo se llevó a cabo por congelación a -80°C de un cultivo líquido en glicerol al 40%. Este procedimiento permite que la estirpe permanezca viable durante más de 5 años.

Para la conservación de las estirpes durante periodos de tiempo de hasta 2 semanas y para permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas y purificadas, las estirpes se conservaron a 4°C en placas Petri con el medio sólido adecuado. Las estirpes que iban a ser utilizadas durante cada etapa del trabajo se obtuvieron por extensión de 10 a 20 μl del volumen conservado a -80°C sobre una placa de medio sólido. A partir de esta primera extensión se obtuvieron colonias aisladas a las que se les comprobaron sus características genéticas específicas. Mediante siembra por agotamiento de una colonia comprobada y correcta, se obtuvieron las colonias con las que se trabajó. Transcurridas unas dos semanas, las estirpes comprobadas que se conservaban en placa se traspasaban a placas con medio fresco.

2. CRECIMIENTO BACTERIANO: DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE GENERACIÓN

Al inocular con una colonia bacteriana un medio líquido adecuado para su crecimiento no todas las células comienzan a estar fisiológicamente activas a la vez. Con el fin de conseguir que todas las células de un cultivo estuvieran en la fase de crecimiento óptimo para la realización de los experimentos, se inoculó un volumen de 1 a 2 ml con una sola colonia de la estirpe con la que se iba a trabajar. Este cultivo se incubó durante una noche a la temperatura y en el medio en los que se iba a llevar a cabo el experimento, con o sin aireación, dependiendo de la estirpe y de las condiciones de crecimiento, de forma que se consiguieran cultivos turbios pero no en fase estacionaria avanzada. Los cultivos en fase exponencial se obtuvieron por dilución del cultivo nocturno en medio fresco, en la proporción adecuada para cada tipo de experimento, e incubación con aireación, en baños de agitación orbital, a la temperatura deseada.

El *crecimiento en masa* de un cultivo líquido se determinó por aumento de la absorbencia a 600 nm, excepto para el análisis de HIR en plásmidos (capítulo 4 de Resultados) que se determinó a 488nm, en un espectrofotómetro Spectronic 20 Génesis. Para realizar la medida se utilizaron tubos de 1 cm de paso de luz previamente precalentados a la temperatura de crecimiento del cultivo. El volumen utilizado para realizar la medida se devolvió al cultivo de donde se tomó.

El *tiempo de generación*, τ , se obtuvo representando una gráfica semilogarítmica los valores de absorbencia del cultivo bacteriano a lo largo del tiempo de crecimiento y determinando, a partir de esta representación, el tiempo de duplicación de la masa.

El *crecimiento en medio sólido* se requirió para la selección, comprobación o conservación de las estirpes. Las estirpes se sembraron por agotamiento, sobre el medio sólido adecuado, selectivo o no, en placas Petri y se incubaron en estufas, en posición invertida, a la temperatura deseada.

3. CAMBIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Todos los cambios de las condiciones de crecimiento, llevaran o no implícito un cambio de temperatura, se hicieron con todo el material precalentado a la temperatura posterior de crecimiento.

El *cambio de la temperatura de incubación* de un cultivo creciendo exponencialmente se realizó cuando alcanzó una densidad óptica entre 0,06 y 0,08 unidades de absorbencia medidas a 600 nm.

El *tratamiento con rifampicina* se llevó a cabo añadiendo la droga al cultivo creciendo exponencialmente cuando alcanzó una densidad óptica entre 0,06 y 0,08 unidades de absorbencia. Se utilizó a una concentración final de 150 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir posteriores inicios de replicación. Cuando se realizó el tratamiento simultáneo de cambio de la temperatura de incubación y adición de rifampicina, se procedió en primer lugar al cambio de temperatura e inmediatamente a la adición de rifampicina. El momento de la adición de la rifampicina fue el tiempo cero de este tratamiento.

El *tratamiento con ácido nalidixico o novobiocina* se realizó una hora antes de la adicción de rifampicina con o sin cambio de temperatura.

4. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO Y ANÁLISIS DE HIR

4.1. MARCAJE DEL DNA *in vivo*

El progreso de la síntesis de DNA se determinó mediante la cuantificación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) incorporada en el DNA a diferentes tiempos. La timidina trifosfato (TTP) es un nucleótido específico de la síntesis de DNA. Las células sintetizan este nucleótido a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) que es transformado en timidina monofosfato (TMP) por la enzima timidilato sintetasa, producto del gen *thyA*. Este monofosfato es fosforilado hasta trifosfato (TTP) para ser utilizado en la síntesis del DNA y su exceso es degradado por la timidilato kinasa (*tdk*) a timidina (TdR) y por la timidina fosforilasa (*tpp*) el nucleosido pasa a timina (T). Esta vía de degradación puede ser usada para la síntesis de TTP utilizando mutantes en el gen *thyA*. La adición de la base

o del nucleósido a una estirpe silvestre hace que la mayor parte sea degradada (O'Donovan, 1978).

Sin embargo, una bacteria Thy⁺ puede también usar la ruta degradativa para sintetizar TTP a partir de timina o timidina exógenas, pero sin los problemas de una posible limitación del nucleótido que presentan las bacterias Thy⁻. En este trabajo donde todas las estirpes utilizadas son Thy⁺, para conseguir el marcaje del DNA se añadió al medio de crecimiento uridina en concentraciones altas, 1,5 mM, que inhibe la timidina fosforilasa (*tpp*) y 1 µg/ml de TdR, por lo que la concentración de TdR en la célula fuerza su incorporación en el DNA a partir del nucleósido exógeno (Budman y Pardee, 1967; Beacham *et al.*, 1968; Pritchard, 1974).

Para llevar a cabo el marcaje de un cultivo creciendo en medio líquido, se diluyó un cultivo nocturno en el mismo medio de crecimiento que contenía uridina 1,5 mM, 1 µg/ml de TdR y 1 µCi/ml de ³H-TdR. La toma de muestras y todos los tratamientos de estos cultivos comenzaron tras un tiempo de incubación en este medio radiactivo no inferior a tres generaciones.

4.2. MEDIDA DE LA SÍNTESIS DE DNA Y ANÁLISIS DE HIR

Para cuantificar la incorporación de ³H-TdR en el DNA se tomaron alícuotas de 200 µl y se depositaron en tubos que contenían 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% a 0°C. Transcurridos no menos de 30 minutos, para permitir la precipitación del material insoluble en el ácido, el volumen de cada tubo se filtró a través de un filtro Wathman GF/C de fibra de vidrio, de 24 mm de diámetro de filtro, previamente humedecidos en agua destilada. A los filtros se les realizó un lavado se con TCA 5% y dos lavados con agua destilada. Los filtros se secaron a 100°C y posteriormente se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de la mezcla de centelleo (apartado 3 de Materiales). La medida de la cantidad de ³H-TdR incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS3801.

4.2.1. En crecimiento exponencial

El valor de la cantidad de radiactividad incorporada al DNA en las muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del crecimiento es equivalente a la cantidad de DNA presente en el cultivo.

4.2.2. Tras la inhibición de inicios de replicación

La inhibición del inicio de nuevos ciclos de replicación se llevó a cabo por la adición de rifampicina 150 µg/ml. En el momento del comienzo del tratamiento se tomaron varias muestras de 200 µl del cultivo que se precipitaron en TCA. Se continuó

con la toma de alícuotas y su precipitación a diferentes tiempos hasta, al menos, un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe.

La cantidad de DNA acumulada por el cultivo tras el inicio del tratamiento inhibitor se determinó por la relación de las dpm en las que se estabiliza la acumulación relativas a las dpm en el momento del inicio de la inhibición. Esta síntesis relativa de DNA, ΔG , está relacionada con el número medio de rondas de replicación por cromosoma en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente, n , por la expresión (Sueoka y Yoshikawa, 1965; Churchward *et al.*, 1981):

$$\Delta G = \frac{2^n n \ln 2}{2^n - 1} - 1$$

Según la ecuación anterior, y conocido el ΔG experimentalmente, se determinó n utilizando el programa de ordenador REPLICÓN v.10.3 (Jiménez-Sánchez y Guzmán, 1988).

4.2.3. Tras la inducción de inicios de replicación por estrés térmico: análisis de HIR

Para cuantificar la inducción térmica del inicio de replicación en un cultivo creciendo exponencialmente a 30°C, cuando el cultivo alcanzó una absorbencia entre 0,06 y 0,08, medida a 600 nm, se transfirió una alícuota a 41°C. Inmediatamente después al cambio de temperatura, se añadió rifampicina a 150 µg/ml y se tomaron varias muestras de 200 µl que se precipitaron en TCA. A continuación, se procedió de igual forma con la porción del cultivo que permaneció a 30°C. Se continuó con la toma de muestras y su precipitación hasta, al menos, un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe.

La cantidad de DNA acumulado por un cultivo tras inhibir las iniciaciones de nuevos ciclos de replicación está en función del número de orígenes por cromosoma que tiene el cultivo en el momento de iniciar el tratamiento inhibitor. La mayor acumulación de DNA por un cultivo tras el cambio de temperatura indica que se inducen inicios de replicación extras.

El porcentaje de orígenes que inician inducidos por el cambio de temperatura, i , se cuantificó a partir de los valores de acumulación de DNA tras la inhibición a 30°C y tras el cambio a 41°C. La determinación del número de rondas de replicación por cromosoma, n , a partir del ΔG en las condiciones de inducción de nuevos inicios daría una sobreestimación debido a que, si estas replications sintetizan cromosomas completos, se alcanzará una acumulación de DNA superior a la de una distribución

aleatoria de rondas de replicación en el cromosoma, como ocurre durante el crecimiento exponencial.

Si tras el tratamiento inductor de los inicios de las replications acíclicas en un porcentaje de orígenes, i , se inhiben las posteriores iniciaciones mediante rifampicina, el contenido final de DNA sintetizado será $2^{n(i+1)}$ y la cantidad de DNA aculada relativa a la inicial en el momento de la inhibición será por tanto:

$$\Delta G = \frac{2^n (i+1)n \ln 2}{2^n - 1} - 1 = \frac{2^n (i+1) - G}{G}$$

donde n se calcula a partir de los datos de acumulación tras la adición de rifampicina a baja temperatura e i , la proporción de orígenes donde se induce la iniciación, es la única variable desconocida. Para el cálculo de i se utilizó el programa de ordenador REPLICON v.10.3 (Jiménez-Sánchez y Guzmán, 1988).

5. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

Los aislamientos de DNA plasmídico se realizaron siguiendo el método PEG (Sambrook *et al.*, 1987). Las soluciones utilizadas en este aislamiento se describen en el apartado 3 de Materiales.

Inicialmente, se obtuvo un cultivo líquido denso de la estirpe portadora del plásmido en 250 ml de medio rico LB con el antibiótico apropiado a 30°C ó 37°C, según la temperatura óptima de crecimiento de la estirpe. El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y mediante aspiración se secó el sedimento bacteriano. Las células se resuspendieron en 20 ml de una solución de Tris-sacarosa y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 20 ml de una solución de EDTA-tritón-lisozima, uqe se mezcló con la suspensión celular por inversión suave del tubo. La mezcla resultante se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se incubó 20 minutos a 70°C. El lisado obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sedimento con restos celulares se eliminó con un palillo de dientes estéril y se procedió a la concentración del DNA del sobrenadante. Para ello se añadió un volumen igual de una solución de PEG-NaCl y se incubó a 4°C. Al día siguiente, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y, posteriormente, se eliminó el sobrenadante en su totalidad. Para finalizar, el sedimento se disolvió en 50 µl de TE con RNasa II-A a 20 µg/ml y se incubó 30 minutos a 37°C. La solución final de DNA se conservó a 4°C.

6. PURIFICACIÓN DE DNA

6.1. EXTRACCIÓN CON FENOL : CLOROFORMO

Tras el tratamiento de lisados celulares con enzimas proteolíticas, la eliminación de las proteínas de una solución de DNA se realizó por el procedimiento de extracción de la solución acuosa con una mezcla de fenol : cloroformo:alcohol isoamílico y posteriormente con cloroformo:alcohol isoamílico para eliminar los residuos de fenol de la preparación (soluciones descritas en el apartado 3 de Materiales).

A la solución de DNA se añadió un volumen igual de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, los componentes se mezclaron por agitación mecánica cuando las moléculas de DNA purificadas eran pequeñas (<10 Kpb) y mediante agitación suave cuando el DNA era de un tamaño mayor, hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0 °C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica y la interfase se volvieron a extraer en algunas ocasiones añadiendo un volumen igual de TE, para conseguir una mayor recuperación, y tras mezclarse y mantenerse 15 minutos a 0 °C, se separaron las fases por centrifugación como en el caso anterior y se recogió la fase acuosa que se unió al primer volumen recuperado. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase. A la solución acuosa final obtenida se añadió el mismo volumen de cloroformo : alcohol isoamílico, se mezclaron y se separaron las fases por centrifugación y finalmente se recuperó la fase acuosa que contenía el DNA en solución.

6.2. SISTEMA DE COLUMNAS MICROCON YM-30

Este sistema de columnas utiliza filtros de celulosa de 12,3 mm de diámetro y 0,32 cm² de área de filtración, permitiendo velocidades de centrifugación de 14.000 g. Este sistema se utiliza para purificar muestras en volúmenes pequeños de reacción (5-15 µl), con rendimientos de aproximadamente el 95%. En este trabajo se empleó para recuperar el DNA genómico o cDNA tras la reacción de marcaje con las sondas fluorescentes Cy3-dUTP o Cy5-dUTP.

7. ELECTROFORESIS DE DNA

7.1. ELECTROFORESIS CONVENCIONAL

La separación e identificación de moléculas de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue 0,8% (p/v). Las electroforesis se realizaron aplicando una intensidad de corriente constante, para evitar el sobrecalentamiento del tampón de electroforesis, que dependió del grado de resolución que se pretendía obtener. Para la preparación del gel y como tampón de electroforesis se utilizó TAE (apartado 3.3 de Materiales). Las electroforesis se realizaron en presencia del colorante fluorescente bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml incorporado en el gel, que, aunque reduce la movilidad del DNA, permite su visualización durante y al final de la electroforesis tras la iluminación del gel con luz ultravioleta de onda corta.

Las muestras a cargar en el gel se mezclaron previamente con 1:6 de volumen de una solución BBF 6X. Esta solución incrementa la densidad de la muestra facilitando y asegurando su entrada en los pocillos del gel. Simultáneamente, el BBF confiere color a la muestra y, ya que migra hacia el ánodo aproximadamente igual que un fragmento de DNA lineal de doble cadena de 300 pares de bases, permite inferir el recorrido de las muestras durante la electroforesis. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

7.2. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE

La electroforesis en campo pulsante (PFGE) es una técnica que permite separar moléculas de DNA de gran tamaño, mientras que la electroforesis convencional no permite la resolución de fragmentos de DNA mayores a 20.000 pares de bases. Con la PFGE, que alterna el campo eléctrico entre distintos pares de electrodos orientados espacialmente de forma diferente, fragmentos de DNA del orden de hasta 10 Mb son capaces de reorientarse y moverse de forma diferente según su tamaño y carga a través de los poros de un gel de agarosa.

7.2.1. Preparación y tratamiento de bloques de agarosa y DNA

Cultivos nocturnos de las células a analizar se diluyeron en medio fresco que contenía 5µg/ml de TdR, 5 µCi/ml de ³H-TdR y 1,5 mM de Uridina. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,1 unidades de absorbencia, se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a 3.500 rpm, durante 5 minutos a 4°C. El sedimento se lavó con 2 ml de tampón TM9 y posteriormente se resuspendió en 100 µl de TEE se mantuvo 10 minutos a 37°C. Estos 100 µl de suspensión celular se mezclaron con 100 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en TEE. De esta mezcla se prepararon dos bloques vertiendo la suspensión en moldes adecuados. Tras solidificar, los bloques fueron desmoldados, añadiéndose cada uno de ellos a un eppendorf que contenía 1 ml de la solución I de lisis. Los eppendorf se incubaron con agitación suave durante dos horas a 37°C. A

continuación se retiró la solución I, se añadió 1 ml de la solución II de lisis y los bloques de células se incubaron toda la noche a 56°C con agitación suave.

7.2.2. Electroforesis y procesamiento del gel

Cada bloque de células se cargó en un pocillo de un gel de agarosa al 1% en TAE y todos los pocillos se sellaron con agarosa al 1%. El equipo de electroforesis empleado fue el modelo "CHEF-DR II", de Bio-Rad. Las condiciones de migración utilizadas fueron: 500 seg de tiempo inicial, 500 seg de tiempo final, 110 V y 48 h de migración. El tampón de migración empleado fue TAE y éste se hacía pasar por un refrigerador a 7°C para mantener una baja temperatura durante las 48 h de migración.

Una vez finalizada la migración, se tiñó el gel con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para comprobar que el desplazamiento del DNA había sido correcto. A continuación cada calle del gel se cortó en porciones de 3 mm de largo. Cada porción se pasó a un eppendorf, se licuó adicionando 800 µl de HCl 0,1 N se incubó durante aproximadamente 45 min a 100°C. El volumen final se colocó en un vial con 10 ml de líquido de centelleo para muestras líquidas (apartado 3 de Materiales) y se midió la cantidad de radiactividad con un contador de centelleo Beckman LS 3801.

Los valores de radiactividad de las tres primeras porciones de cada calle del gel que corresponden al pocillo, al bloque de células y a los 3 mm de calle superiores e inferiores al pocillo, contienen el DNA no fragmentado o intacto. La suma de los valores de radiactividad del resto de los fragmentos corresponde a la cantidad de DNA fragmentado o lineal. Esta cantidad se hizo relativa a la cantidad de DNA total (no fragmentado + fragmentado) para determinar el porcentaje de DNA lineal en cada condición experimental (Fig. 11).

8. TRANSFORMACIÓN

8.1. ELECTROPORACIÓN

La eficiencia en la introducción del DNA dentro de una bacteria es un fenómeno de gran importancia práctica en biología molecular. La electroporación provee un método de transformación en *E. coli* con una eficiencia de 10 a 20 veces más alta que la obtenida con los mejores métodos químicos.

A partir de una dilución aproximada de 1:100 de un cultivo nocturno en LB de la estirpe a transformar, se obtuvo un cultivo entre 0,5 y 0,8 unidades de absorbencia creciéndolo con agitación vigorosa. En este momento, se incubó el cultivo durante 20 minutos a 0°C y luego se recogieron las células mediante centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de agua

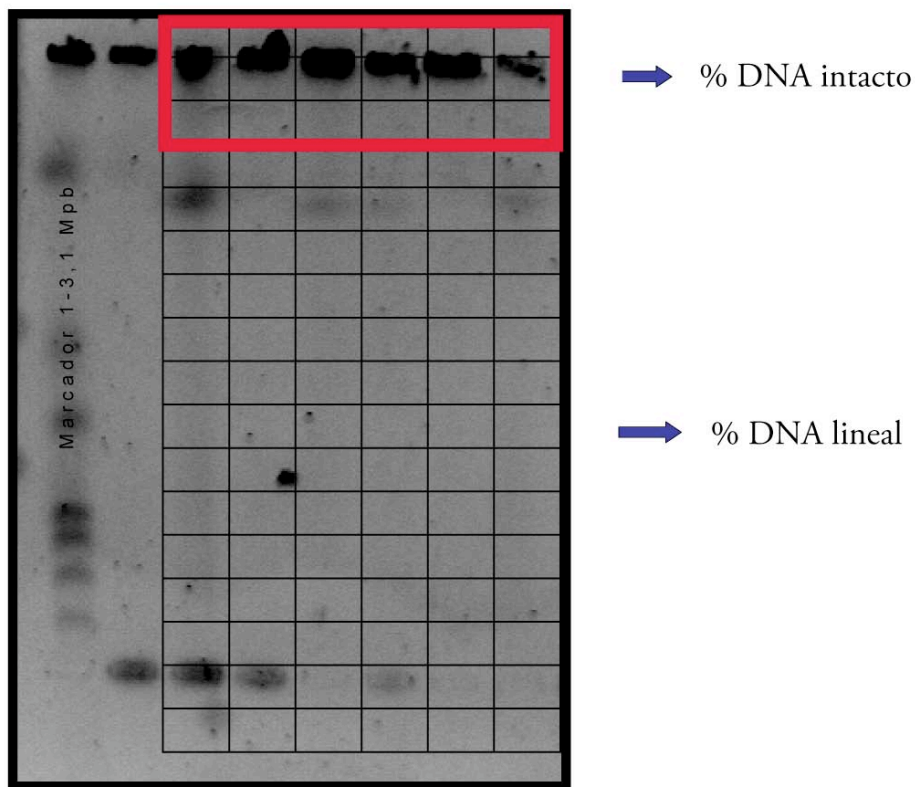


Figura 11. Electroforesis de campo pulsante (PFGE) para la cuantificación de DNA lineal.

milliQ a 0°C que del cultivo tomado inicialmente y volvieron a centrifugarse en las mismas condiciones para concentrarlas en la mitad del volumen de agua milliQ a 0°C. Se centrifugaron de nuevo y ahora el sedimento se concentró en 1/50 del volumen del cultivo inicial de glicerol al 10% en agua milliQ a 0°C. Las células volvieron a recogerse por centrifugación y se resuspendieron en un volumen final 1/150 del volumen de cultivo inicial en glicerol al 10%. La suspensión final contiene células electro-competentes, capaces de incorporar moléculas de DNA de diferente procedencia, a una concentración aproximada de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. Esta suspensión celular puede utilizarse inmediatamente o mantenerse durante aproximadamente seis meses a -80°C.

Una vez conseguidas las células electro-competentes, se mezclaron 40 μ l de la suspensión celular con 1 a 2 μ l de DNA disuelto en un tampón de baja fuerza iónica y la mezcla se mantuvo en hielo durante 1 minuto. Todo este proceso se realizó a 0°C. La mezcla de células y DNA se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación de 0,2 cm a 0°C que se colocó en la cámara de electroporación y se sometió a un pulso constante de 12,5 KV/cm, durante 4 ó 5 milisegundos, usando el electroporador Gene Pulser™ de Bio-Rad a 25 μ F, 2,5 KV y 200 Ω . Se sacó la cubeta de la cámara y se le

añadió inmediatamente 1 ml de LB, se resuspendieron las células con la ayuda de una pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo de cristal para su incubación a 30°C o 37°C, según la temperatura de crecimiento requerida para la estirpe, durante 1 o 2 horas con agitación suave. Esta incubación permite la expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico adquirida por las células transformadas. Finalmente, la selección de los transformantes se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo con el antibiótico apropiado e incubándolas de 16 a 48 horas a 30°C o 37°C hasta la aparición de colonias.

8.2. MÉTODO DEL CaCl₂

Alternativamente a la electroporación, para realizar transformaciones, se utilizó el tratamiento de células con soluciones de CaCl₂ a 0°C seguido por un breve calentamiento, induciendo de este modo el estado de competencia.

A partir de una dilución 1:50 de un cultivo nocturno en LB de la estirpe bacteriana a transformar se obtuvo un cultivo entre 0,3 y 0,4 unidades de absorbencia, tras un crecimiento con agitación vigorosa. Para cada transformación se tomaron 3 ml de cultivo, se mantuvieron 20 minutos a 0°C y se recogieron las células centrifugando a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Las células se resuspendieron en la mitad del volumen del cultivo inicial en una solución de CaCl₂ 50 mM y Tris HCl 10 mM (pH 8.0) a 0°C, se mantuvieron 20 minutos a 0°C y se recuperaron por centrifugación. El sedimento se concentró en 1/15 del volumen inicial de la misma solución de CaCl₂. El volumen obtenido se dividió en alícuotas de 0,2 ml que se pasaron a tubos de vidrio preenfriados a 0°C, donde se mantuvieron 2 horas. Tras este tratamiento se añadió a cada tubo el DNA plasmídico en el tampón en TE. La cantidad de DNA por transformación fue como máximo 40 ng disueltos en 100 µl. Las células y el DNA se mezclaron suavemente y se mantuvieron 30 minutos a 0°C. Posteriormente, la mezcla se transfirió durante 2 minutos a un baño de agua a 42°C y se mantuvo para provocar la entrada del DNA. Posteriormente, la mezcla se mantuvo durante unos minutos a 0°C.

La expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico, adquirida por las células transformadas, se permitió añadiendo 1 ml de LB a la suspensión celular e incubándola, con agitación, durante 1 ó 2 horas a 30°C ó 37°C. La selección de los transformantes se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo, con el antibiótico correspondiente, e incubándolas durante 16 a 48 horas a 30°C ó 37°C hasta la aparición de colonias.

9. TRANSDUCCIÓN

El fenotipo debido a una mutación puede variar según el fondo genético en el que se exprese, por esto es conveniente realizar los análisis de diferentes mutantes en

una misma estirpe parental cuando esto sea posible. Como en algunos casos las construcciones a analizar se encontraban en diferentes estirpes, era necesaria la transferencia de la mutación a la estirpe parental elegida para conseguir estirpes isogénicas, con la única diferencia de la mutación a analizar. El método empleado para lograrlo fue la transducción generalizada utilizando el bacteriófago P1 *vir*.

9.1. MULTIPLICACIÓN DE FAGOS

De un cultivo de la estirpe donadora en medio rico LBTG que contenía CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 100 mM, con densidad óptica de 0,8 unidades de absorbencia, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se infectaron con 10 μl de una suspensión de fagos de, aproximadamente, 10^9 fagos/ml. Tras un periodo de 15 minutos de preadsorción a 37°C se adicionaron 3 ml de agar de cobertera, precalentado a 45°C, a la mezcla y ésta se vertió en una placa de medio rico LA10 con glucosa. Las placas se incubaron durante 20 a 24 horas a la temperatura de crecimiento de la estirpe donadora, se recogió el agar de cobertera, se centrifugó a 10.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante, que contenía los fagos, y se conservó a 4°C con unas gotas de cloroformo.

Para la determinación del número de fagos en la suspensión obtenida, se realizó una dilución seriada de una alícuota de 100 μl en LBTG hasta obtener una suspensión de 1000 a 2000 fagos/ml. A partir de ella se tomó una alícuota de 0,1 ml que se añadió a un tubo que contenía 250 μl de un cultivo de la estirpe receptora, crecida en LBTG que contenía CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 100 mM antes de la infección con el fago. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos y, posteriormente, se sembró con agar de cobertera en placas de LA10. Las placas se incubaron de 20 a 24 horas a la temperatura apropiada y, posteriormente, se procedió al recuento de los halos de lisis.

9.2. TRANSDUCCIÓN

A un cultivo estacionario fresco de la estirpe receptora en medio rico LBTG con una densidad óptica aproximada de 0,8 unidades de absorbencia se le añadió CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 1 mM antes de la infección con el fago. Alícuotas de 900 μl de esta suspensión se infectaron con los fagos obtenidos a partir de la estirpe donadora con una multiplicidad de infección de 0,1. Transcurridos 30 minutos de preadsorción, las infecciones se interrumpieron por la adición de 5 ml de LBTG con citrato sódico 5mM. Tras incubar las bacterias 1 ó 2 horas con agitación y a la temperatura apropiada, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 μl de MgCl_2 0,01M y se sembraron en placas selectivas de NAT a las que se le habían añadido los antibióticos requeridos en cada caso. Las placas se

incubaron a la temperatura adecuada durante al menos 24 horas para obtener los transductantes que contenían la construcción deseada.

10. CITOMETRÍA DE FLUJO

Partiendo de una suspensión celular, la citometría de flujo permite medir simultáneamente la fluorescencia y la dispersión de luz de células individuales en un gran número y en un corto espacio de tiempo. De esta forma, pueden cuantificarse diferentes constituyentes celulares utilizando fluorocromos específicos para cada uno de ellos. Por otro lado, la dispersión de luz permite obtener información relativa al tamaño y la forma de la célula.

En el citómetro de flujo las células son transportadas por un flujo laminar de agua a través de un haz de luz de la longitud de onda adecuada para excitar el colorante empleado. Tanto la emisión del fluorocromo como la luz dispersada son enviadas por medio de un sistema de lentes a fotomultiplicadores que transforman los pulsos de luz en impulsos eléctricos que finalmente son procesados por un ordenador.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un citómetro Bryte HS, de Bio-Rad. Este instrumento se caracteriza por emplear lámparas de Xe o Xe/Hg, de modo que utilizando bloques de filtros intercambiables puede seleccionarse la longitud de onda de excitación, así como la que se desea registrar en los tubos fotomultiplicadores. En este trabajo se ha empleado una lámpara de Xe.

10.1. FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS

Se analizaron muestras de cultivos tratados con rifampicina y cefalexina durante 4 horas a 30°C o tras el cambio de temperatura a 41°C. De este modo, las bacterias completan las replicaciones que tienen en marcha en el momento del comienzo del tratamiento dando lugar a cromosomas completos, por el efecto de la rifampicina, y no se dividen debido a la acción de la cefalexina. El número final de cromosomas por célula dependerá de las rondas de replicación que estén iniciadas en el momento del tratamiento inhibitorio.

Para fijar las células, se añadieron alicuotas de 0,4 ml de cultivo crecido en medio mínimo M9 a 7 ml de una solución de etanol al 74% mantenida a 4°C. Las células fijadas pueden ser almacenadas hasta 4 meses a 4°C para su análisis posterior.

10.2. TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la tinción de las células fijadas se empleó una mezcla de mitramicina y bromuro de etidio. La mitramicina se une al DNA de modo específico mientras que el

bromuro de etidio se une tanto al DNA como al RNA. Dado que la tinción con mitramicina no permite obtener una señal detectable por el citómetro de flujo, se hace uso del solapamiento de los espectros de emisión de la mitramicina y de absorción del bromuro de etidio para cuantificar el contenido de DNA por célula. La longitud de onda de excitación empleada es la de la mitramicina, mientras que, a esta longitud de onda, la excitación del bromuro de etidio es prácticamente nula. La luz emitida por la mitramicina excita al bromuro de etidio y la longitud de onda de emisión detectada es la del bromuro de etidio. Así, puede cuantificarse exclusivamente la cantidad de DNA por célula, siendo despreciable la fluorescencia correspondiente al bromuro de etidio unido al RNA.

Para la preparación de muestras, se tomaron 1,5 ml del cultivo fijado y, tras precipitar las células por centrifugación. El sedimento de células se lavó con 1 ml del tampón de tinción y posteriormente se resuspendió en 70µl del tampón Tris-Mg. A este volumen se añadió igual volumen de la solución de tinción (apartado 3.5 de Materiales). La mezcla se mantuvo un mínimo de 30 minutos a 4°C en oscuridad antes de ser analizada.

Dado que el tamaño medio de una célula de *E. coli* es de aproximadamente 1µm, tanto las soluciones de tinción como el agua empleada para la obtención del flujo laminar, se filtraron usando membranas con poros de 0,22 µm de diámetro (Millipore Millex G-V). De este modo se consigue aumentar la relación señal / ruido detectada por los fotomultiplicadores.

10.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para calibrar el instrumento se utilizaron esferas fluorescentes de 2µm de diámetro suministradas por Bio-Rad y se dispusieron los objetivos y el cono de inyección de la muestra de modo que el coeficiente de variación fuese inferior a 1,5 y el valor medio de la señal correspondiente a las esferas alcanzara el canal 100 (la intensidad máxima corresponde al canal 256).

Finalmente se analizaron las muestras teñidas en el citómetro ajustando el flujo de modo que se computaran entre 500 y 1000 células por segundo. Se examinaron unas 20.000 células de cada muestra.

11. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE Y EPIFLUORESCENCIA

El contraste de fase de la microscopia óptica permite la visualización de las células bacterianas gracias a la opacidad que ofrecen las bacterias al ser irradiadas con un haz de luz visible. La microscopía de fluorescencia permite la observación al microscopio de un componente celular marcado por un fluoróforo. En este trabajo el

componente celular observado fue el DNA y como fluoróforo se empleó el DAPI, que se une mayoritariamente al DNA.

11.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las bacterias fueron fijadas siguiendo el mismo protocolo que el descrito para las muestras de citometría en el apartado 10.1 de Métodos. Para el análisis de las muestras fijadas se procedió, en primer lugar, a su rehidratación. El protocolo de rehidratación consistió en la centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C de una alícuota de las células fijadas. El sedimento de células se resuspendió en 20 µl de TrisMg. De este volumen final se tomaron de 2-10 µl para su tinción con DAPI.

La tinción de las células se realizó sobre portaobjetos de microscopía sobre los cuales se crearon microplacas de agar que contenía el DAPI (apartado 3.6 de Materiales). La microplaca de agar al 1% se preparó añadiendo 0,5 µg/ml de DAPI a una solución fundida del 1% de agar preparado en NaCl al 0,9%. La solución de agar había sido previamente filtrada utilizando filtros de 0,8 µm de tamaño de poro. La mezcla agar-DAPI se vertió sobre un portaobjetos y en su superficie se colocó un cubreobjetos de 15x15 mm y el agar se dejó solidificar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se retiró el portaobjetos y se secó la microplaca a 42°C durante 5-10 minutos. La suspensión celular se añadió a la superficie plana creada en la microplaca de agar. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en oscuridad para evitar la excitación del DAPI.

11.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio Nikon modelo Eclipse E600. Este microscopio incluye una lámpara de alta presión de Mercurio Nikon modelo HB-10104 F que emite un haz de luz ultravioleta. La captura de imágenes se realizó con una cámara digital Hamamatsu modelo C4742-95-10NR que las envía a un ordenador. Las imágenes fueron capturadas por el programa IpLab para Macintosh (BD Bioscience Biomage).

12. MICROARRAYS

Los microarrays de DNA están constituidos por un conjunto de secuencias de DNA inmovilizadas en sustratos sólidos. Los microarrays de DNA constituyen en la práctica una

extensión de los métodos de hibridación de DNA que se han utilizado durante décadas para la cuantificación de ácidos nucleicos en muestras biológicas.

12.1. MICROARRAYS DE DNA GENÓMICO PARA EL ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL DNA

En este trabajo, los microarrays de DNA genómico fueron utilizados para el mapeo del origen de replicación de las replications termoinducidas en presencia de ácido nalidixico (Capítulo 2 de Resultados). Para medir la frecuencia de marcadores génicos mediante el uso de microarrays de DNA genómico se siguió el método descrito por Khodursky y col. (Fig. 12; Khodursky *et al.*, 2000). Este tipo de microarrays combina dos muestras de DNA marcadas, cada una con un colorante fluorescente diferente, que se hibridan sobre un microarray con DNA impreso de concentración fija. Una de las muestras presenta una dosis génica conocida y se denomina muestra control. La otra muestra, con número de copias de cada gen desconocida se denomina muestra problema. A lo largo de este trabajo, las muestras problemas se marcaron con la sonda fluorescente Cy5-dUTP (roja) y la muestra control con la sonda fluorescente Cy3-dUTP (verde). Con el objeto de facilitar la posterior normalización de los dos canales se utilizó la misma cantidad de DNA de partida de cada una de las muestras. La intensidad resultante de la hibridación de ambas sondas dará una medida del número de copias de cada gen, de tal forma que, a nuestra vista, mostrará rojo si existen más copias del gen en la muestra problema; verde, si el número de copias es menor en la muestra problema; y amarillo, si el gen presenta el mismo número de copia en una y otra muestra.

12.1.1. Impresión de microarrays

Se utilizaron como soporte portaobjetos de microscopía previamente cubiertos por polylysina. Sobre estos portaobjetos se imprimieron 4115 de los 4290 marcos de lectura abierta (ORFs) más algunas regiones intergénicas descritas en el genoma de *E. coli*. Los fragmentos de DNA usados forman parte de una colección de productos de PCR amplificados usando pares de primers de Sigma-Genosys. El protocolo para la impresión está descrito en <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>.

12.1.2. Toma de muestras

Para la obtención de las muestras problema, los cultivos se crecieron en medio mínimo M9 hasta densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,06 unidades de absorción. A esta densidad, se añadieron al cultivo 10 µg/ml de ácido nalidixico. Una hora más tarde, cuando el cultivo alcanzó aproximadamente 0,1 unidades de absorbencia, se añadió rifampicina 150 µg/ml para inhibir nuevas rondas de replicación;

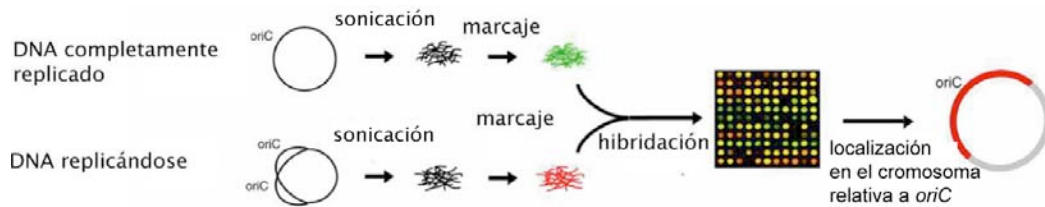


Figura 12. Microarrays de DNA genómico para estudios de replicación.

en este momento parte del cultivo se mantuvo a 30°C y otra parte se pasó a 41°C. Tras 1h de incubación en presencia de rifampicina, los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células se lavó con tampón TE. En este paso, el sedimento de células puede ser almacenado a -80°C para aislar posteriormente el DNA o puede procederse directamente.

Para la muestra control, se utilizaron cultivos a los que se trató con rifampicina 150 µg/ml al final de la fase exponencial. Las muestras control se tomaron 4h tras el tratamiento con rifampicina, tiempo suficiente para que las replications en marcha hubiesen terminado y la frecuencia de todos los genes fuese de 1 copia/cromosoma.

12.1.3. Preparación de DNA genómico

Para la preparación de muestras de DNA genómico se utilizó el Minikit de Qiagen QIAamp® (N. 51304) siguiendo el protocolo descrito para bacterias por el fabricante. El protocolo comienza con un tratamiento con Proteinasa K, proporcionada en el kit durante una hora a 56°C. El procedimiento posterior sigue con un tratamiento con 10 µl de RNasa A a 100µg/ml durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de lisis con detergentes a 70°C durante 30 minutos. Las muestras lisadas se precipitación en EtOH. El precipitado se purificó utilizando las columnas del kit, resuspendiéndose en volúmenes finales de 150 µl.

El DNA obtenido se sometió a sonicación con un Microtip Probe Sonicator (Fisher Scientific) para su posterior hibridación con el DNA impreso. El protocolo de sonicación de las muestras fue de 6 ciclos de pulsos de 10 seg con intervalos de 30 seg entre ellos, para evitar que el DNA se caliente excesivamente. La amplitud del sonicador fue del 20%. El tamaño final del DNA sonicado fue de entre 500 y 1000 pb.

En experimentos de cuantificación de dosis génicas es fundamental conocer la cantidad de DNA de partida previa a la hibridación en el microarray. Las soluciones de DNA se cuantificaron considerando absorción espectrofotométrica de la muestra, antes y tras la sonicación. Las medidas de absorción a 260 nm se realizaron en un

espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer). Se halló la pureza de la muestra a partir de la relación entre la absorción a 260 nm y la detectada a 280 nm. La concentración del DNA tras la sonicación debe ser superior a 500 ng/ μ l.

12.1.4. Marcaje de DNA genómico

El marcaje de DNA se realizó mediante un marcaje aleatorio con hexanucleótidos pdN6 utilizando la actividad enzimática del fragmento Klenow de la Polimerasa I de DNA. La reacción debe contener un mínimo de 500 ng/ml de DNA y el volumen máximo de DNA no debe superar 9 μ l.

El primer paso consistió en el emparejamiento del DNA sonicado con 0,5 μ l de pdN6 preparados a 20 μ g/ μ l. A continuación se desnaturizó el DNA durante 10 minutos a 95-100°C. Tras una breve centrifugación de 15 segundos, se añadió a la mezcla el resto de componentes de la reacción de marcaje: 1,5 μ l de tampón 10x, 0,75 μ l de la mezcla de dNTP preparada 20X, 0,3 μ l de cada una de las sondas dUTP-Cy5 ó dUTP-Cy3 a 0,2 mM y 1 μ l (9U) de la enzima Klenow. El volumen de reacción de marcaje fue de aproximadamente 30 μ l. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C.

Tras la reacción de marcaje se procedió a la purificación del DNA marcado utilizando las columnas Microcon Y-30. Se depositaron los 30 μ l de la reacción de marcaje en la columna y el volumen final se llevó a 450 μ l por adición de H₂O destilada. Las columnas se centrifugaron a 13200 rpm durante 9 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizaron dos lavados con 450 μ l de H₂O destilada tras los cuales, se invirtió la columna para recuperar el DNA marcado. El volumen recuperado fue de 5-10 μ l que se mantuvo a 4°C y en oscuridad hasta la reacción de hibridación.

12.1.5. Hibridación, lavado y secado de microarrays

La reacción de hibridación se llevó a cabo en un volumen de muestra no superior a 14 μ l. En primer lugar, se mezclaron las dos muestras de DNA marcados con Cy3-dUTP y Cy5-dUTP. Es importante asegurar que las muestras estén bien mezcladas. A esta mezcla inicial se le añadieron 2 μ l de SSC 20X, 2 μ l de DNA de esperma de salmón y 0,75 μ l de SDS 5%, justo antes del paso de desnaturalización. El DNA se desnaturizó mediante la incubación de la mezcla a 95-100°C durante 2 minutos. Tras la desnaturalización las muestras se mantuvieron en hielo durante varios minutos.

Los portaobjetos con el DNA impreso se colocaron en cámaras de hibridación libres de polvo. La muestra se colocó en la parte central de la zona impresa, que posteriormente se cubrió con un cubreobjetos. Para mantener la humedad en la cámara de hibridación se depositaron 3 μ l de SSC 10X en los extremos del portaobjetos y se selló la cámara. La cámara de hibridación, mantenida siempre en posición horizontal, se transfirió a un baño a 65°C durante 5 a 6 h.

Tras la incubación se procedió a los lavados del microarray. El primer lavado se realizó por inmersión del microarray 20 a 30 veces en un cubeta que contenía 330 ml de H₂O destilada, 20 ml de SSC 20X y 1 ml de SDS 10%. El segundo lavado se llevó a cabo por inmersión en otra cubeta de cristal que contenía 350 ml de H₂O destilada y 1 ml de SSC 20X. Por último, el microarray se sumergió en una tercera cubeta con 350 ml de H₂O destilada y 0,5 ml de SSC 20X. Tras los tres lavados, se procedió al secado los microarrays que se centrifugaron a 500 rpm durante 3 min a temperatura ambiente.

12.1.6. Escaneado, captura de imágenes y análisis de los datos

Las imágenes de 16-bits fueron obtenidas usando el escáner AxonScanner GENEPIX 1.0 de Axon Instruments. Posteriormente se obtuvieron las medidas de las intensidades de fluorescencia de los canales F635 y F532 para cada uno de los fragmentos impresos en el microarray. Con estos datos, el programa GenePix genera un archivo con la extensión *.gpr* que puede ser abierto con el programa Excel de Microsoft. De este archivo se seleccionaron las columnas correspondientes a las medianas de los canales F635 y F532 junto a las coordenadas que representan la posición de dicho fragmento en el microarray. Las medianas de fluorescencia fueron normalizadas frente a las medianas de todas las intensidades del canal. Las medianas normalizadas fueron transformadas a base logarítmica. La relación de fluorescencia se obtuvo de la diferencia de fluorescencia de los canales F532-F635. Estos datos finales se normalizaron considerando como valor 1.0 las medias de las relaciones de las 100 ORFs que rodean a *terB*. Los datos obtenidos se representaron considerando su posición en el cromosoma de *E. coli*, asignando la posición 0 a *oriC*. Para la representación de las posiciones se consideraron las coordenadas proporcionadas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para el genoma de *Escherichia coli* K-12. Una vez representados los datos, se calculó la media móvil de cada 20 ORFs adyacentes en el cromosoma. Diferentes medias móviles no afectaron al patrón final de replicación obtenido. Para la realización de estos cálculos se utilizó el paquete Excel de Microsoft.

12.2. MICROARRAYS DE cDNA

En este trabajo se han utilizado microarrays de cDNA para cuantificar cambios en la expresión génica en condiciones de estrés térmico y tras tratamiento con ácido nalidixico. Para la realización de los mismos se siguieron las indicaciones propuestas por Peter y col (Peter *et al.*, 2004). De manera análoga a los microarrays de DNA genómico, se compararon dos muestras, una muestra problema y una muestra control, que se tiñeron con las sondas fluorescentes Cy5-dUTP y Cy3-dUTP respectivamente. En este tipo de experimentos, la aproximación fue diferente a la de los estudios de replicación. Se consideró como control el cDNA obtenido de una situación inicial de cultivo y como problema, el cDNA correspondiente a la muestra obtenida tras el tratamiento. La

relación de la intensidad de ambas sondas (F532/F635) resultó en la expresión diferencial de la muestra tratada respecto a la muestra control. En este caso, el rojo indicó sobre expresión, el amarillo que representó ausencia de cambio en la expresión y el verde, represión de la expresión del gen.

12.2.1. Impresión de microarrays

La impresión de microarrays para estudios de expresión se realizó como se detalla en el apartado 12.1.1.

12.2.2. Toma de muestras

La toma de muestras se realizó a partir de cultivos creciendo exponencialmente en LB. Para las medidas de expresión tras estrés térmico, parte de un cultivo crecido a 30°C, a densidad óptica de aproximadamente 0,06 a 0,08, se transfirió a 41°C. Tras 20 minutos desde el cambio a 41°C, se inhibió la transcripción en ambos cultivos por adición de una mezcla de Etanol : Fenol (95 : 5). Para las medidas de expresión tras tratamiento con ácido nalidixico y estrés térmico, se añadió ácido nalidixico a 10 µg/ml a un cultivo creciendo exponencialmente a 30°C a de densidad óptica aproximada de 0,06. Tras una hora de crecimiento en presencia de ácido nalidixico, parte del cultivo se transfirió a 41°C. 20 minutos tras el cambio de temperatura, se detuvo la transcripción de los cultivos por adición de una mezcla de Etanol : Fenol (95 : 5).

12.2.3. Preparación de RNA

Los cultivos obtenidos tras la parada de la transcripción se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células obtenido se trató con lisozima a 400 µg/ml disuelta en tampón TE durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la extracción de RNA se utilizó el Minikit de Qiagen RNeasy ® (N. 74104) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las muestras se trataron con DNasa I libre de RNasa siguiendo también las instrucciones del fabricante para aislamiento de RNA de bacterias Gram negativas.

El RNA obtenido se visualizó mediante electroforesis (apartado 3.1 de Métodos) para comprobar que el RNA no se ha degradado durante el proceso de extracción.

Para cuantificar la concentración de RNA presente en la muestra se cuantificó la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer). Se halló la pureza de la muestra a partir de la relación entre la absorción a 260 nm y la detectada a

280 nm. En aquellos casos donde la relación 260/280 fue inferior a 2, se desechó la muestra al considerarse contaminada por fenoles o proteínas.

12.2.4. Obtención y marcaje de cDNA

La obtención de cDNA para la hibridación se llevó a cabo en una reacción secuencial que incluye dos pasos: de emparejamiento y de síntesis y marcaje del cDNA. Para la reacción de emparejamiento, se mezclaron en un eppendorf entre 16-25 µg/ml de la preparación RNA total con 10 µg de hexanucleóticos dpN6. El volumen se llevó a un volumen final de 14.8 µl con agua destilada tratada con DEPC (apartado 3.5 de Materiales). La mezcla resultante se mantuvo en un baño con agua sin agitación durante 10 minutos a 70°C, pasándose posteriormente a hielo durante otros 10 minutos. Las reacciones de síntesis y de marcaje del cDNA se realizaron simultáneamente. A cada mezcla de RNA/pdN6 se añadieron 3 µl de dNTP, 6 µl de tampón 5X, 3 µl de DTT, 1,2 µl de 1 mM sonda Cy3-dUTP o Cy5-dUTP y 2 µl de la enzima SuperScriptII. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los eppendorf se incubaron durante 1h 50 minutos a 42°C. El cDNA obtenido se purificó utilizando columnas Microcón YM-30 como se detalla en el apartado 12.1.4 de Métodos.

12.2.5. Hibridación, lavado y secado de microarrays

El procedimiento seguido fue idéntico al descrito para los microarrays de DNA genómico en el apartado 12.1.5. de Métodos.

12.2.6. Escaneado, captura de imágenes y análisis de los datos

El proceso de escaneado y de obtención de imágenes y datos fue idéntico al descrito para los microarrays de DNA genómico en el apartado 12.1.6 de Métodos.

Para el análisis de los datos de expresión génica se utilizó el programa Prep (García de la Nava et al., 2003), disponible en la web <http://chirimoyo.ac.uma.es/bitlab/services/PreP/index.htm>). Este programa aplica el algoritmo Lowess a los datos de fluorescencia obtenidos por el programa GenePix. La aplicación de este algoritmo elimina el posible ruido presente en los datos. Los datos obtenidos tras el análisis con Prep, se transfirieron a Excell y se calcularon las puntuaciones-Z para cada uno de las ORF analizadas. A partir de las puntuaciones-Z y, asumiendo una distribución normal de los datos, se calculó el valor-p para cada una de las ORF. Se consideró que la expresión de un gen estuvo afectada por el tratamiento cuando el valor-p fue menor de 0,05.

13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

La actividad enzimática de la β -galactosidasa es la hidrólisis de β -galactósidos y puede ser fácilmente cuantificada utilizando sustratos cromogénicos. En el ensayo utilizado se ha usado como sustrato o-nitrofenil- β -galactósido (ONPG), un compuesto sin color que en presencia de la β -galactosidasa es hidrolizado obteniéndose galactosa y o-nitrofenol. El o-nitrofenol es de color amarillo y su concentración puede ser determinada por absorción a 420 nm. En condiciones de exceso de cantidad de ONPG, la cantidad de o-nitrofenol producida es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo en el que se desarrolla la reacción.

La determinación de la actividad β -galactosidásica se llevó a cabo siguiendo un ensayo modificado del descrito por Miller (Miller, 1992). La cuantificación precisa de su actividad se obtuvo realizando el ensayo con cultivos creciendo exponencialmente. Se comenzó el ensayo a densidades ópticas comprendidas entre 0,06 y 0,08. El crecimiento del cultivo se siguió midiendo su absorbencia a 600 nm.

Se tomaron alícuotas de 0,5 ml que se añadieron a tubos a 0°C que contenían 600 μ l de tampón Z (apartado 3.7 de Materiales), 100 μ l de cloroformo y 50 μ l de SDS al 0,1% y se agitaron mecánicamente durante 10 segundos. Estos tubos se mantuvieron a 0°C, hasta terminar la toma de muestras, antes de llevar a cabo la reacción.

Los tubos se incubaron de 5 a 10 min. a 28°C, temperatura a la que se realizó la reacción. La reacción comenzó tras la adición a cada tubo de 0,3 ml de una solución de ONPG a 4 mg/ml en tampón Z, y agitarlo unos segundos. Se registró el tiempo durante el que se desarrolló la reacción. La reacción se detuvo cuando se había desarrollado suficiente color amarillo para ser cuantificado, añadiendo 0,8 ml de Na_2CO_3 1M que aumentó el pH hasta 11.

Se determinó la absorción a 420 nm y a 550 nm de cada tubo de reacción. La densidad óptica a 420 nm es la combinación de la absorción del o-nitrofenol y la dispersión de la luz por los restos celulares. Este último componente se corrigió con la medida de la absorción a 550 nm, longitud de onda a la que no absorbe el o-nitrofenol, que es proporcional en nuestras condiciones experimentales a la dispersión de luz a 420nm usando como factor de corrección el valor 1,5.

Las unidades de actividad de la enzima β -galactosidasa se calcularon aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times \frac{DO_{420} - 1,5 \times DO_{550}}{T(\text{min}) \times V(\text{ml}) \times DO_{600}}$$

14. CUANTIFICACIÓN DE LA REPLICACIÓN EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA

La proteína de fluorescencia verde (GFP) de *Aequorea victoria* ha sido ampliamente utilizada en biología molecular desde su clonación al constituir un método no invasivo y que permite análisis *in vivo* (Prasher *et al.*, 1992). La fluorescencia de GFP es atribuida a un cromóforo que se forma mediante una reacción de ciclación postraduccional, con la consecuente oxidación de tres aminoácidos presentes en la proteína y así emite luz (Prasher *et al.*, 1992; Cody *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1994). La formación del cromóforo es un proceso de primer orden que presenta múltiples pasos que se corresponden con una fase de retardo anterior a la emisión de luz por el fluoróforo (Heim *et al.*, 1994). Se han desarrollado variantes de GFP que mejoran la reacción de plegamiento o disminuyen la vida media de esta proteína que es extremadamente estable (Cormack *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998).

En este trabajo se ha analizado la fluorescencia emitida por plásmidos que contienen la construcción pBAD-*gfpmut2* (Loebner-Olesen, 1999).

14.1. MEDIDA DEL NÚMERO DE COPIAS EN CULTIVO EXPONENCIAL

Las bacterias portadoras de los plásmidos se crecieron en medio mínimo M9 con casaminoácidos (0,1%) a 30°C, en presencia de arabinosa al 0,2% y con glicerol al 0,4% como fuente de carbono. Se utilizó arabinosa al 0,2% para la inducción de GFP $mut2$ al ser esta concentración considerada la óptima para el promotor BAD p (Canghai *et al.*, 2004). Tras el cambio de temperatura se tomaron alicuotas de 2 ml a lo largo del tiempo del cultivo a 41°C y de la fracción de cultivo que permaneció a 30°C. Todas las muestras fueron diluidas hasta densidades ópticas de 0,1 en medio de cultivo fresco.

Para las medidas de fluorescencia se utilizó un fluorímetro Perkin-Elmer 650-40. La longitud de onda de excitación utilizada fue 488 nm y se registró la emisión a 515 nm. A todas las medidas de fluorescencia se les aplicó una corrección del efecto de filtro interno. Este efecto es provocado por la absorción del cultivo y, a consecuencia del mismo, el valor de la medida es aproximadamente un 10% inferior al real. Para la corrección de dicho efecto a cada una de las fluorescencias registradas se les aplicó la fórmula descrita por Lakowicz (Lakowicz, 1998):

$$F_{\text{corregida}} = F_{\text{observada}} \times 10^{(DO_{488}/2)}$$

Los valores de fluorescencia corregidos (FL*) se representaron frente al correspondiente valor de densidad óptica medida a 488 nm a lo largo del crecimiento a 30°C. A partir de la recta de regresión obtenida de estos datos, se estimó el valor de FL* emitido a densidad óptica 0,1 para cada cultivo. Para el cálculo del número relativo de copias de plásmido los valores de FL* se hicieron relativos al de menor FL* de las

obtenidas.

14.2. MEDIDA DE LA INDUCCIÓN DE LA REPLICACIÓN EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS TRAS ESTRÉS TÉRMICO

En este estudio se ha analizado la de la replicación termoinducida en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico las bacterias portadoras de los plásmidos se crecieron en medio mínimo M9 a 30°C, en presencia de arabinosa al 0,2% y con glicerol al 0,4% como fuente de carbono. A densidades ópticas comprendidas entre 0,06 y 0,08 unidades de absorbancia medidas a 488nm, parte del cultivo se transfirió a 41°C. Se tomaron los valores de fluorescencia emitidas por muestras de los cultivos a lo largo del crecimiento exponencial a 30°C y tras el cambio a 41°C. Estos valores, una vez corregido el efecto de filtro interno como se ha descrito en el apartado anterior, se hicieron relativos a la densidad óptica del cultivo medida a 488nm. Los valores FL*/DO se representaron frente al tiempo de toma de muestras obteniendo la evolución de esta relación a lo largo del cultivo bacteriano a 30°C y tras el cambio de temperatura. La inducción de la replicación obtenida a 41°C respecto a 30°C se calculó a partir del valor de FL/OD* final obtenido a 41°C respecto al valor obtenido a 30°C, una vez que los valores FL*/DO estaban estabilizados.

15. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE DNA

Las secuencias utilizadas para la comparación de orígenes de replicación en Enterobacterias se listan en la Tabla 6. El programa utilizado para la comparación de las secuencias fue ClustalW 1.82 del EMBL. Este programa es capaz de llevar a cabo alineamientos múltiples de secuencias tanto de DNA como de proteínas. El alineamiento puede obtenerse en diferentes formatos. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el formato PHYLIP.

Todas las secuencias se comparan según el método rápido de Wilbur y Lipman y el porcentaje de similaridad obtenido se utiliza para construir el cladograma utilizando la matriz de pesos UPGMA. El cladograma puede determinar de forma aproximada el grado de relación entre secuencias.

16. PREDICCIÓN DE SITIOS SIDD

En este trabajo se ha utilizado la aplicación WebSIDD desarrollada por Benham y col. para la localización de sitios de la doble hélice susceptibles a la desestabilización por estrés (SIDD: *stress-induced DNA duplex destabilization*) (Bi y Benham, 2004). La aplicación WebSIDD disponible en la página web: <http://genomics.ucdavis.edu/benham/sidd/index.php> analiza la aparición de estructural transitorias en moléculas de DNA estresadas aplicando métodos de mecánica estadística. El método predice la localización de sitios en la doble hélice de DNA dando las localizaciones precisas de los pares de bases donde la doble hélice es desestabilizada. Los sitios SIDD se corresponden con regiones de estabilidad termodinámica baja. Este análisis predice localizaciones, pares de bases en la doble hélice, donde el estrés impuesto por la superhélice induce separación de la misma.

La salida del programa está constituida por dos gráficos que analizan dos parámetros $p(x)$ y $G(x)$. El gráfico $p(x)$ versus x , localización del nucleótido en la secuencia, es denominado *perfil de transición*. Esta representación determina la probabilidad de apertura de la doble hélice, $p(x)$, considerando la localización de los nucleótidos en la secuencia. El gráfico $G(x)$ versus x , es denominado perfil de desestabilización de la hélice.

En este trabajo se localizaron los sitios SIDD en la secuencia de diferentes orígenes de replicación bacterianos y plasmídicos. Las secuencias analizadas se describen en la tabla 6. Las secuencias fueron computerizadas usando la energética del vecino más cercano y, de las dos salidas del programa, se analizó solamente la correspondiente a $p(x)$.

Resultados

CAPÍTULO 1. DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN *oriC* PARA EL INICIO DE HIR

*Todos los organismos presentan mecanismos múltiples de respuesta frente al estrés producido por cambios ambientales. Un aumento de 10 ó más grados centígrados de la temperatura de crecimiento de un cultivo bacteriano de Escherichia coli resulta en la aparición de replicaciones extras acíclicas que escapan del control del ciclo celular. Este tipo de replicación inducida por estrés térmico se denominó HIR y es independiente de la respuesta de choque térmico. El inicio de HIR se localiza en *oriC*, al igual que sucede en la replicación cíclica. Se propuso que una alteración topológica de la estructura de *oriC* podría determinar la aparición de orígenes de replicación competentes para HIR (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).*

*En este capítulo se ha abordado la búsqueda de las secuencias específicas en *oriC* para el inicio de HIR. Se ha confirmado que el inicio de HIR tiene lugar sólo en *oriC*. La desaparición de la secuencia del 13mero-L, que proporciona inestabilidad termodinámica a la secuencia de *oriC*, resulta en la desaparición de HIR. Mutaciones en otras regiones de *oriC* no eliminan HIR.*

Los resultados y conclusiones de este capítulo han sido publicados en González-Soltero et al., 2006.

1. EL INICIO DE HIR TIENE LUGAR SÓLO EN *oriC*

Un trabajo previo de nuestro grupo de investigación localizó, mediante frecuencia de marcadores, el inicio de HIR en la región de *oriC*, al igual que en la replicación cíclica (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Partiendo de esta consideración, el primer objetivo de este trabajo fue precisar si en ausencia de *oriC* tienen lugar replicaciones termoinducidas y determinar las secuencias de *oriC* que permiten que la inducción de HIR tenga lugar. Para estudiar si en ausencia de *oriC* alguna otra región del cromosoma de *E. coli* pudiera servir como origen de HIR, se analizó la inducción de HIR en CM1671 ($\Delta oriC1071$ *zif::F*) que presenta una deleción completa de *oriC*, desde *gidB* hasta *asnA*, y en sus estirpes parentales CM1565 (*oriC+*) y CM1588 (*oriC+* *zif::F*). En la estirpe CM1671 la replicación se lleva a cabo desde el plásmido F que se encuentra integrado en el minuto 85 del mapa genético del cromosoma de *E. coli* (Von Meyenburg, 1980).

Para el estudio de la inducción de HIR en las estirpes CM1671, CM1565 y CM1588, se crecieron cultivos bacterianos a 30°C en LB. A densidades ópticas comprendidas entre 0,06 y 0,08 se adicionó rifampicina 150 µg/ml para inhibir nuevos inicios de replicación, al mismo tiempo que se transfirió una alícuota del cultivo a 41°C. A partir de los datos de síntesis relativa de DNA obtenidas tras la adición de rifampicina a 30°C ($\Delta G_{30^\circ C}$) y junto con el cambio a 41°C ($\Delta G_{41^\circ C}$) se determinaron el número de ciclos de

replicación por cromosoma, n , y el porcentaje de orígenes inducidos tras estrés térmico que dan lugar a cromosomas completos, i (apartado 4.2.3 de Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13 y corresponden a una inducción de HIR de alrededor del 24% de los orígenes presentes en las estirpes CM1565 (Fig. 13A) y CM1588 (Fig. 13C), mientras que en la estirpe CM1671 no se observó inducción de HIR (Fig. 13B) (Tabla 7). Estos resultados permiten concluir que *oriC* es la única región del cromosoma de *E. coli* donde se induce HIR y que, en su ausencia, no existe inducción de replications fuera de *oriC*. Estos resultados permiten además concluir que ni *oriS* ni *oriV*, orígenes de replicación del plásmido F, son capaces de inducir HIR integrado en el cromosoma.

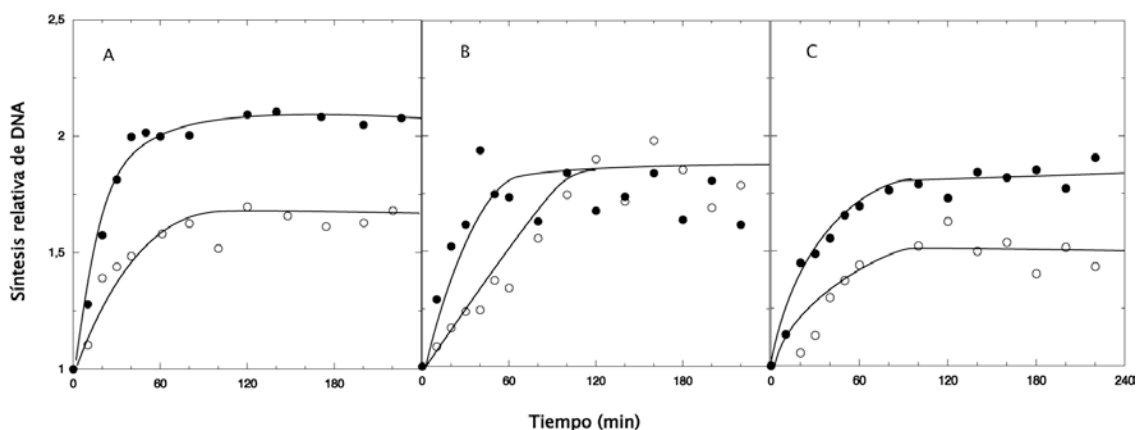


Figura 13. Síntesis relativa de DNA en las estirpes CM1565 (A), CM1671(B) y CM1588 (C), creciendo en LB, tras la adición de rifampicina 150 µg/ml, a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●).

Tabla 7. HIR en ausencia de *oriC*.

ESTIRPE	ORIGEN/-ES	HIR (%)
CM1565	<i>oriC</i> +	23,8
CM1671	$\Delta oriC1071$ <i>zif</i> ::F	0
CM1588	<i>oriC</i> + <i>zif</i> ::F	24,2

(i%): porcentaje de orígenes inducidos tras estrés térmico (apartado 4.2.3 de Métodos).

2. MUTACIONES FUNCIONALES DE *oriC* PERMITEN HIR

Una vez conocido que el inicio de HIR tiene lugar únicamente en *oriC*, el siguiente objetivo fue localizar qué secuencias dentro de *oriC* son necesarias para esta iniciación. Se analizó la replicación en diez mutantes de *oriC* que no presentan alteraciones significativas en la replicación cíclica y se estudió su efecto sobre HIR. Estas mutaciones pueden agruparse como: (i) mutaciones en las secuencias de unión de DnaA: por modificación de la secuencia original de 9 pb de R2 (*oriC13*), R3 (*oriC14*), R4 (*oriC15*) y R5 (*oriC17*); por sustitución de la secuencia R3 por la R1 (*oriC21*); y por inversión en la secuencia R4 (*oriC136*); (ii) mutaciones en las secuencias de unión de las proteínas IHF (*oriC132*) y Fis (*oriC131*); y (iii) mutaciones de inserción o delección: se analizó un mutante que presenta una delección en la mitad derecha de *oriC* que abarca desde el nucleótido 275 al 352 (*oriC160*), y un mutante que presenta una inserción de 14 pb entre las secuencias R3 y R4 (*oriC162*) (Weigel *et. al.*, 2001).

2.1. MUTANTES EN LAS SECUENCIAS DE UNIÓN DE DnaA

Como se ha comentado en el apartado 3.1 de la Introducción, *oriC* presenta 11 secuencias de unión para la proteína DNA. De estas secuencias, las cinco mejor caracterizadas son las denominadas secuencias R, R1-R5. Se han aislado mutantes en estas secuencias de unión que son viables y que permiten que la replicación cromosómica tenga lugar, excepto para la secuencia R1 (Weigle *et al.*, 1996).

Para este trabajo, se analizó la inducción de HIR en las estirpes WM2762 (*oriC13*), WM2763 (*oriC14*), WM2764 (*oriC15*) y WM2844 (*oriC17*) que presentan, respectivamente, mutaciones en las secuencias R2, R3, R4 y R5 de unión de la proteína DnaA en *oriC* y en la estirpe silvestre parental WM2482, que presenta una secuencia silvestre de *oriC* (Weigel *et al.* 2001). Estos mutantes presentan alteraciones en la secuencia de unión a DnaA, y, aunque mantienen la misma proporción A+T de las silvestres, la proteína no se une a estos sitios. SE cultivaron estas estirpes a 30°C y, a densidades ópticas entre 0,06 y 0,08, se transfirió una alícuota del cultivo a 41°C, y se adicionó rifampicina a ambos cultivos para inhibir la inducción de nuevos ciclos de replicación (apartado 4.2.3 de Métodos).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8. La inducción de HIR fue de alrededor del 20% en la estirpe silvestre y en los mutantes *oriC13* (R2 modificada), *oriC14* (R3 modificada), *oriC15* (R4 modificada) y *oriC17* (R5 modificada) (Tabla 8). Por tanto, podemos concluir que las secuencias R2, R3, R4 y R5 no son esenciales para el inicio de HIR puesto que las alteraciones en sus secuencias, al menos de forma independiente, no producen cambios en la inducción de HIR respecto a una estirpe silvestre. La estirpe WM2765 que lleva la mutación *oriC21*, secuencia R1 en la posición de R3, no mostró

Tabla 8. HIR en mutantes en las secuencias de unión a DnaA en *oriC*.

ESTIRPE	MUTACIÓN	HIR (i%)
WM2482	<i>silvestre</i>	19,5
WM2762	<i>oriC13</i> R2 modificada	19,2
WM2763	<i>oriC14</i> R3 modificada	20
WM2764	<i>oriC15</i> R4 modificada	20
WM2844	<i>oriC17</i> R5 modificada	20,4
WM2765	<i>oriC21</i> R1 en R3	19
WM2768	<i>oriC136</i> R4 invertida	23,4

tampoco cambios en el nivel de inducción de HIR (Tabla 8). La estirpe WM2768 que lleva la mutación *oriC136*, con una inversión de la secuencia R4, presentó niveles ligeramente mayores de inducción de HIR (Tabla 8). Por tanto, ni la sustitución de la secuencia de R3 por la de R1 ni la inversión de R4, inhiben la inducción de HIR.

Los resultados obtenidos del análisis de estos mutantes en las secuencias R1-R5 de unión de DnaA en *oriC* permiten concluir que la no unión de DnaA a sus sitios de unión por la alteración de sus secuencias o de su posición, al menos de forma individual y cuando las proporciones de A+T son mantenidas, no afectan a la inducción de HIR. El estudio del requerimiento funcional de la proteína DnaA para HIR se presenta en el capítulo 2 de Resultados.

2.2. MUTANTES EN SITIOS DE UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS IHF Y Fis

En *oriC* se encuentran secuencias de unión para las proteínas IHF y Fis que, aunque no intervienen directamente en la iniciación, parecen contribuir a su regulación (apartado 3.2 de Introducción). En la mitad izquierda de *oriC* se localiza una secuencia reconocida por la proteína IHF, mientras que en la mitad derecha hay una secuencia de unión para Fis.

Se analizó la inducción de HIR en las estirpes WM2767 (*oriC132*) y WM2766 (*oriC131*) que llevan mutadas las secuencias de los sitios de unión de IHF y Fis

respectivamente, de tal forma que evitan la unión de estas proteínas, y de la estirpe parental WM2482 (apartado 4.2.3 de Métodos). Ambas estirpes mutantes mostraron niveles de HIR similares al obtenido por la estirpe silvestre WM2482 (Tabla 9). Por tanto, puede concluirse que las uniones de IHF o de Fis en *oriC* no son requeridas por HIR.

2.3. MUTANTES DE DELECCIÓN E INSERCIÓN DE *oriC*

Deleciones o inserciones en la mitad izquierda de *oriC* (DUE y secuencia R1) inactivan el inicio de la replicación en *E. coli*. Sin embargo, se han obtenido mutantes de inserción o deleción entre las secuencias R2 y R3 y entre R3 y R4 que son activos (Langer *et al.*, 1996).

En este trabajo se ha analizado la inducción de HIR en las estirpes mutantes WM2759 (*oriC160*) y WM2845 (*oriC162*). El mutante *oriC160* presenta una deleción de 77 pb entre las posiciones 275 y 352 de *oriC*, y el mutante *oriC162* presenta una inserción de 14 pb entre las secuencias R3 y R4 (Weigel *et al.*, 2001)(apartado 4.2.3 de Métodos). Relativo a los valores de inducción de la estirpe silvestre WM2482, el mutante *oriC160* presentó un porcentaje de orígenes activados tras choque térmico similar al silvestre y el mutante *oriC162* una disminución de la inducción de HIR de aproximadamente la mitad (Tabla 10). De estos resultados puede concluirse que la deleción del extremo derecho de *oriC* no afecta al nivel de inducción de HIR, mientras que la alteración de la estructura de entre las secuencias R3 y R4 disminuye, aunque no impide, la expresión de HIR.

Tabla 9. HIR en mutantes de las secuencias de unión de IHF y Fis en *oriC*.

ESTIRPE	MUTACIÓN	HIR (%)
WM2482	<i>silvestre</i>	19,5
WM2767	<i>oriC132</i>	19,5
	<i>sitio IHF</i>	
WM2766	<i>oriC131</i>	22
	<i>sitio Fis</i>	

Tabla 10. HIR en mutantes que contienen una inserción o una deleción en *oriC*.

ESTIRPE	MUTACIÓN	HIR (%)
WM2482	<i>silvestre</i>	19,5
WM2759	<i>oriC160</i>	22,8
	$\Delta 275-352$	
WM2845	<i>oriC162</i>	10,1
	<i>+14pb R3/R4</i>	

3. HIR NO ESTÁ RELACIONADA CON EL FENOTIPO DE ASINCRONÍA

En *E. coli*, el inicio de la replicación desde *oriC* tiene lugar simultáneamente en todos los orígenes presentes en la célula. Este hecho se denomina *sincronía de iniciación*. Si los inicios son sincrónicos, tras inhibir la división celular, el número final de cromosomas por célula será igual a 2^n , siendo n el número de rondas de replicación por cromosoma (Skarstad *et al.*, 1986).

Algunas de las estirpes utilizadas en este estudio presentan un fenotipo de asincronía, al ser el número el número final de cromosomas por célula diferente a 2^n (Koopes y Nörsdtrom, 1986; Wiegel *et al.*, 2001). Al ser HIR una replicación que escapa a los mecanismos de control del ciclo celular, en este trabajo se ha analizado si existe alguna relación entre la presencia de un fenotipo asincrónico y los inicios observados en HIR.

En la tabla 11 se muestran los resultados de la cuantificación de HIR en once estirpes con diferentes fenotipos de sincronía según Weigel y col. (Wiegel *et al.*, 2001). La comparación de estos resultados indica que no existe relación entre el fenotipo de sincronía o asincronía y el nivel de HIR obtenido. Como puede observarse para los mutantes *oriC14*, que no presenta asincronía, *oriC17*, con una asincronía ligera, y *oriC15*, con alto grado de asincronía, en todos los casos el nivel de HIR es de un 20% (Tabla 11). Estas comparaciones permiten concluir que la existencia y la magnitud de HIR es independiente de la sincronía cromosómica.

Tabla 11. Asincronía de la replicación y HIR

ESTIRPE	MUTACIÓN	ASINCRONÍA ^a	HIR (%)
WM2482	silvestre	no	19,5
WM2762	<i>oriC13</i>	ligera	19,2
WM2763	<i>oriC14</i>	no	20
WM2844	<i>oriC17</i>	ligera	20,4
WM2764	<i>oriC15</i>	alta	20
WM2768	<i>oriC136</i>	no	23,4
WM2765	<i>oriC21</i>	no	19
WM2766	<i>oriC132</i>	ligera	19,5
WM2767	<i>oriC131</i>	alta	22
WM2845	<i>oriC162</i>	alta	10,1
WM2759	<i>oriC160</i>	no	22,8

^a. Weigel *et al.* 2001.

4. EL PLÁSMIDO R1 INTEGRADO EN EL CROMOSOMA PRESENTA HIR

Como se ha mostrado en el apartado 1 de este capítulo, la estirpe CM1671 ($\Delta oriC1071 zif::F$) no presenta HIR debido a la falta de *oriC*. El plásmido F integrado en su cromosoma tampoco induce HIR a partir de *oriS* ni de *oriV*. Con el objeto de determinar si HIR es un fenómeno específico de *oriC* o se puede dar en otros replicones, se estudió su inducción en la estirpe CM1843 ($\Delta oriC1071 zij::R1$), donde *oriC* está delecionado y la replicación está bajo el control de *oriR1*, origen de replicación del plásmido R1 (von Meyenburg, 1980). Esta estirpe presentó un nivel de HIR levemente superior a los de las estirpes parentales CM1565 (*oriC+*) y CM1793 (*oriC+ zij::R1*) (Tabla 12). Por tanto, HIR no es un fenómeno específico de *oriC*, sino que puede inducirse en otros replicones, como en el plásmido R1.

5. LA INDUCCIÓN DE HIR REQUIERE EL 13mero-L DE *oriC*

Como se ha comentado en este capítulo, la zona izquierda de *oriC* (DUE y secuencia R1) es esencial para la replicación cíclica. Una deleción de 16 pb, que comprende el trecémero izquierdo de *oriC*, 13mero-L, es suficiente para inactivar a *oriC* como origen de replicación (Bramhill y Kornberg, 1988; Kowalsky y Eddy, 1989; Eliasson *et al.*, 1996). Bacterias que presentan esta mutación pueden ser viables por supresión integrativa de otro origen de replicación. Eliasson y col. construyeron estirpes con la deleción de 16 pb en el 13mero-L y la replicación bajo el control de replicones integrados en el *oriC* mutado (Nordström *et al.*, 1991; Eliasson *et al.*, 1996a; Eliasson *et al.*, 1996b).

La estirpe intFs-B ($\Delta 16pb(13mero-L)::pAE15$), derivada de la estirpe silvestre CM735, presenta una deleción de 16 pb que inactiva *oriC* por deleción del 13mero-L y la integración en ese lugar del plásmido pAE15 (*miniF*) que contiene el replicón básico de F y como origen de replicación a *oriS* (Eliasson *et al.*, 1996a). El análisis de HIR en esta estirpe no mostró inducción de HIR, mientras que la estirpe parental CM735 (*oriC+*) presentó un nivel de HIR normal del 20% (Tabla 13). Por tanto, puede concluirse que la carencia de un *oriC* funcional por deleción del 13mero-L resulta en la ausencia de HIR. En la estirpe intFs-B, al igual que en el caso de la estirpe CM1671, el origen de replicación del plásmido F, *oriS*, es incapaz de inducir HIR (Fig. 14B).

La estirpe LK211 ($\Delta 16pb(13meroL)::pKN1562$) presenta la deleción de 16 pb que abarca el 13mero-L y, en este caso, la replicación bajo el control del plásmido pKN1562, derivado del plásmido R1 (Koppes y Nordström, 1986). El análisis de HIR en la estirpe LK211 presentó un nivel de HIR del 22% (Fig. 14A), similar al de su estirpe parental ER, donde la inducción fue del 22,8% (Tabla 13). La inducción de HIR en LK211, al igual que en la estirpe CM1843, muestra que, a pesar de la falta de funcionalidad de *oriC*, el plásmido R1 integrado en el cromosoma es capaz de inducir HIR.

Tabla 12. HIR en el replicón R1

ESTIRPE	ORIGEN/-ES	HIR (%)
CM1565	<i>oriC+</i>	23,8
CM1793	<i>oriC+</i> <i>zlj::R1</i>	21,8
CM1843	Δ <i>oriC1071</i> <i>zlf::R1</i>	25

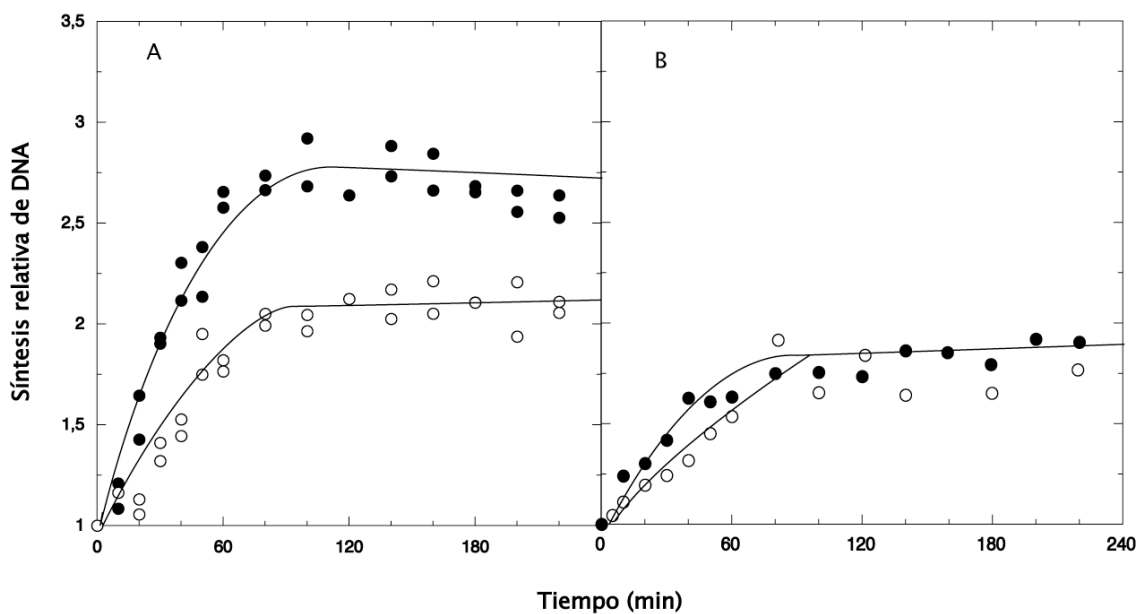


Figura 14. Síntesis relativa de DNA de las estirpes LK211 (A) e intFs-B (B), a 30°C (O) creciendo en LB, tras la adición de rifampicina 150 µg/ml, a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●).

Estos resultados indican la pérdida de funcionalidad de *oriC* para la inducción de la replicación por estrés térmico cuando el 13mero-L está deleciónado, aunque el resto de la secuencia de *oriC* permanezca intacta. La inducción de HIR, en ausencia del 13mero-L, es restaurada cuando se integra en el cromosoma un replicón competente para HIR, como es el caso del plásmido R1, pero no del plásmido F. Por lo tanto, la región del 13mero-L es esencial tanto para la replicación cíclica como para HIR.

Tabla 13. HIR en mutantes de delección de 16pb en el 13mero-L e integración plasmídica

ESTIRPE	MUTACIÓN	HIR (i%)
CM735	<i>silvestre</i>	20
<i>intFs-B</i>	(Δ 16pb(13mero-L)::pAE15(F))	0
ER	<i>silvestre</i>	22,8
LK211	(Δ 16pb(13mero-L):: pKN1562 (R1))	22

6. EN EL 13mero-L DE *oriC* SE LOCALIZA UN SITIO SIDD

La apertura de la doble hélice requerida para el inicio de la replicación cromosómica tiene lugar en *oriC* que es una zona de baja estabilidad termodinámica. El DNA se encuentra superenrollado negativamente, tanto en el cromosoma de *E. coli*, como en plásmidos. El proceso de apertura de una zona del DNA depende de la estabilidad termodinámica de su secuencia y del estado de la superhélice. Por tanto, estos factores regulan la apertura de la hélice necesaria para el inicio de la replicación (revisado en Ak y Benham, 2005).

Se ha demostrado la existencia de secuencias de desestabilización en moléculas de DNA circular superenrollado negativamente sometido a condiciones de estrés. Estas secuencias han sido denominadas sitios SIDD (stress induced DNA duplex destabilization) (Bi y Benham, 2004). Como se ha comentado en el apartado 1 de la Introducción, el cromosoma bacteriano se encuentra dividido en dominios topológicos cuyo comportamiento a nivel de superenrollamiento es similar al de moléculas circulares libres superenrolladas negativamente. El superenrollamiento negativo al que está sometida la doble hélice de DNA ejerce un estrés torsional sobre la propia molécula de DNA que hace que estos sitios SIDD tiendan a la inestabilidad y a la apertura de la doble hélice en estas regiones. Se han localizado sitios SIDD en orígenes de replicación tanto en eucariontes como en procariontes (Ak y Benham, 2005; Nieduszynski *et al.*, 2007).

En la secuencia de *oriC* se ha descrito la existencia del DUE o elemento para el desenrollamiento del DNA y que comprende la región rica en A+T y la zona de los trecémeros. De los tres 13meros, sólo la secuencia del 13mero-R es esencial para la funcionalidad de *oriC*, mientras que pueden tolerarse determinados cambios en las secuencias de L y M, siempre que se mantenga el estado de superenrollamiento de la superhélice (Kowalski y Eddy, 1989). Aunque la apertura de *oriC* para el inicio de la replicación cromosómica en *E. coli* requiere la interacción de proteínas, se ha descrito que en determinadas condiciones la apertura de *oriC* puede darse en ausencia de proteínas de iniciación, si bien necesita ser estabilizada posteriormente por proteínas como DnaA, IHF o HU (Polaczek *et al.*, 1998).

Dado que una situación de estrés térmico puede alterar el perfil energético de la doble hélice de DNA y que los sitios SIDD se corresponden con zonas de baja estabilidad termodinámica, se analizó la existencia de sitios SIDD en la secuencia de *oriC*. Para este estudio se ha usado el programa WebbSIDD descrito en el apartado 16 de Métodos. Para este análisis, se introdujo en el programa la secuencia de *oriC* desde la región rica en A+T a la secuencia R4 de unión de DnaA según las posiciones descritas por Gille y Messer (Gille y Messer, 1991) y se utilizó el método energético del *vecino cercano* para el cálculo del perfil de transición de la secuencia de *oriC* (apartado 16 de Métodos).

El perfil de transición que muestra la probabilidad de desestabilización de la secuencia de *oriC* se presenta en la figura 15. El programa localizó dos sitios preferentes de apertura de la hélice favorecidos termodinámicamente en la secuencia silvestre de *oriC*: la región rica en A+T (nucleótidos 57..65) y el 13mero-L (nucleótidos 68..85) (Fig. 15; Tabla 14). Se analizaron también las secuencias de los *oriC* mutantes estudiados en el apartado 2 de este Capítulo. Todas las secuencias mutantes analizadas que presentaron algún nivel de inducción de HIR presentaron el sitio SIDD localizado en el 13mero-L, mientras que el sitio SIDD localizado en la secuencia rica en A+T (nucleótidos 57..65) está presente en todas excepto en el mutante *oriC160* (Tabla 14). Dado que el mutante *oriC160* presentó HIR, la desestabilización del sitio SIDD localizado en la región rica en A+T probablemente no es necesaria para el inicio de HIR. El análisis de predicción de sitios SIDD en *oriC162*, mostró una única zona mayoritaria de apertura desde la región rica en A+T al 13mero-L (Tabla 14). La apertura de una zona de mayor amplitud en *oriC* puede afectar a la interacción de DnaA con la zona de los 13meros y, por tanto, a la iniciación de HIR lo que explicaría la disminución a la mitad del valor de HIR en este mutante con respecto al silvestre.

Al comparar el perfil de la secuencia de *oriC* silvestre con el del *oriC* mutante que presenta la delección de 16 pb en la zona del 13mero-L, que no induce HIR en la estirpe intFs-B, se observa en el mutante la desaparición de la zona de apertura mayoritaria de la doble hélice en *oriC*, localizada en el 13mero-L, mientras que permanece el sitio SIDD localizado en la zona rica en A+T (57..65) (Fig. 15 línea discontinua; Tabla 15). La delección del 13mero-L es la única mutación de las estudiadas que no presenta HIR. De este resultado se deduce que el sitio SIDD localizado en el 13mero-L de *oriC* podría ser el responsable de la desestabilización de doble hélice en *oriC* tras el cambio de temperatura. Además, el sitio SIDD localizado en el 13mero-L presenta una mayor probabilidad de desestabilización, $p(x)$ de 0,38, que el localizado en la región rica en A+T, $p(x)$ de 0,12 (Fig. 15). La desestabilización de la doble hélice en esta zona, podría promover la apertura de *oriC* necesaria para el ensamblaje del complejo de replicación en HIR. Se ha demostrado que la proteína DnaA en su conformación activa unida a ATP se une a sus secuencias de unión localizadas en los 13meros. Esta interacción es esencial en el inicio de la replicación cromosómica en los pasos que siguen a la apertura de la doble hélice en *oriC* (Leonard y Grimwade, 2005). La interacción de DnaA con las secuencias de unión R1 a R5 en *oriC* no es esencial para HIR (apartado 2.1 de este

Capítulo). A diferencia de las secuencias de unión de DnaA localizadas en los 13meros, estas secuencias pueden unir DnaA-ATP ó DnaA-ADP indistintamente.

Se han simulado también la aparición de sitios SIDD en mutantes en la secuencia que comprende el 13mero-M o el 13mero-R, aunque no se ha analizado *in vivo* el efecto de estas mutaciones sobre la inducción de HIR (Tabla 14). Ambas deleciones en

Tabla 14. Localización de sitios SIDD en mutantes *oriC*

ESTIRPE	MUTACIÓN	SITIOS SIDD EN <i>oriC</i> ^a	HIR (%)
WM2482	<i>silvestre</i>	(57..65, 68..85)	19,5
LK211/intFs-B	Δ13mero-L(Δ16 pb)	(57..65)	0
	Δ13mero-M	(58..64, 70..85)	No estudiado
	Δ13mero-R	(58..64, 70..87)	No estudiado
WM2762	<i>oriC13: R2 alterada</i>	(57..65, 68..85)	19,2
WM2763	<i>oriC14: R3 alterada</i>	(57..65, 68..85)	20
WM2844	<i>oriC17: M alterada</i>	(57..65, 68..85)	20
WM2764	<i>oriC15: R4 alterada</i>	(57..65, 68..85)	20
WM2768	<i>oriC136: R4 invertida</i>	(57..65, 68..85)	23,4
WM2765	<i>oriC21: R1 en R3</i>	(57..65, 68..85)	19
WM2767	<i>oriC132: sitio IHF</i>	(57..65, 68..85)	19,5
WM2766	<i>oriC131: sitio Fis</i>	(57..65, 68..85)	22
WM2845	<i>oriC162: +14pb R3/R4</i>	(57..... 86)	10,1
WM2759	<i>oriC160: Δ 275-352</i>	(71..83)	22,8

^a Previstos por el programa WebSIDD de Craig Behman (Bi y Benham, 2004). La correspondencia entre sitios SIDD y secuencia son las siguientes: (57..65), se corresponde con la región rica en A+T a la izquierda de los trecémeros; (68..85), zona del 13mero-L.

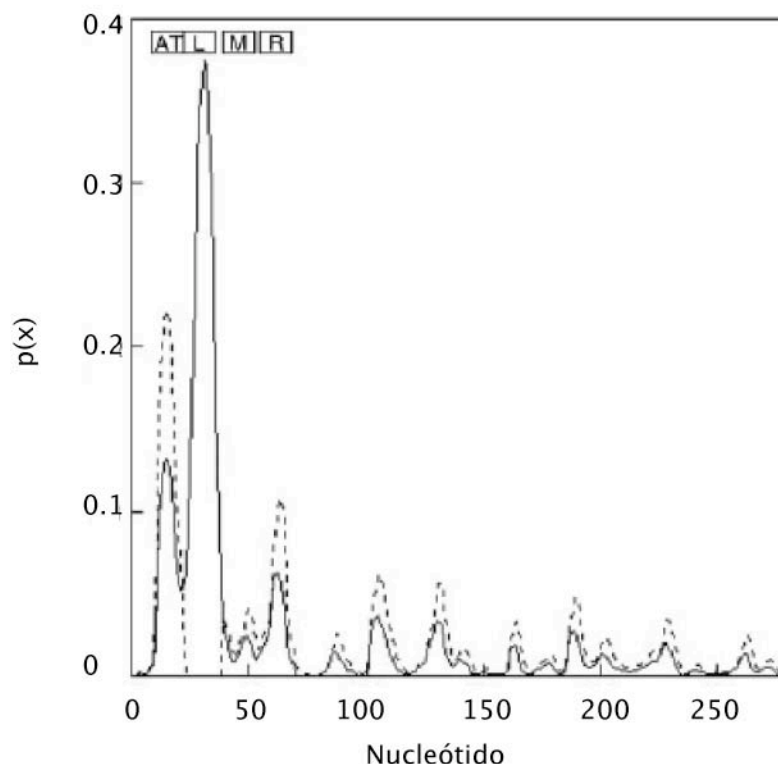


Figura 15. Probabilidad de desestabilización de sitios SIDD en *oriC*. Para la localización de sitios SIDD se utilizó el algoritmo propuesto por Benham (Bi y Benham, 2004), con la secuencia silvestre de *oriC*(—) y con la secuencia mutante del 13mero-L (- - -). Las posiciones que ocupan los nucleótidos son las indicadas en la figura 2. Se muestran las posiciones de la región rica en A+T y de los tres 13meros: L, M y R.

la secuencia siguen mostrando la existencia de los dos sitios SIDD presentes en la secuencia silvestre; esto parece indicar que ambas secuencias no son importantes para la desestabilización de la doble hélice en *oriC*. Por tanto, la existencia de un sitio SIDD localizado en el 13mero-L de *oriC* es esencial para la inducción de HIR. Las mutaciones que presentan alteración en los niveles de HIR, Δ 13mero-L y *oriC162*, presentan también alteración en la distribución de sitios SIDD. Se puede así establecer una relación entre el nivel de HIR observado y la distribución de sitios SIDD.

7. LA SECUENCIA DEL 13mero-L Y LA DISTRIBUCIÓN DE SITIOS SIDD ESTÁN CONSERVADOS EN ENTEROBACTERIAS

La secuencia *oriC* puede utilizarse como marcador filogenético de especies entéricas. Las similitudes entre las secuencias de los orígenes de replicación de las

distintas especies pueden correlacionarse con su distancia filogenética (Roggenkamp, 2006). Dada la disponibilidad de las secuencias de nucleótidos de orígenes de replicación de bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenece *E. coli*, se determinó si en estas secuencias existen estructuras similares al 13mero-L que se correspondan con sitios SIDD. La existencia de secuencias homólogas al 13mero-L en otros orígenes de replicación señalaría la importancia evolutiva de esta secuencia.

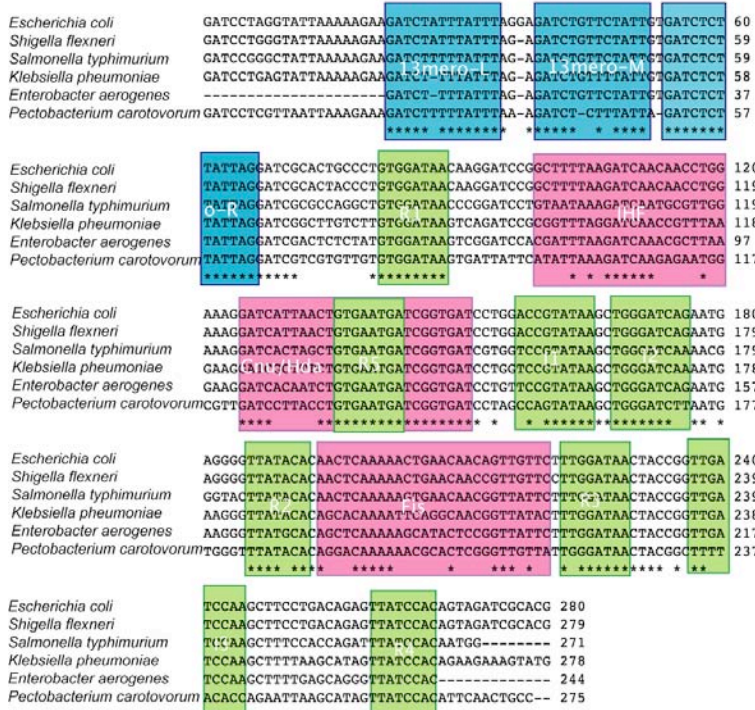
Las secuencias de los orígenes de replicación utilizados para este estudio fueron las pertenecientes a *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y *Pectobacterium carotovorum* (Tabla 6). El alineamiento de los orígenes de replicación de estas estirpes mostró un alto grado de conservación en las regiones con importancia funcional dentro de *oriC*, entre las que se encuentra el 13mero-L (Fig. 16A). Resultados similares han sido descritos previamente (Zyskind, 1986).

Del mismo modo que para la secuencia de *oriC*, se estudió la presencia de los sitios SIDD en las secuencias de los orígenes de replicación de las especies anteriores. De estas secuencias, se tomó la zona comprendida entre la región rica en A+T hasta la secuencia R4 de unión a DnaA definidas tras el alineamiento múltiple de las secuencias de los diferentes orígenes con la de *oriC* de *E. coli* (Fig. 16A). De esta forma, las secuencias introducidas en el programa WebSIDD para el análisis de los sitios SIDD presentaron aproximadamente la misma longitud. El análisis de los sitios SIDD en las secuencias de estos orígenes de replicación estudiados reveló que en todos ellos se localiza un sitio SIDD en la región del 13mero-L (Fig. 16C). La distribución de sitios SIDD en estos orígenes de replicación guarda un parecido que se correlaciona con la distancia filogenética propuesta por Roggenkamp (Fig. 16B; Roggenkamp, 2006). De esta forma, las dos especies más cercanas evolutivamente a *E. coli*, *S. flexneri* y *S. typhimurium*, presentan una distribución de sitios SIDD muy parecida a la de *E. coli*. En las secuencias de los orígenes de *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* y *P. carotovorum* aparece un tercer sitio SIDD, que no aparece en la región del origen de *E. coli*, aunque se mantienen los sitios SIDD de la región rica en A+T y del 13mero-L (Fig. 16C).

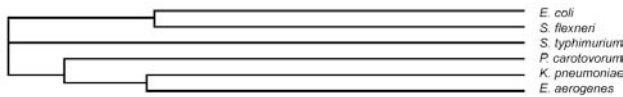
Los datos obtenidos muestran el alto grado de conservación de la secuencia del 13mero-L y su inestabilidad termodinámica entre los orígenes de replicación de enterobacterias y parecen señalar un mecanismo de apertura de la doble hélice para el inicio de la replicación más conservado entre especies más cercanas. La presencia de HIR no ha sido analizada en especies diferentes a *E. coli*, pero los resultados encontrados en este estudio sugieren que puede existir una replicación de estrés térmico en las bacterias filogenéticamente más cercanas a *E. coli*.

Capítulo 1

A



B



C

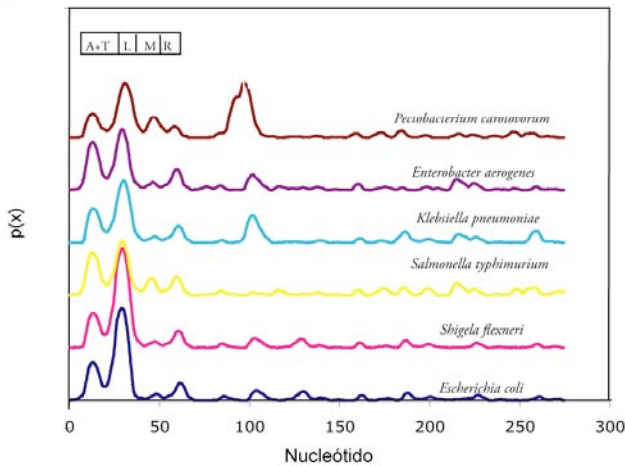


Figura 16. (A) Alineamiento múltiple de secuencias de orígenes de replicación de la familia *Enterobacteriaceae*. (B) Dendrograma obtenido del alineamiento múltiple de las secuencias mostradas en (A). (C) Localización de sitios SIDD en enterobacterias. Se muestran las posiciones de la región rica en A+T y de los tres 13meros: L, M y R. Los cuadros representan secuencias con funcionalidad definida en *oriC*. (* posiciones altamente conservadas).

CAPÍTULO 2. TOPOLOGÍA CROMOSÓMICA Y HIR

El mantenimiento de un nivel adecuado de superenrollamiento cromosómico es esencial para la viabilidad celular. La actividad de enzimas y procesos celulares se ve afectada por los cambios en el superenrollamiento del DNA, de ahí que los niveles de superenrollamiento deban mantenerse en unos límites adecuados para facilitar las diferentes funciones fisiológicas que tienen lugar en el DNA (apartado 1.3 de Introducción).

El inicio de la replicación cromosómica requiere superenrollamiento negativo. El superenrollamiento influye en los procesos de apertura de la doble hélice necesarios para el inicio de la replicación cromosómica, de tal forma que un estado topológico adecuado de la región de oriC es esencial para asegurar el inicio de la replicación (Smelkova y Mariani, 2001). Los niveles de superenrollamiento cromosómico varían rápidamente en respuesta a una gran variedad de cambios ambientales. Se ha descrito que tras una situación de estrés térmico tienen lugar cambios a nivel de superenrollamiento que pueden contribuir a la desestabilización de la doble hélice (López-García y Forterre, 2000).

En el apartado 6 del capítulo 1 de Resultados, se ha mostrado la necesidad de un sitio SIDD en la secuencia de oriC localizado en el 13mero-L donde una probable desestabilización termodinámica de la doble hélice tras estrés térmico podría explicar la inducción de HIR. La desestabilización de este sitio SIDD puede verse afectada también por las alteraciones de la topología cromosómica tras estrés térmico o por el estado de la superhélice anterior a la situación de estrés. En este capítulo se analiza la variación de los niveles de superenrollamiento tras la situación de estrés térmico que da lugar a HIR. Los resultados obtenidos indican que un cambio de temperatura de 30°C a 41°C no produce cambios ni globales ni locales en el superenrollamiento de la doble hélice que puedan afectar a la inducción de HIR. Se ha analizado HIR en condiciones donde la topología cromosómica se encuentra alterada por la disfunción de las topoisomeras celulares, debida a la existencia de mutaciones o a la inhibición de su actividad mediante el uso de drogas específicas. Los resultados obtenidos indican que la inducción de HIR es favorecida por la relajación cromosómica, tanto en mutantes topológicos como cuando la girasa está inhibida por tratamiento con novobiocina que actúa sobre la subunidad GyrB. La inhibición de la girasa con ácido nalidixico, que bloquea a GyrA, da lugar a inducciones extras de la replicación a partir de oriC diferentes a HIR.

1. LA INDUCCIÓN DE HIR NO TIENE LUGAR POR CAMBIOS EN EL SUPERENROLLAMIENTO

Se ha propuesto que tras una situación de estrés térmico tienen lugar cambios en el nivel de superenrollamiento de la doble hélice que pueden contribuir a la

desestabilización de la misma (Benham y Bi, 2004). En ese estudio, las medidas de superenrollamiento se realizaron utilizando plásmidos como sistemas modelos, dada la dificultad que presenta la medida del superenrollamiento en el cromosoma (López-García y Forterre, 2000). Trabajos recientes han propuesto dos nuevos tipos de medida del nivel de superenrollamiento en el cromosoma de *E. coli*. Ambos sistemas se basan en la medida de cambios en la expresión de genes sensibles al superenrollamiento. Uno de los sistemas mide los cambios en la expresión del gen de la β -galactosidasa controlado por el promotor del gen *gyrB* (*gyrBp-lacZ*). El promotor de *gyrB* es sensible a cambios en el nivel de superenrollamiento del DNA y aumenta su actividad cuando el DNA se relaja. Así estas alteraciones estructurales se pueden medir por la actividad de la β -galactosidasa (Hardy y Cozzarelli, 2005). El segundo de los sistemas mide los cambios en la expresión génica de todo el genoma de *E. coli* mediante experimentos de microarrays de cDNA. Diversos estudios han mostrado una correlación entre la alteración de la topología cromosómica y el cambio en la expresión de determinados genes (Peter *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004). Peter y colaboradores describieron la existencia de 308 genes en el cromosoma de *E. coli* cuyos cambios en la expresión se corresponden con cambios en el superenrollamiento a los que denominaron genes sensibles al superenrollamiento (SSG) (Peter *et al.*, 2004). Cambios en la expresión de los SSG tras un determinado tratamiento son indicativos de cambios en el superenrollamiento (Peter *et al.*, 2004). En este estudio se han utilizado ambos sistemas para detectar cambios en el nivel de superenrollamiento cromosómico tras estrés térmico.

1.1. *gyrBp* NO PRESENTA CAMBIOS EN SU EXPRESIÓN TRAS ESTRÉS TÉRMICO

Con el objeto de determinar si se producen cambios en el superenrollamiento del cromosoma de *E. coli* tras una situación de estrés térmico se utilizó la estirpe W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla*. Esta estirpe presenta el gen *lacZ* bajo el control del promotor de *gyrB* (*gyrBp-lacZ*) y la construcción *gyrBp-bla* clonada en el minuto 1,7 del mapa genético de *E. coli* respectivamente (Hardy y Cozzarelli, 2005). En este trabajo se ha usado el sistema *gyrBp-lacZ* de esta estirpe para determinar mediante la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa si una situación de estrés térmico conduce a cambios en el superenrollamiento tras el cambio de temperatura a 41°C. El aumento de la actividad β -galactosidasa en este sistema se correspondería con una disminución del superenrollamiento (relajación cromosómica).

Se llevaron a cabo medidas de la actividad β -galactosidasa en cultivos de W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla* durante el crecimiento exponencial a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C. Como se observa en la figura 17 no se detectaron diferencias significativas en la actividad β -Galactosidasa entre ambas temperaturas. La actividad β -galactosidasa medida a 41°C fue ligeramente inferior transcurrida más de una hora

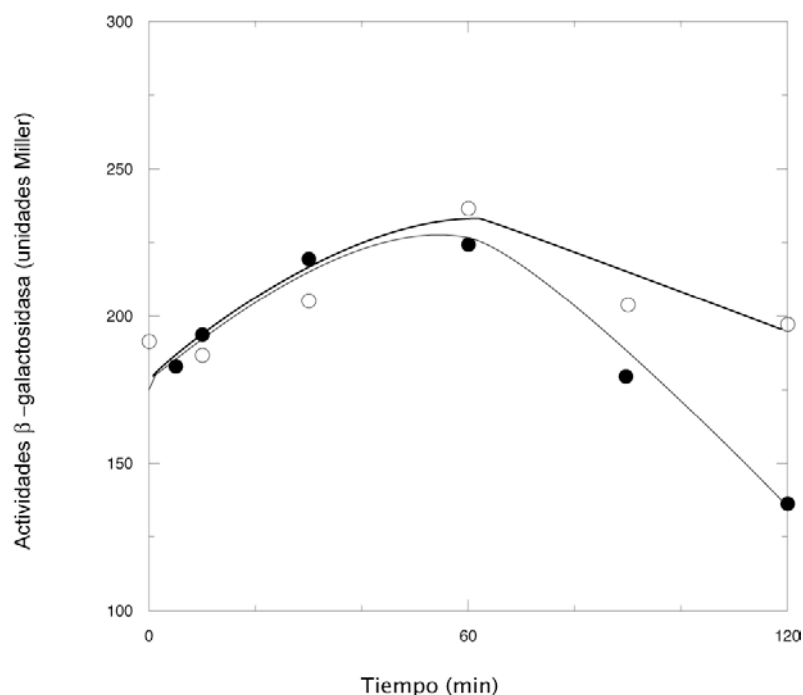


Figura 17. Actividad β -galactosidasa en la estirpe W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C (●).

desde el cambio de temperatura. Sin embargo, no se ha detectado inducción de HIR en tiempos superiores a 20 minutos tras la situación de estrés térmico (datos no publicados).

Por lo tanto, una situación de estrés térmico no provoca cambios en la actividad del promotor *gyrBp*. Esto implica que no se producen cambios en el superenrollamiento tras una situación de estrés térmico, al menos localmente en la región del cromosoma donde se localiza el operón *lac*.

1.2. LOS GENES SENSIBLES AL SUPERENROLLAMIENTO (SSG) NO CAMBIAN SU EXPRESIÓN TRAS ESTRÉS TÉRMICO

Entre los 308 genes SSG descritos por Peter y col. se encuentra el gen *gidA*, que se localiza junto a *oriC*. Según este estudio la expresión de *gidA* aumenta tras la relajación del DNA (Peter *et al.*, 2004). Algunos estudios han descrito que los niveles de transcripción en los alrededores de *oriC* podrían modular el nivel de superenrollamiento en la zona y afectar al inicio de la replicación, aunque existe bastante controversia en este tema (Sa'etsugu *et al.*, 1979; Ogawa y Okazaki, 1991; Bates *et al.*, 1994;). Cambios en la expresión de este gen podrían ser indicativos de cambios en los niveles de superenrollamiento de la región de *oriC*, de ahí que resulte interesante el estudio de la expresión de este gen en condiciones de estrés térmico. En este trabajo se ha analizado si una situación de estrés térmico da lugar a cambios en la expresión de los 308 SSG y, en

especial, de *gidA*. Para ello, se realizaron microarrays de cDNA que representan todo el genoma de *E. coli* de la estirpe MG1655. La misma estirpe fue utilizada por Peter y colaboradores. Tras un tratamiento de estrés térmico por cambio de temperatura de 30°C a 41°C durante 20 minutos, se analizó el transcriptoma de MG1655 tomando como control los niveles de transcripción del cultivo crecido a 30°C. Se eligió el tiempo de estrés térmico de 20 minutos porque trabajos anteriores han determinado que la inducción de HIR tiene lugar durante los 20 minutos que siguen al cambio de temperatura (datos no publicados).

El análisis de los datos de expresión obtenidos de la comparación del cDNA de la muestra a 41°C respecto de la muestra a 30°C resultó en cambios en la expresión de 264 genes (Anexo I). Los SSG no mostraron cambios significativos en el nivel de expresión tras la situación de estrés térmico, obteniéndose para ellos valores-p superiores a 0,05 ($p > 0,05$) (Anexo I). El nivel de transcripción de *gidA* no mostró cambios significativos tras la situación de estrés térmico ($p = 0,3641$; Anexo I). Entre los 264 genes que alteran su expresión tras estrés térmico identificados en este estudio se encuentran genes de choque térmico y de respuesta de estrés descritos previamente ($p < 0,05$) (Tabla 15; Wild *et al.*, 1996). Se encontraron cambios en la expresión de GroES/EL o DnaK y el resto de los 264 genes identificados corresponden a genes de biosíntesis de componentes de la envoltura celular y la membrana, componentes de las subunidades ribosómicas y genes de rutas metabólicas (no se muestran datos). Es de destacar que se observan cambios en la expresión del gen *topA* ($p = 0,01$), descrito como un gen de estrés térmico (Tabla 15; Wild *et al.*, 1996).

Como en el caso de la utilización de la construcción *gyrBp-lacZ*, no se detectan cambios en el nivel de superenrollamiento por cambios en la expresión de los SSG tras estrés térmico. Por tanto, el estrés térmico no induce cambios en el superenrollamiento ni a nivel puntual (*gyrBp-lacZ*) ni a nivel global (microarrays de cDNA de todo el genoma). El estrés térmico sí alteró la expresión de genes de choque térmico, entre otros, lo que indica la efectividad del tratamiento y del análisis experimental.

2. LA INDUCCIÓN DE HIR DEPENDE DEL ESTADO DE LA SUPERHÉLICE PREVIO A LA SITUACIÓN DE ESTRÉS

Como se describe en el apartado anterior, una situación de estrés térmico no provoca cambios en el nivel de superenrollamiento del cromosoma y, por tanto, HIR no debe ser un resultado de los cambios en el superenrollamiento de la doble hélice tras la situación de estrés térmico. Sin embargo, la disponibilidad de una zona del DNA para su apertura depende del estado basal de la superhélice (Bi y Benham, 2005).

Tabla 15. Genes (Proteínas) implicados en la respuesta de choque térmico con cambios significativos en los niveles de transcripción ($p < 0,05$).

GEN (PROTEÍNA) ^a	FUNCIÓN	valor-p
<i>mopB</i> (GroES)	chaperona de estrés térmico	0,0057
<i>mopB</i> (GroEL)	chaperona de estrés térmico	0,0034
<i>dnaK</i> (Hsp70)	chaperona de estrés térmico	0,06*
<i>htpG</i> (Hsp90)	chaperona de estrés térmico	0,012
<i>rpoE</i> (σ^E)	factor sigma en la respuesta al estrés periplásmico	0,03
<i>uspA</i>	regulador de la respuesta de estrés general	0,027
<i>topA</i> (Top I)	libera superenrollamiento	0,01

^a Genes pertenecientes a la respuesta de choque térmico cuya transcripción fue alterada en experimentos de microarrays de cDNA en los que se compararon muestras de cDNA obtenidas de un cultivo crecido a 30°C (Cy3) en LB, con la de una alícuota del cultivo obtenida 20 minutos después de un cambio de temperatura a 41°C (Cy5). En total se detectaron cambios en la expresión de 264 genes, aunque en esta tabla sólo se presentan los pertenecientes a la respuesta de choque térmico. El resto de los genes se muestran en el Anexo I. Para el filtrado de los datos de expresión se aplicó el algoritmo Lowess utilizando la aplicación Prep (García de la Nava *et al.*, 2003).

La predisposición de *oriC* para HIR, teniendo en cuenta que precisa la apertura de la doble hélice, podría depender del estado de superenrollamiento de esa región previo a la situación de estrés térmico. La forma más directa de modificar los niveles basales de superenrollamiento cromosómico es mediante la alteración de la actividad de las topoisomerasas, bien por el uso de mutantes funcionales o por la inhibición de su actividad por drogas específicas.

Alexandre y colaboradores describieron mutantes en genes de las topoisomerasas que presentan diferente grado de superenrollamiento (Alexandre *et al.*, 1989). Con el objeto de determinar si la inducción de HIR resulta afectada por el nivel de superenrollamiento del cromosoma previo al estrés térmico se estudió su inducción en mutantes que presentan alteraciones en la topología cromosómica. Se utilizaron las estirpes IC2014 (*topA10*), IC2076 (*gyrA904*) e IC2026 (*topA10 gyrA923*), que presentan mutaciones que afectan a Topo I, o a la subunidad A de la girasa, o a ambas, respectivamente.

Los niveles de HIR observados en estos mutantes se encuentran entre el 12% de un mutante *topA10* y el 43% del doble mutante *topA10 gyrA923*, mientras que los niveles de HIR observados en el mutante *gyrA904* fueron similares a los obtenidos en la estirpe parental AB1157 (Tabla 16). El mutante *topA10* es, de los mutantes topológicos estudiados, el que presenta un mayor grado de compactación del DNA y se corresponde con el nivel más bajo observado de HIR, la mitad del nivel de la estirpe silvestre. Cuando en este mutante se introduce una segunda mutación en el gen *gyrA*, que relaja el superenrollamiento del cromosoma, se observan valores de inducción de HIR próximos al doble de los de la estirpe parental silvestre AB1157. El mutante *gyrA904*, con niveles de superenrollamiento similares a los de una estirpe silvestre, presentó la misma inducción de HIR que la estirpe silvestre. Por tanto, un mayor estado de relajación cromosómica favorece la inducción de HIR y, lo contrario, una mayor compactación del DNA disminuye la inducción de HIR.

3. LA INDUCCIÓN DE HIR ES FAVORECIDA TRAS LA INHIBICIÓN DE LA GIRASA

La girasa es la enzima encargada de devolver el DNA relajado al estado superenrollado (apartado 1.1.1 de Introducción). Para determinar si el estado de relajación cromosómica es un factor que aumenta la inducción de la HIR, se estudió la inducción de la replicación termoinducida en condiciones de inhibición de la girasa. La girasa está compuesta por cuatro subunidades, dos subunidades GyrA y dos GyrB. Se han descrito drogas específicas para inhibir una de las subunidades. Las quinolonas, como el ácido nalidíxico, inhiben la subunidad GyrA y las cumarinas, como la novobiocina, inhiben la subunidad GyrB (apartado 1.1.2 de Introducción).

3.1. INDUCCIÓN DE HIR TRAS EL TRATAMIENTO CON NOVOBIOCINA

Para estudiar el efecto que provoca la inhibición de la subunidad GyrB de la girasa sobre HIR, se analizó la inducción de la replicación termoinducida en presencia de novobiocina.

Tabla 16. Nivel de superenrollamiento y HIR

ESTIRPE	GENOTIPO	SUPERENROLLAMIENTO ^a	HIR (i%)
AB1157	<i>silvestre</i>	Silvestre	24
IC2014	<i>topA10</i>	Aumenta	12
IC2076	<i>gyrA904</i>	Similar al silvestre	24
IC2026	<i>topA10 gyrA923</i>	disminuye	43%

^a Alexandre *et al.*, 1989.

Se analizó la inducción de HIR en la estirpe AB1157 tras un tratamiento con novobiocina 1 mg/ml a 30°C durante una hora. Tras este tiempo se procedió a la inhibición de inicios de replicación con rifampicina a 30°C y junto con el cambio a 41°C. En estas condiciones se obtuvo una inducción de la termoinducida del 42,83%, aproximadamente el doble de la obtenida en ausencia de novobiocina (Fig. 18). Por tanto, un pretratamiento con novobiocina incrementa el número de orígenes tras la situación de estrés térmico, frente a la situación de no pretratamiento.

3.1.1. Niveles de superenrollamiento tras el tratamiento con novobiocina

Utilizando la aproximación experimental descrita en el apartado 1.1 de este capítulo, se analizó el cambio del nivel de superenrollamiento en condiciones de inhibición de la girasa con novobiocina a 30°C tras el cambio de 30°C a 41°C.

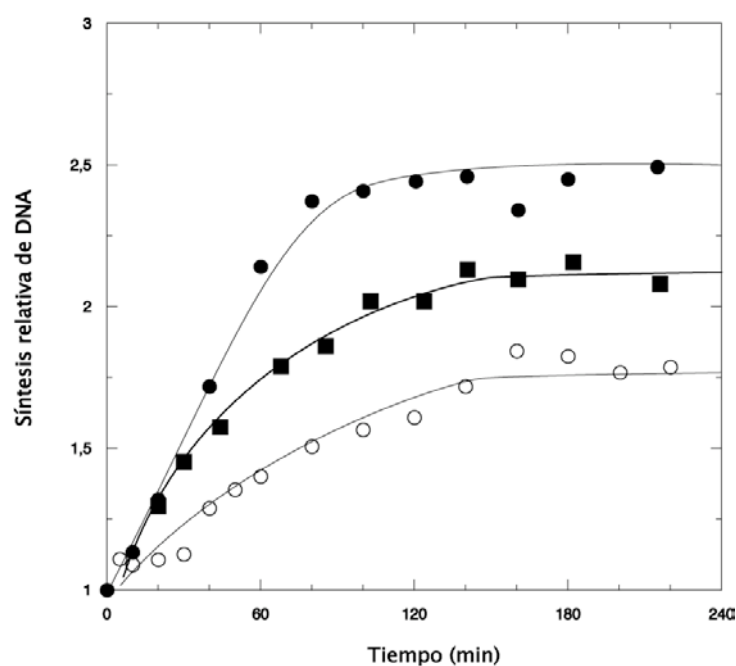


Figura 18. Síntesis relativa de DNA de la estirpe AB1157 tras la adición de rifampicina a 30°C (○), tras el cambio a 41°C en cultivos tratados con novobiocina 1 mg/ml durante una hora antes de la adición de rifampicina (●) y tras el cambio a 41°C en ausencia de tratamiento con novobiocina (■).

Para ello se estudió la actividad del promotor *gyrBp* utilizando el sistema *gyrBp-lacZ* y realizando medidas de la actividad β -galactosidasa. Para la inactivación de la subunidad GyrB se empleó novobiocina 1mg/ml. Cuando se midió mediante el ensayo de β -galactosidasa el nivel de superenrollamiento en presencia de novobiocina se observó pérdida de superenrollamiento, es decir, la relajación del DNA cromosómico (Fig. 19A). En estas condiciones de mayor relajación cromosómica, el cambio de temperatura a 41°C condujo a una disminución de la actividad β -galactosidasa y, por tanto, a un aumento del superenrollamiento. La energía resultante de este aumento del superenrollamiento tras estrés térmico puede ser utilizada para contribuir a la desestabilización de la doble hélice en *oriC* necesaria para HIR. De estos resultados puede concluirse que el tratamiento con novobiocina relaja el cromosoma y que en estas condiciones el aumento de temperatura provoca un aumento del superenrollamiento.

No se realizaron microarrays de cDNA en presencia de novobiocina al estar publicados estos experimentos previamente (Peter *et al.*, 2004). Peter y colaboradores demostraron que un tratamiento con novobiocina, incluso a concentraciones menores a la empleada en este estudio, afecta a la expresión de los genes SSG y sus resultados indican que la novobiocina reduce el superenrollamiento cromosómico. Los resultados obtenidos en este trabajo midiendo la actividad de *gyrBp* llevan a la misma conclusión. En los datos suplementarios aportados por Peter y colaboradores se observan cambios en la expresión en *gidA* dependientes de la concentración de novobiocina empleada (Peter *et al.*, 2004). Estos resultados coinciden también con los descritos anteriormente en otros trabajos acerca de la relajación del superenrollamiento tras el tratamiento con esta droga (Snyder *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 1996). Esta pérdida de superenrollamiento también ha sido descrita para el doble mutante *topA10 gyrA923* (Alexandre *et al.*, 1989). Ambas condiciones, tratamiento con novobiocina y la doble mutación *topA10 gyrA923*, favorecen la inducción de HIR. Por tanto, HIR es estimulada por una mayor relajación cromosómica previa al estrés térmico.

3.2. INDUCCIÓN DE HIR TRAS TRATAMIENTO CON ÁCIDO NALIDÍXICO

Para estudiar el efecto que provoca la inhibición de la subunidad GyrA de la girasa en HIR, se analizó la inducción de la replicación termoinducida en presencia de ácido nalidixico.

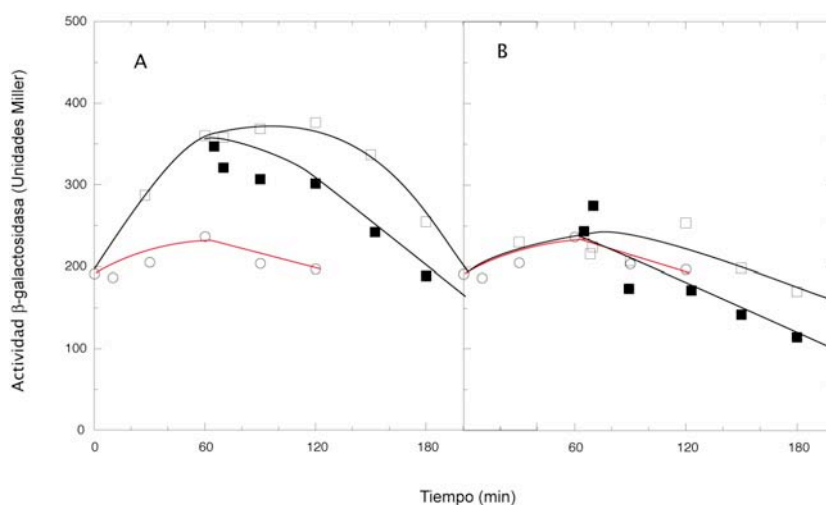


Figura 19. Actividad β -galactosidasa en la estirpe W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla* en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30°C (O). **A)** Tras adición de novobiocina 1mg/ml a tiempo cero a 30°C (□) y cambio de temperatura a 41°C a tiempo 60 minutos (■). **B)** Tras adición de ácido nalidixico 10 μ g/ml a tiempo cero a 30°C (□) y cambio de temperatura a 41°C a tiempo 60 minutos (■).

Se utilizaron diferentes concentraciones de ácido nalidixico, iguales o inferiores a 50 μ g/ml, porque concentraciones mayores producen fragmentación cromosómica y muerte celular (Malik *et al.*, 2006). Se analizó la inducción de la replicación tras estrés térmico en cultivos de AB1157 crecidos a 30°C a los que se añadió ácido nalidixico a las concentraciones: 1, 2, 5, 10, 30 y 50 μ g/ml y, utilizando como control un cultivo que no fue tratado con ácido nalidixico. Transcurrida una hora desde la adición de la droga a 30°C, se añadió rifampicina 150 μ g/ml para inhibir nuevos inicios de replicación y, a la vez, se transfirió una alícuota a 41°C. En la figura 20 se muestran los datos de síntesis relativas de DNA obtenidos tras cuatro horas en presencia de rifampicina para cada una de las concentraciones y/o temperaturas. En estos resultados se muestra una inducción de la replicación tras el cambio de temperatura en presencia de nalidixico que varía en función de la concentración empleada (Fig. 20). A 30°C, la cantidad de DNA sintetizada aumenta a medida que lo hace la concentración de ácido nalidixico empleada, alcanzando su máximo con 5 μ g/ml, y recuperando el mismo valor que en ausencia de nalidixico cuando la concentración empleada fue de 10 μ g/ml. Concentraciones superiores de ácido nalidixico resultaron en una síntesis relativa final de DNA inferior a la de cultivos sin tratamiento con nalidixico. La síntesis de DNA obtenida tras la adición de rifampicina junto con el cambio de temperatura a 41°C en presencia de nalidixico incrementó con la concentración de droga empleada, alcanzando un máximo de acumulación con 10 μ g/ml

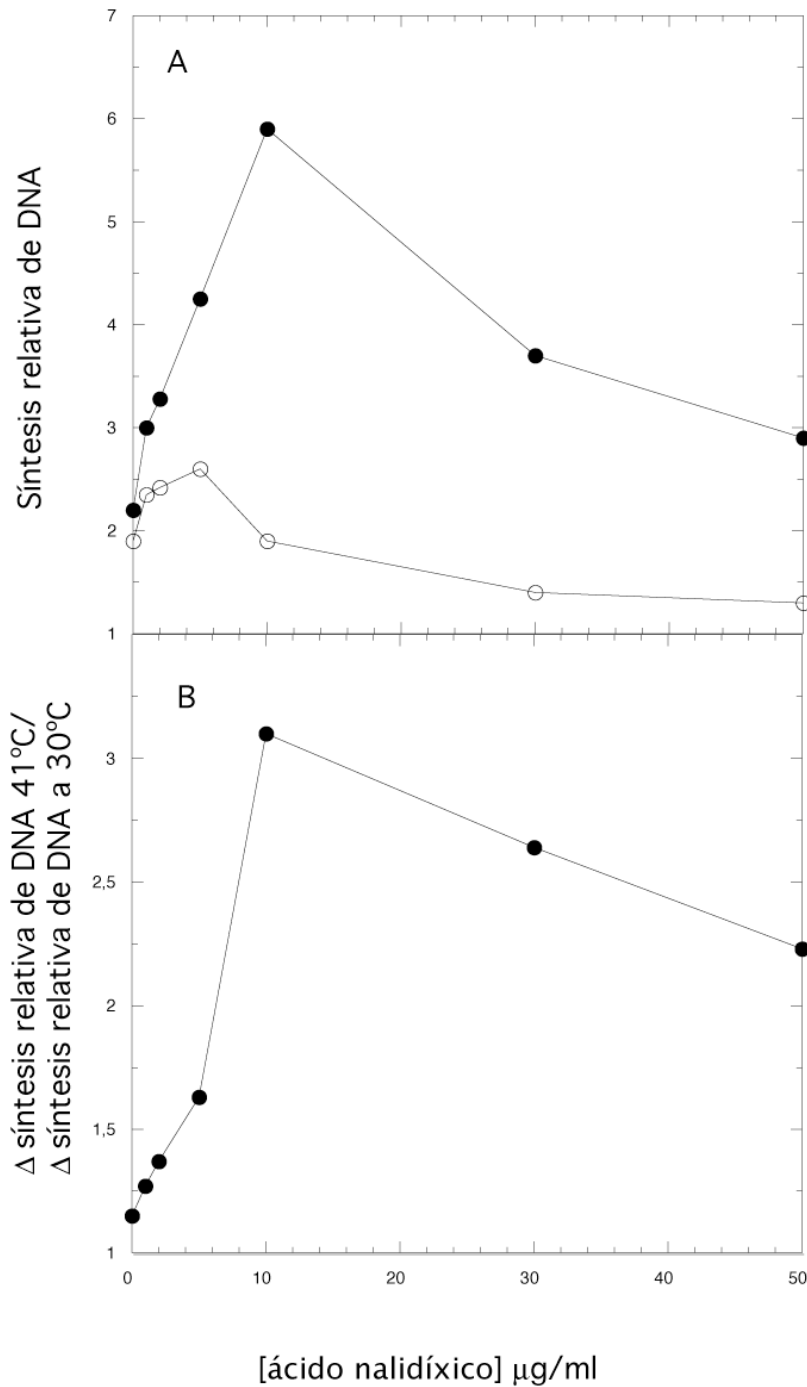


Figura 20. A) Acumulaciones de DNA en la estirpe AB1157 tras tratamiento con diferentes concentraciones de ácido nalidíxico durante una hora y posterior inhibición de nuevos inicios de replicación con rifampicina 150 $\mu\text{g/ml}$ durante cuatro horas a 30°C (○) y tras el aumento de temperatura a 41°C (●). **B)** Incremento relativo de la acumulación de DNA a 41°C respecto a 30°C de las acumulaciones mostradas en A.

(Fig. 20A). Con concentraciones superiores de ácido nalidíxico se consiguieron síntesis relativas de DNA inferiores a las obtenidas con 10 $\mu\text{g/ml}$, pero mayores a las que presentaron los cultivos sin tratamiento.

Ya que la inducción de la replicación es mayor a 41°C que a 30°C, se midió el incremento relativo de las síntesis obtenidas a 41°C relativas a las obtenidas a 30°C. Los valores máximos de síntesis de DNA obtenidos a 41°C respecto a 30°C alcanzaron su máximo a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, con la que se obtuvo un incremento de la síntesis de DNA 3,1 veces superior frente al incremento de 1,15 veces observado en ausencia de pretratamiento con la droga (Fig. 20B).

3.2.1. Niveles de superenrollamiento tras el tratamiento con ácido nalidíxico

Para determinar, si al igual que la novobiocina, el aumento de la replicación observado a 41°C se debe a cambios en el superenrollamiento resultantes de la inhibición de la girasa, se analizó el nivel de superenrollamiento en las condiciones de máxima inducción de replicación tras tratamiento con ácido nalidíxico, es decir, tratando el cultivo a 30°C crecido en LB con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora y posterior cambio de temperatura a 41°C, junto con la inhibición de nuevos inicios de replicación con rifampicina. Se utilizó el sistema *gyrBp-lacZ* para realizar medidas de actividad β -galactosidasa y, por tanto, de los niveles de superenrollamiento en presencia ácido nalidíxico. En la figura 19B, puede observarse que no existen cambios en el nivel de superenrollamiento tras tratamiento con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ ni a 30°C ya que no existen diferencias en los valores de actividad β -galactosidasa a 30°C ni tras el cambio a 41°C.

Se realizaron también experimentos de microarrays de cDNA para monitorizar la transcripción de los SSG en condiciones de inhibición de la girasa con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$, y tras 20 minutos después del cambio de temperatura de 30°C a 41°C, respecto a los niveles de transcripción de estos genes en un cultivo crecido a 30°C. Tras tratamiento con ácido nalidíxico y cambio de temperatura se observó la alteración de 297 genes que no se corresponden con los SSG descritos por Peter y colaboradores. En este experimento los SSG no mostraron cambios significativos en su expresión respecto a la transcripción a 30°C (Anexo II). La expresión de *gidA* tras tratamiento con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ y, posteriormente, cambio de temperatura mostró un valor-p de 0,056. Este dato, justo en el límite de significación de cambios en la expresión podría indicar que este SSG no tiene completamente alterada su expresión, pero que probablemente, concentraciones mayores de ácido nalidíxico que resultan inhibitorias para la elongación de la replicación, resulten en cambios en el superenrollamiento.

De estos análisis puede concluirse que un tratamiento con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ a un cultivo creciendo a 30°C en LB durante una hora y posterior cambio de temperatura durante 20 minutos no conduce a cambios en el superenrollamiento a nivel local (*gyrBp-*

lacZ) ni a nivel global (microarrays de cDNA), al igual que han descrito otros trabajos usando diferentes aproximaciones (Snyder *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 1996).

De estos resultados se concluye que el efecto inductor del ácido nalidíxico sobre la replicación del DNA tras cambio de temperatura no se debe a cambios en el superenrollamiento, como sucede en el mutante *topA10 gyrA923* o en tras el tratamiento con novobiocina. Por tanto, el efecto inductor de la replicación es diferente según la subunidad de la girasa que sea inhibida. Esto puede explicarse porque ambas drogas actúan en diferentes etapas del mecanismo de actuación de la girasa (apartado 1.1.2 de Introducción).

La inhibición por novobiocina impide la reacción de corte del DNA por la girasa al inhibir directamente la actividad ATPasa presente en GyrB, necesaria en las primeras etapas de la reacción de corte. En cambio, el ácido nalidíxico permite que el corte del DNA tenga lugar, pero no la liberación de los extremos de doble cadena generados tras la reacción de corte. Como efecto final de la diferente acción de las dos drogas, la novobiocina relaja el superenrollamiento cromosómico mientras que el ácido nalidíxico no lo hace al formarse complejos ternarios DNA-girasa-ácido nalidíxico que impiden la liberación de los extremos de cadena doble generados.

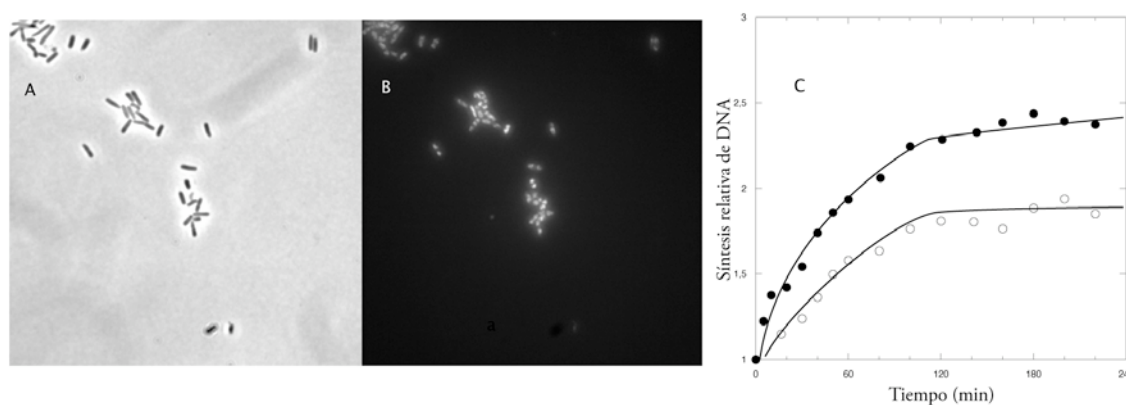
4. EL TRATAMIENTO CON ÁCIDO NALIDÍXICO INDUCE REPLICACIONES DE ESTRÉS TÉRMICO DIFERENTES A HIR

Considerando el alto nivel de inducción de la replicación obtenido tras el tratamiento con ácido nalidíxico, se ha profundizado más en el estudio de estas replicaciones. Estos estudios se han realizado utilizando la concentración subinhibitoria de ácido nalidíxico de 10 µg/ml, dado que es la concentración que da lugar a mayor inducción de la replicación a 41°C que a 30°C.

4.1. LAS REPLICACIONES TERMOINDUCIDAS EN PRESENCIA DE ÁCIDO NALIDÍXICO SE DEBEN AL EFECTO ESPECÍFICO DEL ÁCIDO NALIDÍXICO SOBRE GyrA

Diferentes estudios han demostrado que las quinolonas como el ácido nalidíxico tienen dos dianas celulares, la girasa, como ya se ha mencionado en este trabajo, y la topoisomerasa IV (Topo IV). Topo IV es una topoisomerasa tipo II compuesta por dos subunidades ParC y ParE, análogas, respectivamente, a las subunidades GyrA y GyrB de la girasa (Kato *et al.*, 1992). Para determinar si el efecto inductor de replicación del ácido nalidíxico se debe específicamente a la inhibición de GyrA o está relacionada también con la inhibición de Topo IV, se analizó la termoinducción de la replicación en la estirpe IC2076, mutante *gyrA904* resistente al tratamiento con ácido nalidíxico. Como se observa en la figura 21, el tratamiento con ácido nalidíxico 10 µg/ml no conduce a la inducción

de la respuesta SOS, al no observarse filamentación, ni se detecta un aumento en la inducción de HIR por encima de la inducción en una estirpe silvestre no tratada con nalidixico (Fig. 21). Por tanto, las replicas termoinducidas adicionales a HIR observadas en presencia de ácido nalidixico se deben al efecto específico del ácido nalidixico sobre la subunidad GyrA de la girasa.



D

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	ΔDNA 30°C	ΔDNA 41°C	$\frac{\Delta DNA\ 41^\circ C}{\Delta DNA\ 30^\circ C}$
AB1157	silvestre	1,9	5,9	3,27
IC2076	<i>gyrA904</i>	1,9	2,2	1,15

Figura 21. Morfología celular, distribución de nucleoides y síntesis de DNA en la estirpe IC2076 (A,B y C) tras pretratamiento con ácido nalidixico 10 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora. La síntesis relativa de DNA se determinó tras la adición de rifampicina 150 $\mu\text{g/ml}$ a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) a tiempo cero, que corresponde a una hora después de la adición de ácido nalidixico. (D) Tabla con los valores de síntesis relativa finales a 30°C (ΔDNA 30°C) y tras el cambio a 41°C (ΔDNA 41°C) y el incremento relativo obtenido a 41°C respecto a 30°C (ΔDNA 41°C/ ΔDNA 30°C).

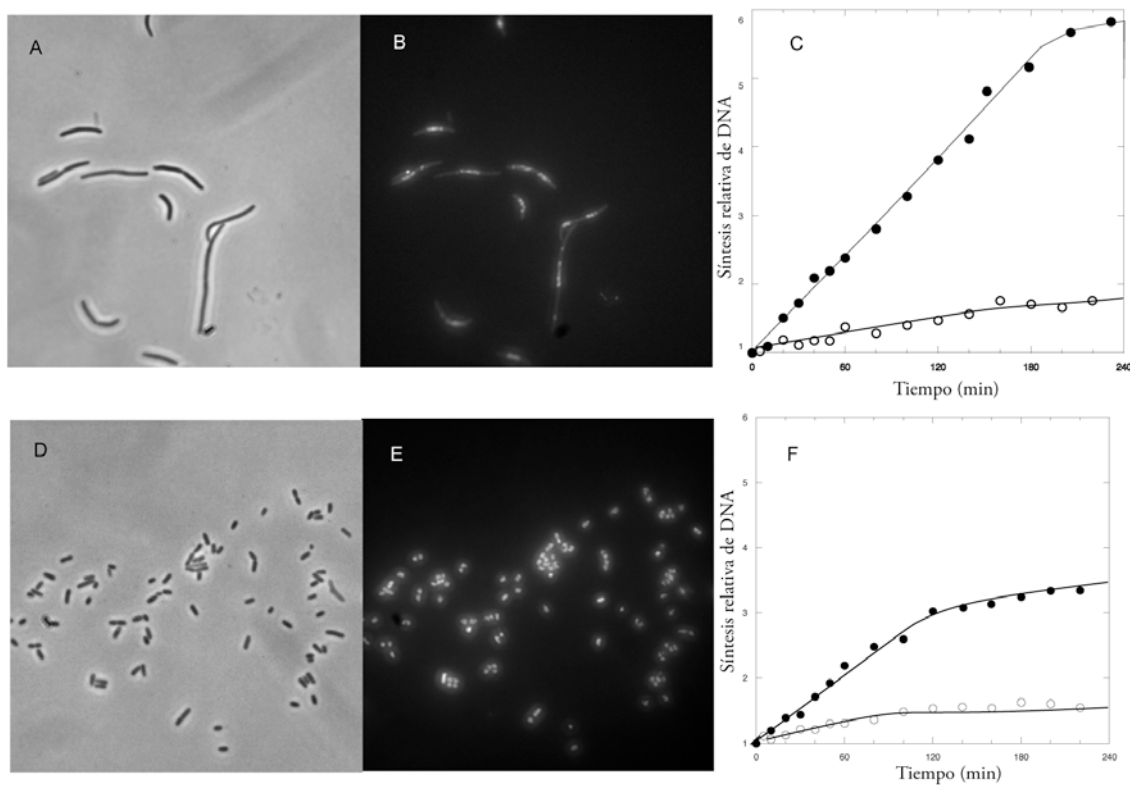
4.2. LAS REPLICACIONES TERMOINDUCIDAS EXTRAS OBTENIDAS EN PRESENCIA DE NALIDÍXICO SON INDEPENDIENTES DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS

La adición de ácido nalidíxico a un cultivo es un tratamiento inductor de la respuesta SOS. T. Kogoma demostró que en presencia de un tratamiento inductor de la respuesta SOS se induce una replicación a la que llamó iSDR, por lo que las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico podrían estar relacionadas con iSDR (Kogoma, 1997). Con el objeto de determinar si la inducción de la respuesta SOS está relacionada con la inducción de la replicación por ácido nalidíxico, se analizó su inducción de replicación en la estirpe GY773, que lleva la mutación *lexA3* (Ind⁻) y no induce respuesta SOS al ser incapaz de incrementar los niveles de proteína RecA en su conformación activa tras un tratamiento inductor de SOS.

Una de las manifestaciones de la inducción de la respuesta SOS es la filamentación celular (Schoemaker *et al.*, 1984). Para ver si la inducción de la replicación por ácido nalidíxico constituye también un tratamiento inductor de respuesta SOS se analizó la morfología celular y distribución de nucleoides por microscopía óptica. El tratamiento con ácido nalidíxico 10 µg/ml durante una hora induce filamentación en el cultivo de la estirpe silvestre AB1157 (Fig. 22 A, B). Esta filamentación no se observa en el mutante *lexA3* (Ind⁻) siendo este resultado indicativo de la no inducción de la respuesta SOS en este mutante (Figura 22 D, E). Por tanto, el tratamiento con ácido nalidíxico 10 µg/ml es un tratamiento inductor de la respuesta SOS en la estirpe silvestre, pero no en el mutante *lexA3* (Ind⁻).

Se analizó la termoinducción de la replicación en el mutante *lexA3* (Ind⁻) tras un tratamiento con ácido nalidíxico 10 µg/ml durante una hora tras la cual se inhibieron nuevos inicios de replicación por adición de rifampicina a 30°C y junto con el cambio de temperatura a 41°C. El incremento de la síntesis relativa de DNA a 41°C respecto a 30°C fue de 2,34 veces. El mismo tratamiento produjo en una estirpe silvestre un incremento relativo de 3,27 veces.

Por tanto, aunque en menor nivel que un silvestre, el mutante *lexA3* (Ind⁻) presenta replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico 10 µg/ml. Esta replicación no está relacionada con la replicación iSDR descrita por T. Kogoma que sí necesita la activación de la respuesta SOS para su inducción.



G

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	Δ DNA 30°C	Δ DNA 41°C	Δ DNA 41°C/ Δ DNA 30°C
AB1157	silvestre	1,9	5,9	3,27
GY773	<i>lexA3</i> (Ind ⁻)	1,45	3,4	2,34

Figura 22. Morfología celular, distribución de nucleoides y síntesis de DNA de las estirpes AB1157 (A, B y C) y GY773 (*lexA3* Ind⁻) (D, E y F) tras pretratamiento con ácido nalidixico 10 μ g/ml durante una hora y posterior adición de rifampicina 150 μ g/ml a 30°C (O) y tras cambio a 41°C (●). Las muestras para microscopía se tomaron tras una hora de tratamiento con ácido nalidixico 10 μ g/ml, justo antes de la adición de rifampicina. (G) Síntesis relativa de DNA finales a 30°C (Δ DNA 30°C) y tras el cambio a 41°C (Δ DNA 41°C) y el incremento relativo obtenido a 41°C respecto a 30°C (Δ DNA 41°C/ Δ DNA 30°C).

4.3. LAS REPLICACIONES TERMOINDUCIDAS EN PRESENCIA DE ÁCIDO NALIDÍXICO INICIAN EN *oriC* Y REQUIEREN PARCIALMENTE LA FUNCIONALIDAD DE *oriC*

En una célula estirpe de *E. coli* creciendo en condiciones normales, *oriC* es el único lugar cromosómico para el inicio de la replicación. Con el objeto de determinar dónde tiene lugar el inicio de las replicaciones observadas tras el tratamiento con ácido nalidixico, se llevaron a cabo experimentos de frecuencia génica mediante microarrays de DNA genómico (apartado 12.2 de Métodos).

Cultivos de la estirpe silvestre AB1157 se crecieron en LB a 30°C y a una densidad óptica entre 0,06 y 0,08 fueron pretratados con ácido nalidixico 10 µg/ml durante una hora. Transcurrido este tiempo, se inhibieron nuevos inicios de replicación por adición de rifampicina 150 µg/ml a 30°C y se transfirió una alícuota del cultivo a 41°C. Las muestras con las que se llevó a cabo el análisis de microarrays de DNA genómico se tomaron una hora después de la adición de rifampicina. En la figura 23, se muestra la frecuencia génica obtenida al comparar la muestra tomada a 30°C con la del cultivo a 41°C. La posición 0 donde se sitúa *oriC* se corresponde con la posición 3,92 Mpb del cromosoma de *E. coli*. Los resultados muestran que en las inmediaciones de *oriC* es donde se localizó el mayor número de copias en la muestra de DNA genómico obtenida tras el cambio de temperatura a 41°C (Figura 23A). Este resultado indica que el lugar de la iniciación de la replicación termoinducida en presencia de ácido nalidixico es *oriC*. En el perfil de la figura 20A se observa un segundo pico a la derecha de *oriC*, en la posición 4,6 Mpb del cromosoma, donde no se localiza ningún origen de replicación descrito. Perfiles de frecuencia génica con este segundo pico han sido encontrados en el análisis de la replicación mediante microarrays en mutantes *seqA* en condiciones de sobreproducción de DnaA (Riber *et al.*, 2006).

Para determinar si *oriC* es el único sitio del cromosoma donde tiene lugar el inicio de las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidixico, se analizó la frecuencia génica mediante microarrays en la estirpe CM1671 ($\Delta oriC1071$ *zif::F*) que presenta una delección total de *oriC*. Para la obtención de las muestras de DNA genómico de CM1671 se procedió del mismo modo que el descrito para la estirpe AB1157. En CM1671 no se observó ninguna zona del cromosoma con mayor o menor frecuencia a 41°C que a 30°C (Fig. 23B). Este resultado permite concluir que *oriC* es el único lugar del cromosoma de *E. coli* donde se inician las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidixico, al igual que HIR.

Las replicaciones de CM1671 y de su estirpe parental CM1588 se analizaron en presencia de ácido nalidixico 10 µg/ml. Los resultados de síntesis relativa de DNA, obtenidos tras cuatro horas de tratamiento con rifampicina, muestran que para la estirpe CM1671 se obtuvo la misma acumulación de DNA a 30°C que a 41°C, mientras que se observó una inducción de la replicación a 41°C de 2,28 respecto a 30°C (Tabla 17). Estos

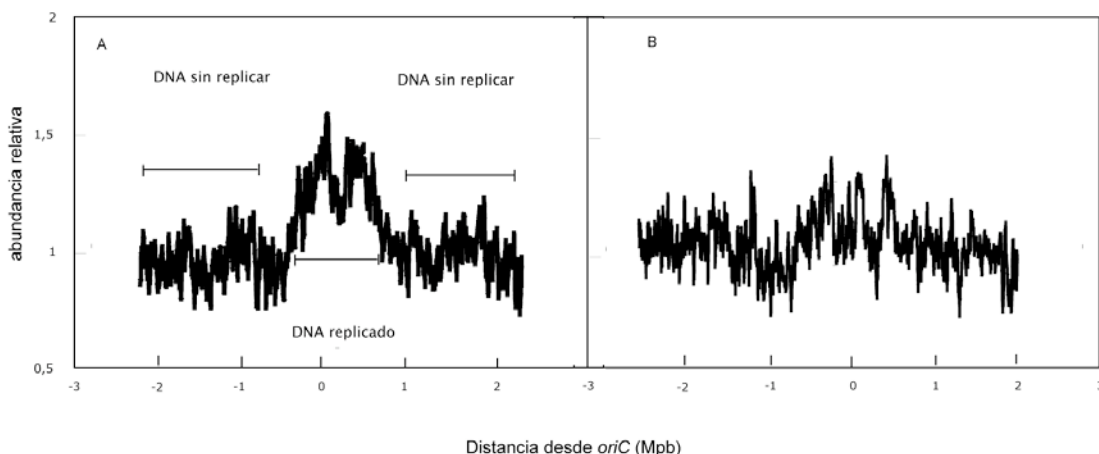


Figura 23. Análisis de la frecuencia génica en la estirpe AB1157 (A) y CM1671 (B) mediante microarrays de DNA genómico. Las muestras de DNA genómico se tomaron de cultivos crecidos en LB a los que se les adicionó ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ a densidad óptica entre 0,06 y 0,08 y una hora más tarde rifampicina 150 $\mu\text{g/ml}$, junto con el cambio a 41°C. Las muestras de DNA se tomaron una hora después de la adición de rifampicina. Cada microarray representa la relación entre las muestras obtenidas tras el cambio a 41°C (Cy5-dUTP) y a 30°C (Cy3-dUTP). El análisis del microarray se llevó a cabo como se describe en el apartado 13.1 de Métodos. El eje de abscisas representa la localización cromosómica de cada ORF en mega pares de bases (Mpb) según las posiciones descritas por Blattner y col., con *oriC* localizado en la posición 0 (Blattner *et al.* 1997). El eje de ordenadas representa la dosis génica relativa (abundancia). La abundancia del término fue fijada a 1 en ambas gráficas. Las líneas representan las medias móviles obtenidas para cada 20 ORFs.

resultados, como los obtenidos del análisis de microarrays de DNA genómico, muestran que no existe inducción de la replicación tras estrés térmico en ausencia de *oriC*.

Una vez localizado en *oriC* el inicio de las replications termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico, se planteó determinar si estas replications requieren un *oriC* funcional. Se estudió la inducción de la replicación en presencia de ácido nalidíxico en las estirpes *intFs-B* ($\Delta 16\text{pb}(13\text{mero-L})::\text{pAE15}$), los mutantes de delección de 16 pb del 13mero-L y la replicación controlada por el plásmido F, y JK876 (*dnaA46^{ts}*), que expresa una proteína DnaA termosensible. Los resultados de síntesis relativa de DNA obtenidos a 30°C y a 41°C tras el tratamiento con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora y posterior inhibición de replicación con rifampicina se muestran en la tabla 17. El incremento de la síntesis relativa de la acumulación de DNA obtenida a 41°C respecto a la obtenida a 30°C fue 1,67 en la estirpe *intFs-B* y del 1,37 en JK876, inferior en ambos casos a los incrementos 2,33 y 2,13 obtenidos en sus correspondientes estirpes parentales (Tabla 17). Por tanto, existe una inducción parcial de la replicación en ausencia del 13mero-L o de la proteína DnaA.

Tabla 17. Síntesis relativa de DNA tras cuatro horas desde la adición de rifampicina 150 µg/ml en cultivos tratados, previamente a la adición de rifampicina durante una hora, con ácido nalidíxico 10 µg/ml.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	ΔDNA 30°C	ΔDNA 41°C	ΔDNA 41°C/ ΔDNA 30°C
CM1588	(<i>oriC+</i> <i>zif::F</i>)	1,4	3,2	2,28
CM1671	Δ <i>oriC1071</i> <i>zif::F</i>	1,4	1,4	1
CM735	silvestre	1,5	3,5	2,33
intFs-B	(Δ16pb(13mero-L)::pAE15)	1,12	1,875	1,67
JK607	silvestre	1,5	3,2	2,13
JK876	<i>dnaA46^{ts}</i>	1,2	1,65	1,37

4.4. LAS REPLICACIONES TERMOINDUCIDAS EN PRESENCIA DE ÁCIDO NALIDÍXICO NO SINTETIZAN CROMOSOMAS COMPLETOS

Las condiciones experimentales con las que se trabajó en los experimentos de frecuencia génica mediante microarrays permiten deducir que las replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidíxico avanzan desde *oriC*, recorren aproximadamente entre 1/3 y un 1/4 del cromosoma de *E. coli* en una hora (Fig. 23A). Para comprobar si estas replicaciones dan lugar a cromosomas completos, se analizó esta replicación mediante citometría de flujo. Se cultivó la estirpe AB1157 a 30°C en medio mínimo M9 con casaminoácidos y, al inicio de la fase exponencial, se trató con ácido nalidíxico 10 µg/ml. Una hora después se inhibieron nuevos inicios de replicación por adición de rifampicina y nuevas divisiones celulares con cefalexina en el cultivo creciendo a 30°C y en una alícuota que se transfirió a 41°C. Cuatro horas después del tratamiento se analizaron mediante citometría de flujo. Como control se utilizaron cultivos de AB1157 tratados con rifampicina y cefalexina, pero sin pretratamiento con ácido nalidíxico. Las muestras pertenecientes a los cultivos crecidos en ausencia de ácido nalidíxico presentan picos resueltos de DNA correspondientes a 2 y 4 cromosomas completos (Fig. 24 A y B). Tras el tratamiento con ácido nalidíxico las distribuciones del DNA obtenidas no corresponden a cromosomas completos y, en esas condiciones, pueden observarse células con más de 8 cromosomas equivalentes tanto a 30°C como a 41°C (Fig. 24 C y D). Por tanto puede concluirse, tanto de los datos de citometría como de los obtenidos de la frecuencia génica del apartado 4.1 de este capítulo, que las replicaciones

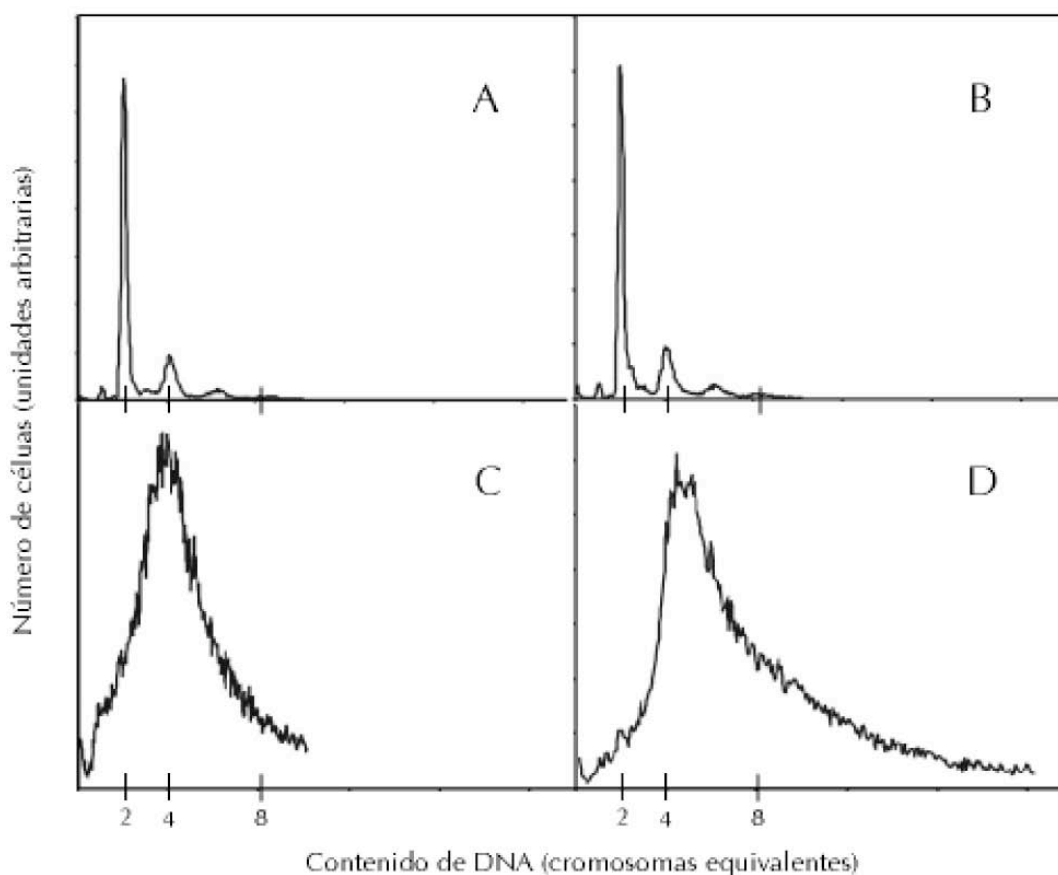


Figura 24. Histogramas de DNA de la estirpe AB1157 analizada por citometría de flujo cuatro horas después de la adición de rifampicina 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina 50 $\mu\text{g/ml}$ creciendo exponencialmente a 30°C (A), junto con el cambio a 41°C (B), una hora posterior a la adición de ácido nalidixico 10 $\mu\text{g/ml}$ a 30°C (C) y una hora posterior a la adición de ácido nalidixico 10 $\mu\text{g/ml}$ y junto con el cambio a 41°C (D).

inducidas en presencia de nalidixico son numerosas y no dan lugar a cromosomas completos. Una causa de la ausencia de cromosomas completamente replicados tras el tratamiento con ácido nalidixico y rifampicina podría ser la fragmentación cromosómica. Estudios previos han determinado la existencia de fragmentación cromosómica durante el tratamiento con quinolonas. La existencia de esta fragmentación sólo puede detectarse en condiciones de desnaturalización, como es en presencia de detergentes (Malik *et al.*, 2006). La formación del complejo ternario DNA-girasa-quinolona hace que el DNA cortado por la acción de la girasa de lugar a DSBs que quedan atrapadas y no disponibles para la degradación por nucleasas celulares.

Para determinar la existencia de DSBs tras tratamiento con ácido nalidixico 10 $\mu\text{g/ml}$, se crecieron cultivos bacterianos de las estirpes AB1157 y JC1955 (*recB21 recC22*) en MM9 con casaminoácidos a 30°C. Al inicio de la fase exponencial, los cultivos fueron tratados con ácido nalidixico 10 $\mu\text{g/ml}$ y una hora más tarde con rifampicina para inhibir

nuevos inicios de replicación. Las muestras para la determinación de la fragmentación del DNA se tomaron una hora después del tratamiento con rifampicina. Se usaron como control cultivos de ambas estirpes que fueron tratados del mismo modo, pero a los que no se adicionó ácido nalidixico. Los resultados presentados en la tabla 18 muestran que no hay diferencias en el porcentaje de DNA lineal obtenido en la estirpe silvestre en presencia o ausencia de ácido nalidixico. En todas las situaciones analizadas el porcentaje de DNA lineal obtenido se sitúa en torno al 10% (Tabla 18). La estirpe JC5519 presentó DNA lineal en torno al 42% en las muestras tratadas con ácido nalidixico, siendo este porcentaje aproximadamente el doble que el obtenido en su ausencia. Por tanto, el tratamiento con ácido nalidixico 10 µg/ml da lugar a la aparición de DSBs en el DNA que sólo se observa en una estirpe *recB recC*.

Tabla 18. DNA lineal en la estirpe silvestre AB1157 y en el mutante JC5519 (*recB21 recC22*) medidos mediante PFGE, creciendo exponencialmente a 30°C (30°C), una hora tras el cambio a 41°C(41°C) y una hora después de la adición de rifampicina 150 µg/ml a un cultivo pretratado durante una hora con ácido nalidixico 10 µg/ml a 30°C (NalRif30°C) y junto con el cambio a 41°C (NalRif41°C)

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	%DNA lineal			
		30°C	41°C	NalRif30°C	NalRif41°C
AB1157	silvestre	10,70	N.D.	10,3	11,4
JC5519	<i>recB21 recC22</i>	20,36	17,50	42,41	43,56

CAPÍTULO 3. REQUERIMIENTOS FUNCIONALES DE HIR

HIR, a diferencia de la replicación cíclica, no requiere ni la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de novo de proteínas, y depende de la proteína RecA (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). El requerimiento de la función de RecA es común a HIR y a las replications estables (ISDR y cSDR). Sin embargo, existen otras diferencias entre ambos tipos de replicación (apartado 5.3 de Introducción).

En este capítulo se presentan las funciones requeridas por HIR de proteínas de iniciación de la replicación, de ensamblaje del primosoma y de los componentes del replisoma, así como de recombinación y reparación. Estas funciones se han analizado con el objetivo de elucidar el mecanismo mediante el cual HIR tiene lugar. Para ello se ha estudiado la inducción de HIR en estirpes mutantes en los genes que codifican las diferentes proteínas que constituyen los diferentes complejos funcionales y se han considerado las similitudes y las diferencias con la replicación cíclica y la replicación estable.

Este estudio permite concluir que HIR requiere la funcionalidad de la proteína DnaA y presenta dependencia de la actividad de mantenimiento de estructuras de replicación asociada a RecA. Se ha detectado la dependencia específica de la vía PriA-PriB de ensamblaje del primosoma. El replisoma de HIR, que presenta una menor velocidad de replicación respecto a la replicación cíclica, además de requerir la actividad de la DNA Pol III, requiere estrictamente la actividad de la DNA Pol I. Los resultados obtenidos muestran que HIR no es una RDR (replicación dependiente de recombinación) porque no se forman estructuras en lazo-D que pudieran justificar el inicio de la replicación HIR.

1. INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN HIR

Como se ha comentado en la Introducción, la iniciación de la replicación requiere la formación de un complejo abierto estable donde pueda ensamblarse el replisoma. En los capítulos 1 y 2 de Resultados, se presenta que la formación de un complejo abierto en HIR probablemente se alcanza mediante la desestabilización termodinámica del 13mero-L de *oriC* y que esta apertura depende del estado topológico del cromosoma. Sin embargo, a pesar de que la unión simultánea de la proteína DnaA a sus secuencias de unión en *oriC* no es requerida para HIR (apartado 2 del Capítulo 1 de Resultados), la proteína DnaA podría ser necesaria en estadios posteriores a la formación del complejo abierto para asegurar que éste sea estable y que conduzca a la formación de un replisoma funcional.

1.1. DnaA ES REQUERIDA PARA EL INICIO DE HIR

DnaA presenta diferentes funciones en el inicio de la replicación cíclica. Basándose en estudios de rayos X de la estructura de la proteína DnaA obtenida de *Aquifex aeolicus* y en pruebas genéticas y bioquímicas, se ha propuesto que DnaA posee cuatro dominios funcionales: i) *dominio I* o dominio de mantenimiento de DnaB en el complejo precebador, ii) *dominio II* o dominio de unión transitoria a DnaB, iii) *dominio III* o dominio de unión a ATP y iv) *dominio IV* o dominio de unión al DNA. DnaA también presenta residuos específicos que son requeridos para la auto-oligomerización, en los dominios I y III, y para la interacción con los fosfolípidos de membrana, entre los dominios III y IV. (Erzberger *et al.*, 2002; Messer *et al.*, 1999; Kaguni, 2006).

En el complejo de iniciación DnaA es necesaria para la formación del complejo abierto. Tras el reconocimiento de *oriC*, es necesaria la formación de un complejo oligomérico de aproximadamente 30 proteínas DnaA que establecen el complejo abierto y éste facilita la entrada de la helicasa DnaB, ayudada por su cargador DnaC, al complejo precebador (apartado 3.2.1. de Introducción). Sin embargo, la actividad de DnaA no es necesaria para el inicio de la replicación en iSDR ni en cSDR (Kogoma, 1997).

Con el objeto de determinar si la proteína DnaA es necesaria para el inicio de HIR, se analizó la inducción de HIR en diferentes mutantes *dnaA* (apartado 4.2 de Métodos). Se utilizaron estirpes donde la proteína DnaA está mutada en uno o varios de sus dominios (Tabla 19). Se analizó la inducción de HIR en la bacteria JK876 que presenta la mutación *dnaA46* (Hansen y Rasmussen, 1977). Esta mutación codifica una proteína termosensible para la iniciación de la replicación cromosómica al ser deficiente en la actividad ATPasa localizada en el dominio III que es requerida para el paso de DnaA a su forma activa DnaA-ATP (apartado 3.2.1 de Introducción). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19 e indican que el mutante *dnaA46* es incapaz de inducir HIR. Por tanto, la proteína DnaA es necesaria para el inicio de la replicación HIR. Felczak y Kaguni determinaron que la mutación *dnaA46* es recesiva frente a la mutación *dnaAR281A* cuando la proteína DnaAR281A es expresada desde un plásmido (Felczak y Kaguni, 2004). El mutante *dnaAR281A* ineficaz para la entrada de DnaB. Este mutante no presentó inducción de HIR (Tabla 19).

La inducción de HIR se analizó también en las bacterias JK915 y JK916 que presentan las mutaciones *dnaA5* y *dnaA508* respectivamente, ambas termosensibles en la iniciación de la replicación cromosómica. *dnaA5* presenta dos mutaciones, una localizada en el dominio III cerca de la región de unión de ATP y la segunda en el dominio IV o de unión a DnaA. El mutante *dnaA508* afecta al dominio I o dominio de retención de DnaB (Hinds y Sandler, 2004). No se observó inducción de HIR en ninguno de estos mutantes (Tabla 19). Por tanto, de estos resultados puede deducirse que HIR requiere la proteína DnaA en su conformación activa, unida a ATP y oligomérica, y que su función no

Tabla 19. Dependencia de las actividades de la proteína DnaA en *oriC* y *oriR1* para HIR.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	DOMINIO AFECTADO	ACTIVIDAD DnaA	HIR (i%)
JK607	silvestre	ninguno	silvestre	19,7
JK876	<i>dnaA46^{ts}</i>	III	ATPasa -	0
JK894	<i>dnaA46/dnaAR281A</i>	III	interacciones DnaA-DnaA -	0
JK915	<i>dnaA5^{ts}</i>	III y IV	ATPasa- y unión a DNA -	0
JK916	<i>dnaA508^{ts}</i>	I	interacción con DnaB -	0
LK211	Δ 16pb (13mero-L) ::pKN1562	ninguno	silvestre	22,8
RG801	Δ 16pb (13mero-L) ::pKN1562/ <i>dnaA850::Tn10</i>	todos	nula	15

sería la apertura de las cadenas de DNA, sino facilitar la entrada y el mantenimiento de DnaB en el complejo de replicación.

Se determinó si este requerimiento de DnaA es específica de *oriC* o es también requerido para la inducción de HIR en *oriR1*. Estudios previos han demostrado que DnaA es requerida para la replicación en R1 *in vitro*, pero no *in vivo*. En el capítulo 1 de Resultados se muestra que HIR es inducida a partir de un R1 integrado en un cromosoma con la delección de *oriC* total o parcial. Cuando se estudió HIR en las estirpes LK211 y RG801 (LK211 *dnaA850::Tn10*), que no expresa la proteína DnaA, se observó la inducción de HIR en ambas estirpes. LK211 presentó niveles silvestres de HIR y RG801 mostró un nivel más bajo. Por tanto, HIR iniciada en R1 no requiere la presencia de la proteína DnaA *in vivo*, de igual forma que no la requiere la replicación de R1. Puede concluirse, por tanto, que la replicación térmica iniciada a partir de un plásmido R1 integrado, a diferencia de la iniciada a partir de *oriC*, no requiere la actividad de DnaA.

2. ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA

Los complejos formados por DnaA durante la iniciación de la replicación en *oriC* tienen como finalidad la entrada de la helicasa DnaB en la horquilla de replicación y difieren de los mediados por PriA para la reanudación de las horquillas de replicación paradas durante la elongación, tanto en sus componentes proteínicos como en la estructura del DNA. Ambos tipos de complejos, sin embargo, proporcionan un mecanismo de apertura de la doble hélice, son reconocidos por DnaB-DnaC y su finalidad es la entrada de DnaB al replisoma (revisado en Messer, 2002).

Existen, al menos, tres mecanismos de replicación diferentes a HIR y para sus iniciaciones se han descrito dos complejos distintos para ayudar a la carga de DnaB en la horquilla de replicación, uno utiliza la proteína DnaA (replicación cíclica) y otros requieren el ensamblaje mediado por PriA-PriB/PriC (SDR) (apartado 2.2.2 de Introducción).

2.1. HIR REQUIERE LA ACTIVIDAD DE ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA DE PriA, PERO NO SU ACTIVIDAD HELICASA

PriA presenta dos dominios funcionalmente diferentes: (i) el dominio N-terminal de reconocimiento de estructuras en lazo-D y ensamblaje del primosoma y (ii) el dominio con actividad helicasa y ATPasa (Tanaka *et al.*, 2003). Mutantes afectados en el dominio helicasa son capaces de iniciar la replicación a partir de una estructura en lazo-D sintética, siendo este dominio innecesario para la actividad de ensamblaje del primosoma vía PriA (Liu *et al.*, 1999; Zavitz y Marians, 1992).

El primer paso para la caracterización del primosoma en HIR fue determinar si la proteína PriA era necesaria. Para ello, se estudió la inducción de HIR en la estirpe RG731 portadora de la mutación nula *priA2::Km* y en su parental silvestre AB1157. Los datos obtenidos indican que no hay HIR en el mutante *priA2::Km* (Tabla 20). De este resultado puede concluirse que la proteína PriA es necesaria para HIR.

El paso siguiente fue determinar qué funciones de PriA son necesarias para HIR. Para ello, se utilizó la estirpe JJC1431 que lleva la mutación *priA300* (K230R). Este mutante tiene anuladas las actividades ATPasa y helicasa pero mantiene la actividad de ensamblaje del primosoma (Zavitz y Marians, 1992). El análisis de la replicación en esta estirpe mostró niveles silvestres de HIR (Tabla 20). Por tanto, la función de PriA requerida para HIR es la de ensamblaje del primosoma y no su actividad helicasa. La actividad helicasa requerida para HIR durante el ensamblaje del primosoma debe ser realizada por otra helicasa y no por PriA, o bien podría ser que la apertura de la doble hélice favorecida por el estrés térmico permitiera el ensamblaje del primosoma sin necesidad de actividad helicasa.

Tabla 20. Dependencia de las actividades de PriA para HIR.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	ACTIVIDAD PriA	HIR (%)
AB1157	silvestre	silvestre	21,9
RG731	<i>priA2::Km</i>	nula	0
JJC1431	<i>priA300</i>	helicasa nula	18

2.2. LA SOBREPDUCCIÓN DE PriA INCREMENTA LA INDUCCIÓN DE HIR

La estirpe RG742 contiene el alelo *priA2::Km* en su cromosoma y lleva el plásmido de alto número de copias pAM34 que contiene el gen silvestre *priA* clonado bajo el control del promotor *lac*. En este plásmido la expresión de la proteína PriA depende de la adición de IPTG al medio de cultivo (Gil y Bouche, 1991).

El efecto de un nivel alto de PriA sobre la inducción de HIR se analizó estudiando la replicación en la estirpe RG742 en presencia o ausencia de IPTG. Cuando no se adicionó IPTG al cultivo, no se observó HIR. Sin embargo, cuando se indujo la expresión de PriA con 500 μ M de IPTG, los niveles de HIR obtenidos fueron dos veces superiores a los de la estirpe silvestre (Tabla 21). Estos resultados confirman la necesidad de la proteína PriA para la inducción de HIR. Al ser pAM34 un plásmido de alto número de copias, la inducción de la expresión de PriA a partir de él resultará en un nivel de proteína muy superior al de la estirpe silvestre. Dado que el valor de HIR obtenido en RG742 en presencia de IPTG es muy superior al obtenido en una estirpe silvestre, se puede concluir que, en la replicación termoinducida, el ensamblaje del primosoma vía PriA debe ser un paso limitante y dependiente de la concentración de la proteína PriA.

2.3. EL ENSAMBLAJE DEL PRIMOSOMA DE HIR TIENE LUGAR VÍA PriA-PriB

Diferentes estudios han demostrado que PriB y PriC participan junto con PriA en rutas redundantes para la restauración de la replicación durante el crecimiento exponencial en *E. coli*. El papel propuesto para PriB es la estabilización de PriA para que pueda interactuar directamente con DnaT. El papel de PriC es incierto aunque se ha descrito su actuación en diferentes vías (Fig. 5; Sandler, 2001).

Para determinar la dependencia de la replicación termoinducida de alguna de las proteínas del ensamblaje del primosoma dependiente de PriA, se analizó HIR en dos mutantes nulos *priB* y *priC*. En la estirpe JJC1506, que presenta la mutación $\Delta priB302$, no se observó

Tabla 21. HIR en ausencia y tras sobreexpresión de PriA.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	IPTG	HIR (i%)
AB1157	silvestre	-	21,9
RG742	<i>priA2::Km</i> /pAM34 <i>priA+</i>	-	0
RG742	<i>priA2::Km</i> /pAM34 <i>priA+</i>	+	42,6

inducción de HIR, mientras que la estirpe JJC1431 con la mutación $\Delta priCB303$ presentó una inducción de HIR similar a su estirpe parental, JJC520 (Tabla 22). Por tanto, puede concluirse que HIR necesita el ensamblaje del primosoma vía PriA-PriB y no vía PriA-PriC.

2.4. *dnaC809* SUPRIME LA DEPENDENCIA DE PriA DURANTE HIR

Mutaciones en *dnaC*, como *dnaC809* y *dnaC820*, pueden suprimir el fenotipo de carencia de PriA (Hinds y Sandler, 2004). La base molecular de esta supresión no es del todo conocida. Se ha encontrado que la mutación *dnaC809* permite la viabilidad del doble mutante *priB priC*, inviable en ausencia de esta mutación (Sandler, 1999). En el caso de cSDR, la mutación *dnaC809* suprime la necesidad de PriA (Sandler, 2005). Considerando que HIR es un proceso dependiente de PriA, igual que SDR, se analizó HIR en la estirpe JC19008, que presenta las mutaciones *priA2::Km* y *dnaC809*, para comprobar si la dependencia de PriA era suprimida por *dnaC809*.

En la estirpe JJC19008, se obtuvo una inducción de HIR en el 38% de los orígenes presentes, mayor al 21,9% obtenido en su estirpe parental AB1157 y muy diferente a la nula inducción observada en RG731, el mutante nulo *priA2::Km* (Fig. 25). Por tanto, se deduce que la proteína DnaC809 puede suplir la función de PriA en el ensamblaje del primosoma en HIR.

2.5. HIR REQUIERE LA ACTIVIDAD HELICASA DE Rep

La proteína Rep, una helicasa 3', presenta, al menos, dos funciones durante el crecimiento exponencial en *E. coli*: estabiliza el avance de la horquilla de replicación durante la síntesis de DNA y actúa junto con PriC en una ruta de ensamblaje del primosoma independiente de PriA (Uzest *et al.*, 1995; Seigneur *et al.*, 1998; Sandler, 2001). En un fondo genético *rep* se ha demostrado la presencia de un mayor número de roturas del DNA de doble cadena (DSBs). Estas roturas necesitan ser reparadas para evitar la degradación del cromosoma que llevaría a la muerte celular (Michel *et al.*, 1997).

Tabla 22. HIR en mutantes nulos *priB* y *priC*

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	HIR (%)
JJC520	silvestre	12,7
JJC1506	$\Delta priB302$	0
JJC1431	$\Delta priC303$	14

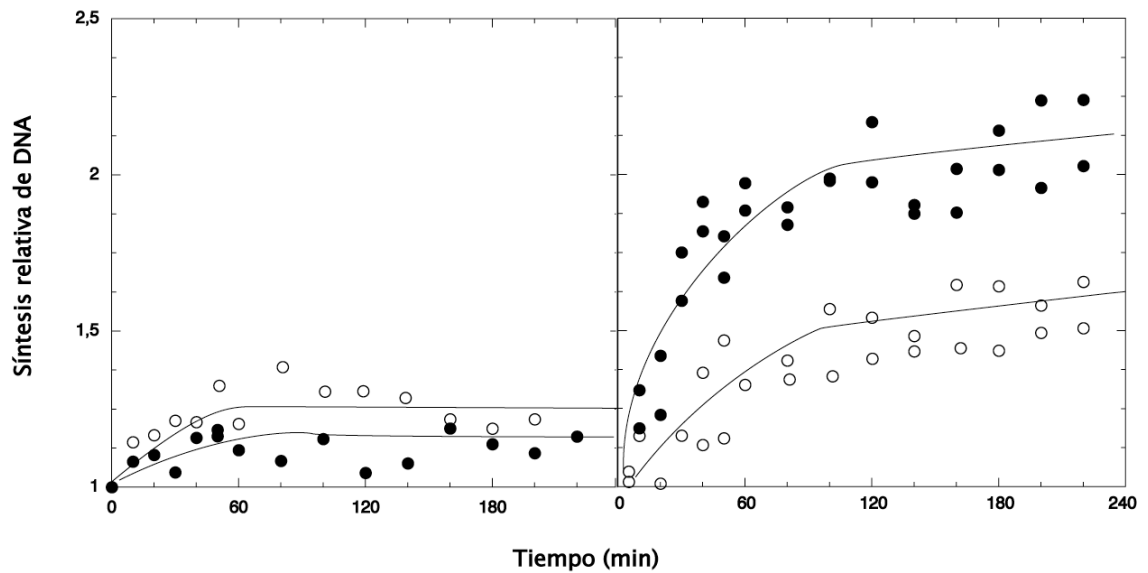


Figura 25. Acumulación de DNA tras la adición de rifampicina a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) en las estirpes RG731 (*priA2::kan*) (A) y JC19008 (*priA2::kan dnaC809*) (B).

En este trabajo se ha analizado la dependencia funcional de HIR de la helicasa Rep. Los datos presentados en la tabla 23 indican que la estirpe RG737, mutante nulo $\Delta rep::Km$, no mostró inducción de HIR, lo que permite proponer que la actividad de la proteína Rep es esencial para la inducción de HIR. Como se ha mencionado en el apartado 2.1 de este capítulo, la actividad helicasa de PriA no es necesaria para el ensamblaje del primosoma en HIR. La proteína Rep podría facilitar el ensamblaje del primosoma aportando su actividad helicasa o, alternativamente, Rep podría ser requerida durante la etapa de elongación de HIR, favoreciendo el avance de la horquilla de replicación, de igual forma que en la replicación cíclica.

Tabla 23. Dependencia de la helicasa Rep en HIR

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	HIR (%)
AB1157	silvestre	21,9
RG737	$\Delta rep::Km$	0

3. EL REPLISOMA

Durante la replicación, las DNA polimerasas interactúan con otras muchas proteínas. Además de la polimerización de nucleótidos, el replisoma requiere dos actividades básicas: la actividad helicasa de DnaB para separar la doble hélice, y la actividad de cebado de la primasa, para sintetizar los cebadores de RNA que son requeridos para iniciar la síntesis de DNA en cada fragmento de la cadena discontinua. El complejo constituido por estas y otras proteínas auxiliares es el replisoma.

3.1. HIR REQUIERE LAS ACTIVIDADES DEL FRAGMENTO KLENOW Y LA EXONUCLEASA 5' DE Pol I

La DNA polimerasa I (Pol I) es la polimerasa más abundante en *E. coli*, con unas 400 moléculas por célula. Esta enzima está constituida por dos dominios funcionales: el fragmento Klenow, que combina la actividad polimerasa y la actividad exonucleasa 3', y el dominio Exo II, con actividad exonucleasa 5'. Ambos dominios son funcionalmente independientes, aunque actúan de forma coordinada. Pol I presenta una procesividad muy limitada, de aproximadamente 15 a 20 nucleótidos, que se correlaciona *in vivo* con la síntesis de pequeños fragmentos de DNA (revisado en Patel *et al.*, 2001). Pol I es esencial para la iniciación de cSDR y para la recuperación de horquillas paradas cuando éstas generan estructuras en lazo-R. Pol I es también la responsable de la replicación de los plásmidos ColE1 (Champs *et al.*, 2004). Con el objeto de identificar los componentes del replisoma en HIR, se estudió la implicación de Pol I y de sus diferentes funcionalidades en esta replicación.

Se llevó a cabo el análisis de HIR en la estirpe MC4100 *polA::Tn5*, que presenta una mutación nula en el gen *polA*, en la estirpe CM5409, que lleva inactivado el dominio Klenow, y en la estirpe KML1789, que tiene alterado el dominio Exo II. Los resultados obtenidos muestran que en los tres tipos de mutantes no hay inducción de HIR (Tabla 24).

Se puede concluir, por tanto, que la actividad de Pol I es requerida para HIR y que tanto su actividad Klenow como la exonucleasa 5' son necesarias para la inducción de HIR. Consecuentemente, Pol I parece tener una funcionalidad imprescindible en HIR, más importante de la que tiene en la replicación cíclica.

3.2. Pol III FORMA PARTE DEL REPLISOMA DE HIR

La enzima Pol III lleva a cabo la síntesis mayoritaria de DNA en la replicación cíclica, mientras que Pol I es parcialmente prescindible. En el apartado anterior se muestra que Pol I es imprescindible para la replicación HIR. Por tanto, parece necesario determinar si en la replicación térmica Pol III sigue siendo imprescindible o puede ser sustituida por Pol I. Para ello, se estudió la inducción de HIR en la estirpe JJC1954 que lleva el alelo *dnaE489*

que afecta a la unidad α de la Pol III, dando lugar a una polimerasa termosensible. Los resultados obtenidos tras el cambio a 41°C muestran que la replicación cíclica se detiene, mientras que la acumulación a 30°C es igual que en la estirpe parental (Fig. 26). De estos resultados se deduce que el núcleo de la holoenzima Pol III es necesario para la inducción de HIR.

Tabla 24. Pol I en la inducción de HIR

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	ACTIVIDAD Pol I	HIR (%)
MC4100	silvestre	silvestre	21
MC4100 <i>polA::Tn5</i>	<i>polA::Tn5</i>	nula	0
CM5409	<i>polA1(Am)</i>	polimerasa Klenow - exonucleasa 3' -	0
KMBL1789	<i>polA107</i>	exonucleasa 5' -	0

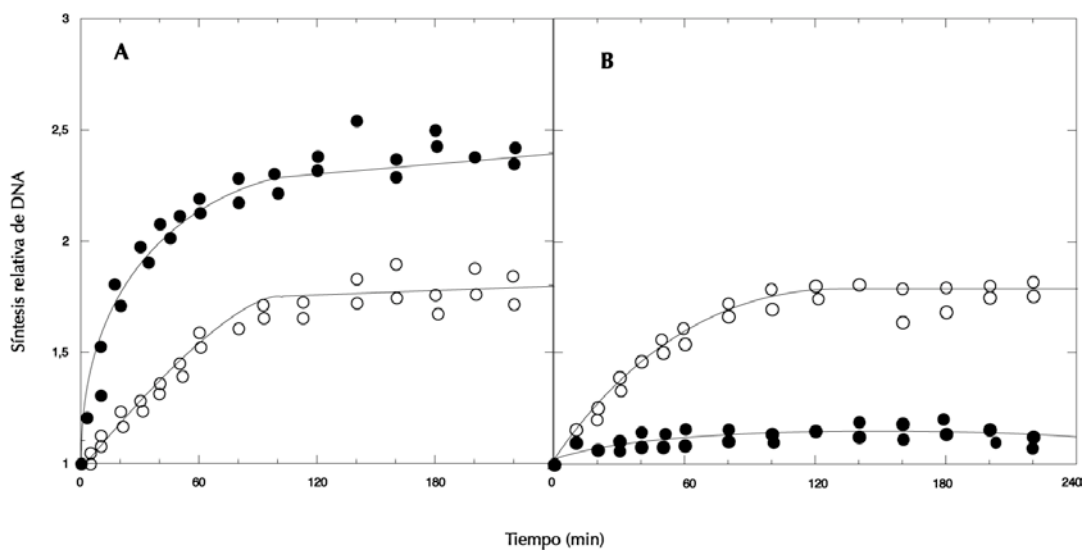


Figura 26. Acumulación de DNA tras la adición de rifampicina a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) en las estirpes AB1157 (A) y JJC1954 (*dnaE486*) (B).

3.3. LAS POLIMERASAS TRANSLESIONALES Pol II Y Pol V NO SON REQUERIDAS PARA HIR

En determinadas situaciones, como la presencia de daños en el DNA y/o la activación de la respuesta SOS, la célula induce una reparación dependiente de replicación llevada a cabo por las polimerasas translesionales. La DNA polimerasa II (Pol II), codificada por el gen *polB*, forma parte de estos sistemas de reparación del DNA. Estirpes mutantes en el gen *polB* no muestran defecto ni en el crecimiento exponencial ni en la replicación. La síntesis de Pol II es inducida tras la aparición de daños en el DNA que bloquean el avance de Pol III. En estas circunstancias, Pol II soluciona el problema al reiniciar la síntesis de DNA. Otros genes inducidos por daño en el DNA son *umuC* y *umuD*, cuyos productos conforman la DNA polimerasa V (Pol V). Esta polimerasa replica huecos en el DNA y su actividad es propensa a error al no tener actividad correctora de pruebas. Pol V requiere las subunidades β y γ de Pol III para incrementar su procesividad y conseguir una actividad óptima.

Tras el sorprendente resultado de la estricta dependencia de Pol I para la replicación termoinducida, se analizó HIR en estirpes mutantes en otras DNA polimerasas no esenciales. Para determinar si existe alguna relación entre la síntesis de DNA en HIR y las polimerasas translesionales, se estudió la inducción de HIR en las estirpes STL1336 con la mutación nula $\Delta(araD-polB)::\Omega$ que no expresa a Pol II y, en SR1157U, con la mutación nula $\Delta umuCD595$ y carente de Pol V. Estos mutantes mostraron una inducción de HIR próxima a la de la estirpe silvestre (Tabla 25). Por tanto, estas polimerasas no son requeridas para HIR, lo que sugiere que HIR no es inducida por daño en el DNA ni durante su transcurso se provocan lesiones que requieran procesos de reparación del DNA.

Tabla 25. HIR en mutantes en Pol II y Pol V.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	HIR (%)
AB1157	silvestre	21,9
STL1336	$\Delta(araD-polB)::\Omega$	33
SR1157U	$\Delta(umuCD)595$	15

4. REQUERIMIENTOS DE RECOMBINACIÓN

La proteína RecA presenta dos funciones principales: recombinación y actividad proteasa asociada a la inducción de la respuesta SOS (Takahashi *et al.*, 1996). Recientemente se le ha adjudicado un papel en la estabilización de las horquillas de replicación paradas (Courcelle y Hanawalt, 2003).

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación determinaron la necesidad de RecA para HIR estudiando un mutante *recA430* (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Este mutante, con un 40% de la actividad recombinasa del silvestre y deficiente en la inducción de la respuesta SOS, no induce HIR. Como se comenta en el apartado 5 de la Introducción, tanto iSDR como cSDR son consideradas replications dependientes de recombinación (RDR) y ambas requieren la funcionalidad de la proteína RecA.

Con el propósito de determinar si HIR es una RDR y las funciones de recombinación que están implicadas, se analizó la inducción de HIR en diferentes mutantes de recombinación.

4.1. HIR ES INDEPENDIENTE DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS

Estudios anteriores han descartado la inducción de la respuesta SOS como resultado de un tratamiento de estrés térmico, sin embargo se ha propuesto que los genes SOS se inducen bajo determinadas condiciones que implican estrés celular, debido a la fluctuación de los niveles de LexA en la célula que varían según múltiples factores (VanBogelen *et al.*, 1997; Foster, 2005).

La actividad proteásica de RecA regula la activación de la respuesta SOS, mediante la inducción de la autoproteólisis de LexA. La mutación *lexA3* (Ind⁻) impide la inducción de la respuesta SOS al expresar una proteína LexA incapaz de proteolizarse. Si HIR fuese una replicación que forma parte de la respuesta SOS, como lo es iSDR, el mutante *lexA3* (Ind⁻) sería incapaz de inducir HIR.

Cuando se analizó HIR en la estirpe GY773, que presenta la mutación *lexA3* (Ind⁻), se observaron niveles silvestres de HIR (Tabla 26). Este resultado indica que HIR no requiere la inducción de la respuesta SOS y, por tanto, no es una función SOS. Este resultado sugiere que la función de RecA requerida para HIR debe ser su actividad recombinasa y no la proteasa.

4.2. HIR REQUIERE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA, PERO NO REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN

La actividad recombinasa de RecA es fundamental en la recombinación y en los procesos de reparación por recombinación. Para asignar un papel en HIR a la proteína RecA, se analizaron diferentes mutantes con diferente grado de actividad recombinasa y

Tabla 26. HIR en estirpes con diferente grado de actividad recombinasa y proteásica de RecA.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	ACTIVIDAD RecA	HIR (%)
AB1157	silvestre	silvestre	19,7
GY773	<i>lexA3</i> (Ind ⁻)	SOS ⁻ / recombinasa +	21
JC10289	Δ <i>recA306</i>	nulo	0
GY8322	Δ <i>recA306</i> /miniF RecA ⁺	silvestre	22,8
GY8202	Δ <i>recA306</i> /miniF <i>recA428</i>	SOS constitutiva /0% recombinasa	0
RG620	Δ <i>recA306</i> /pGB2 <i>recA611</i>	SOS residual /0,3% recombinasa	0
RG623	Δ <i>recA306</i> /pGB2 <i>recA694</i>	SOS + /75% recombinasa	26
IC400	<i>recA430</i>	SOS ⁻ /40% recombinasa	0
GY8201	Δ <i>recA306</i> /miniF <i>recA423</i>	SOS + /rec. homóloga + /reparación por recombinación -	18,65
RG840	<i>recA306/p(recAS25P)</i>	estabilización horquillas de replicación -	0

proteasa. En primer lugar, se estudió HIR en la estirpe JC10289 que presenta la mutación Δ *recA306* que anula tanto la actividad recombinasa como la proteásica. Este mutante no presentó inducción de HIR lo que confirma el requerimiento de RecA para HIR (Tabla 26). Cuando en el mutante Δ *recA306* la proteína RecA se suministró *en trans* desde un plásmido, como en la estirpe GY8322, se recuperaron los valores silvestres de HIR (Tabla 26). Por tanto, se demuestra que la presencia de esta proteína es necesaria para la inducción de HIR.

En la estirpe GY8202, la proteína mutante RecA428, que carece de la función recombinasa y tiene inducción constitutiva de la respuesta SOS suministrada *en trans*, fue incapaz de inducir HIR (Tabla 26). Por tanto, los resultados muestran directamente que es la actividad recombinasa de RecA la requerida para HIR y no la proteásica.

En la estirpe RG620, donde la proteína mutante RecA611 es suministrada *en trans*, no se indujo HIR. Esta proteína tiene una actividad SOS residual y el 0,3% de la actividad recombinasa (Larminat *et al.*, 1992). Sin embargo, en la estirpe RG623, que lleva la proteína mutante RecA694, con un 75% de la actividad recombinasa y eficiente en la

inducción de respuesta SOS, los niveles de HIR fueron similares a los de la estirpe silvestre (Tabla 26). El resultado obtenido en RG623 y, teniendo en cuenta que Botello y Jiménez-Sánchez encontraron que en el mutante *recA430*, que presenta el 40% de la actividad no induce HIR, se puede concluir que el requerimiento mínimo de la actividad recombinasa de RecA en la funcionalidad de HIR está entre un 40% y un 75%.

Para definir la actividad recombinasa de la proteína RecA, discriminando entre recombinación homóloga y reparación por recombinación, se ha aislado el mutante *recA423* (Ishimori *et al.*, 1996). Esta mutación afecta a la actividad de reparación por recombinación de RecA, pero no a la de recombinación homóloga. Cuando se estudió HIR en la estirpe GY8201, que presenta en el cromosoma la mutación $\Delta recA306$ y la proteína mutante RecA423 está expresada desde un plásmido, se observaron niveles silvestres de HIR (Tabla 26). Esto permite concluir que la actividad recombinasa de RecA requerida para HIR es la de recombinación homóloga y no la de reparación por recombinación.

4.3. HIR REQUIERE RecA CUANDO RecD ESTÁ PRESENTE

Se ha descrito que las estirpes deficientes en la función de recombinación de RecA presentan un fenotipo de asincronía. Este fenotipo se explica por la degradación selectiva y completa de cromosomas recién replicados que es llevada a cabo por la actividad exonucleasa de RecBCD en ausencia de RecA (Skarstad y Boye, 1993). Las células desprovistas de la subunidad RecD pierden la actividad exonucleasa de RecBCD (Myers *et al.*, 1995).

Como se ha mostrado anteriormente, un mutante nulo $\Delta recA306$ no induce HIR. Cuando se analizó HIR en JJC357, otro mutante nulo de RecA que presenta la mutación $\Delta recA938$, tampoco se detectó HIR (Tabla 26). El análisis de HIR de la estirpe RG805, que presenta la mutación nula *recD*, dió valores silvestres de HIR (Tabla 27). Sin embargo, el análisis de HIR en un doble mutante *recA recD*, como en el caso de la estirpe JJC432, indujo niveles silvestres de HIR. Por tanto, HIR es restaurada en un fondo *recA* nulo cuando la actividad exonucleasa del complejo RecBCD. Por tanto, HIR requiere la actividad recombinasa de RecA sólo cuando la actividad exonucleasa de RecD está presente.

4.4. LA PROTEÍNA RecA PARECE TENER UN PAPEL ESTRUCTURAL EN HIR

La proteína RecA tiene asignado un posible papel estabilizador de estructuras de replicación (Courcelle y Hanawalt, 2003). Recientemente se ha descrito el mutante *recAS25P* que es incapaz de reanudar horquillas de replicación paradas debido a la acumulación de estrés topológico generado delante de la horquilla de replicación por inactivación de la girasa (Shibata *et al.*, 2005). El mutante *recAS25P* es deficiente en las funciones estructurales asociadas a RecA, aunque presenta niveles basales de

recombinación homóloga, reparación por recombinación e inducción de la respuesta SOS.

En el capítulo 1 de Resultados se presenta la idea de la desestabilización parcial del 13mero-L en *oriC* como posible causa de la apertura de *oriC* tras estrés térmico (apartado 6 del capítulo 1 de Resultados). Para determinar si la proteína RecA pudiera tener un papel estabilizador en la apertura termodinámica de *oriC* u otro tipo de estructuras generadas por estrés térmico y requeridas para el inicio y/o la elongación de la replicación termoinducida, se analizó HIR en la estirpe RG840 que lleva el alelo *recAS25P*. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 26 y en la figura 27 donde se observa que este mutante no expresa HIR. Por tanto, se puede asignar a RecA un papel estabilizador de las estructuras generadas en la inducción de HIR, probablemente en el origen de replicación tras su apertura por efecto del calor, o para limitar la actividad de la exonucleasa RecD.

4.5. HIR REQUIERE PARCIALMENTE LA ACTIVIDAD HELICASA DE RecBCD

Dado que HIR requiere la actividad recombinasa de RecA, se analizó la dependencia funcional de otras proteínas que participan en diferentes vías de recombinación. Se estudió la inducción de HIR en la estirpe JC5519 que lleva los alelos *recB21 recC22*, por lo que no mantiene ni la actividad helicasa ni la exonucleasa de RecBCD. Los niveles de HIR observados en esta estirpe se corresponden con la mitad de los obtenidos en una estirpe silvestre (Tabla 28). Sin embargo, en la estirpe RG805 que lleva la mutación nula $\Delta recD1903$ y, por tanto, carece de la actividad exonucleasa asociada a RecBCD, pero mantiene la actividad helicasa, se observaron niveles silvestres de HIR (Tabla 28 y apartado 4.3 de este capítulo). HIR, por tanto, parece requerir parcialmente la actividad helicasa del complejo RecBCD y es independiente de su actividad exonucleasa.

Tabla 27. HIR en mutantes *recA*, *recD* y *recA recD*.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	HIR (%)
AB1157	silvestre	21,9
JJC357	$\Delta recA938::Cm$	0
RG805	$\Delta recD1903::Tn10$	22,5
JJC432	$\Delta recA938::Cm \Delta recD1903::Tn10$	21,5

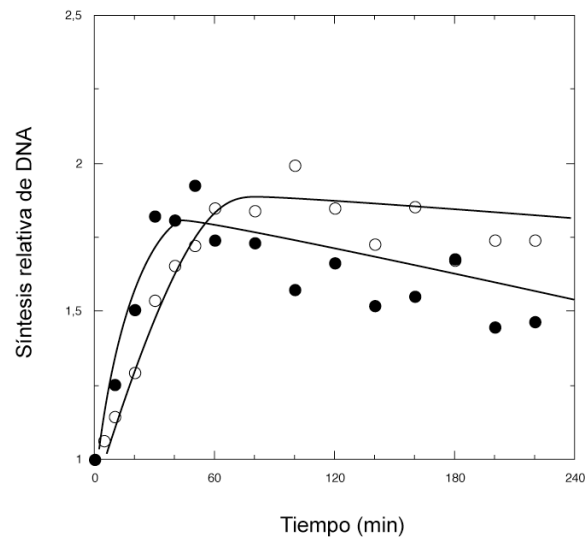


Figura 27. Síntesis relativa de DNA tras la adición de rifampicina en la estirpe RG840 (*recAS25P*) a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C (●).

Tabla 28. Dependencia de HIR de las proteínas de las vías de recombinación RecBCD, RecFOR/QJ y RecET.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	FENOTIPO	HIR (%)
AB1157	Silvestre	Silvestre	21,9
JC5519	<i>recB21 recC2</i>	helicasa RecBC - /exonucleaseV -	12,0
RG805	<i>recD1903::Tn10</i>	exonucleasa V -	22,5
JC7623	<i>recB21 recC22 sbcB15 sbcC201</i>	vía RecFOR/QJ activada	23,9
RG739	<i>recF400::Tn5</i>	RecF -	18,5
RG738	<i>recO::Tn5</i>	RecO -	26,4
RG799	<i>recR::Tn5</i>	RecR -	21,3
BIK2680	<i>recQ1803::Tn3</i>	RecQ -	21,0
RG736	<i>recJ134::Tn10</i>	RecJ -	18,0
JC8679	<i>recB21 recC22 sbcA</i>	vía RecET activada	24,0
JC8691	<i>recB21 recC22 sbcA recE159</i>	carente de ssDNA exonucleasa vía RecET	18,1
BIK2884	<i>recB21 recC22 sbcA recT101::Tn10</i>	carente de resolvasa vía RecET	25,0
BIK2565	<i>recN1502::Tn5</i>	RecN -	24,4

En un fondo *recBC*, las mutaciones *sbcB* y *sbcC* activan la vía RecFOR/QJ (Kowalzykoski, 1994). Cuando se analizó HIR en la estirpe JC7623, mutante *recB recC sbcB sbcC*, carente de RecBCD y donde la vía RecFOR/QJ está activa, se restauraron los niveles silvestres de HIR (Tabla 28). Esto implica que la actividad helicasa requerida para HIR puede ser proporcionada por la vía RecFOR/QJ en ausencia de la helicasa de RecBCD. Sin embargo, mutantes simples *recF*, *recO*, *recR*, *recQ* o *recJ*, como son las estirpes RG739, RG738, RG799, BIK2680 y RG736, presentaron niveles silvestres de HIR (Tabla 28). En todos estos mutantes la vía de recombinación prioritaria, RecBCD, está activa, por lo que la actividad de las proteínas que forman parte de la vía RecFOR/QJ no es requerida para HIR cuando está funcionando RecBCD. Por tanto, la actividad helicasa del complejo RecBCD es necesaria para HIR y, en su ausencia, puede ser suplida por la activación de la vía RecFOR/QJ.

La vía RecET es activada en un fondo *recBC* por la mutación *sbcA* (Kowalzykoski, 1994). Se analizó HIR en la estirpe JC8679, mutante *recB recC sbcA*, carente de RecBCD y donde la vía RecET está activa. Este mutante presentó niveles silvestres de HIR (Tabla 28). Puede concluirse de estos resultados que cuando RecBCD no funciona, su actividad puede ser suplida por la vía RecET. Sin embargo, las estirpes mutantes JC8691 y BIK2884, mutantes *recB recC sbcA recE* y *recB recC sbcA recT*, presentaron niveles silvestres de HIR (Tabla 28). Por tanto, en estos mutantes donde no funcionan la vía RecBCD ni la vía RecET aún se induce HIR. Esto implica que en ausencia de RecBCD y de la vía RecET, en el fondo genético *recBC sbcA*, debe inducirse alguna otra actividad helicasa que sustituya a RecBCD en HIR.

La proteína RecN, que específicamente repara roturas de DNA de doble cadena, es crucial en la reparación de cromosomas que han sufrido roturas en dos o más sitios. Aunque la expresión del gen *recN* es inducible por SOS, mutantes *recN* reducen de forma significativa la replicación dependiente de recombinación en células sin inducir (Asai *et al.*, 1994; Meddows *et al.*, 2005). Se estudió HIR en la estirpe BIK2565 que presenta una mutación en el gen *recN*. Este mutante presentó valores silvestres de HIR (Tabla 28). Este resultado indica que HIR no necesita la actividad de RecN y, por tanto, a diferencia de la replicación estable, HIR no puede ser considerada una RDR o replicación dependiente de recombinación.

4.6. DURANTE LA REPLICACIÓN TERMOINDUCIDA NO SE DETECTAN INTERMEDIARIOS DE REPLICACIÓN TIPO HOLLIDAY

Durante los procesos que requieren recombinación, como la reparación por recombinación de roturas de cadena sencilla (SSBs) o de cadena doble (DSBs), se generan intermediarios de Holliday que son resueltos por las proteínas RuvAB y RecG y la resolvasa RuvC (Kowalzykoski, 2000).

Considerando la dependencia funcional de HIR de la actividad recombinasa de RecA y parcialmente de la helicasa de RecBCD, se investigó si se formaban estructuras tipo Holliday durante HIR que explicasen la dependencia de estas proteínas. Se analizó HIR en las estirpes BIK1620, RG743, RG740 y RGG734, mutantes nulos *ruvAB*, *ruvC*, *ruvABC* y *recG* respectivamente. En todos estos mutantes se observó un nivel de HIR similar al silvestre (Tabla 29). De acuerdo con estos resultados puede descartarse la formación de intermediarios de recombinación tipo Holliday durante el inicio y la elongación de HIR.

4.7. DURANTE EL INICIO Y LA ELONGACIÓN DE HIR NO SE GENERAN ROTURAS DE DOBLE CADENA NI PROBABLEMENTE LAZOS-D

Las actividades recombinasa de RecA y la helicasa de RecBCD son necesarias para reparar por recombinación roturas de cadena doble (DSBs) (Seigneur *et al.*, 1999). Estas proteínas juegan un papel esencial en la formación de estructuras en lazo-D a partir de las DSBs. Estos lazos-D son usados para iniciar la replicación iSDR y en la reanudación de la horquilla de replicación tras una parada en su camino hacia el término (Kogoma, 1994; Seigneur *et al.*, 1999).

Michel y col. determinaron que era posible detectar la presencia de DSBs en mutantes *recB recC* o *recA recD* mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Seigneur *et al.*, 1998). Los mutantes *recB recC* son defectivos en la reparación por recombinación de las DSBs y en la degradación de DNA lineal, lo que permite conseguir en este doble mutante niveles de DNA lineal superiores al de una estirpe silvestre que ronda el 5%. De manera similar, en mutantes *recA recD* tanto la recombinación homóloga como la degradación de DNA lineal se encuentran inhibidas. En ambos tipos de mutantes la presencia de un mayor porcentaje de DNA lineal es debida a la no resolución de las DSBs, ya que estos cortes necesitan para resolverse que el complejo RecBCD esté activo, ya que para resolver estos cortes se necesita que RecA y el complejo RecBCD estén activos y que el DNA lineal que resulta no se degrada en ausencia de la actividad exonucleasa V de RecBCD.

Ya que HIR es dependiente de RecA y de RecBCD, con el objetivo de determinar si durante HIR se generan DSBs que pudieran dar lugar a estructuras en lazo-D y éstas poder ser utilizadas para la iniciación en HIR se llevó a cabo un análisis de los cortes de cadena doble en el DNA (apartado 7.2 de Métodos). La cantidad de DNA lineal se cuantificó por PFGE en las estirpes JC5519 y JJC432, que presentan las mutaciones *recB recC* y *recA recD* respectivamente, crecidas a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C. Los valores de DNA lineal obtenidos son similares en ambas estirpes y no se detectaron diferencias entre los niveles de DNA a 30°C y tras 1 hora tras el cambio a 41°C (Tabla 30). Tiempos mayores de incubación tras el cambio a 41°C no resultaron en un aumento del porcentaje de DNA lineal observado (datos no mostrados). Estos resultados indican que el estrés térmico no induce la aparición de DSBs, relativos a los que se encuentran en los mutantes *recB recC* y *recA recD* a 30°C.

Tabla 29. HIR en mutantes de proteínas implicadas en la resolución de intermediarios de Holliday.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	HIR (i%)
AB1157	silvestre	21,9
BIK1620	$\Delta ruvAB::Cm$	18
RG743	$\Delta ruvC::Cm$	24
RG740	$\Delta ruvABC::Cm$	24
RG734	$recG263::Km$	32,8

Por tanto, la ausencia de DSBs tras estrés térmico y dado que la formación de este tipo de cortes es esencial para el establecimiento de los lazos-D, se puede eliminar la posibilidad de que estructuras en lazo-D sean las responsables del inicio de HIR, a pesar del requerimiento parcial de las actividades de RecA y RecBCD. Este resultado también permite descartar la existencia de un mayor número de paradas de horquillas de replicación que necesiten ser reanudadas por RecBCD durante la situación de estrés térmico.

Tabla 30. DNA lineal en las estirpes JC5519 ($recB21 recC22$) y JJC432 ($recA recD$), a 30°C y tras 1h de incubación a 41°C.

ESTIRPE	GENOTIPO RELEVANTE	DNA lineal (%)	
		30°C	41°C
JC5519	$recB21 recC22$	20,36	17,05
JJC432	$recA recD$	17,33	16,58

CAPÍTULO 4. HIR EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS

Los resultados presentados en el capítulo 1 de Resultados indican que HIR no es exclusiva de oriC, otros replicones, como R1, presentan replications inducidas por estrés térmico. Sin embargo, en el caso del plásmido F integrado en el cromosoma, no existe inducción de nuevos inicios tras el cambio de temperatura. Deben existir, por tanto, mecanismos propios de cada replicón que, en base a diferencias funcionales o estructurales, expliquen la disponibilidad de los orígenes para la inducción de replications por estrés térmico.

*Uno de los objetivos de este trabajo ha sido analizar si moléculas libres de diferentes plásmidos poseen una respuesta a la temperatura similar a HIR. En este capítulo se ha estudiado la inducción de HIR en minicromosomas y plásmidos de *E. coli* y se ha encontrado inducción de la replicación por estrés térmico en todos ellos. De igual forma que en oriC, se han localizado sitios SIDD en todos los replicones estudiados.*

1. ANÁLISIS DE HIR EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS POR FLUORIMETRÍA

Trabajos previos han demostrado que la emisión de fluorescencia por la proteína de fluorescencia verde (GFP) puede ser utilizada para la cuantificación del número de copias de un plásmido (Lobner-Olesen, 1999). En el presente trabajo se ha determinado la presencia de HIR en diferentes plásmidos donde el alelo GFP $mut2$ está clonado bajo el control del promotor del operón arabinosa, *BADp*, y su proteína reguladora AraC (apartado 14 de Métodos; Guzmán *et al.*, 1995; Cormack *et al.*, 1996; Lobner-Olesen, 1999).

Entre los replicones analizados como plásmido libre se encuentran los ya estudiados en el Capítulo 1 de Resultados integrados en el cromosoma: F y R1, y otro grupo de plásmidos, pertenecientes a las diferentes categorías reflejadas en el apartado 7 de la Introducción: P1 Δ *incA*, pSC101, pBR322 y p15A. Las bacterias empleadas para este estudio se listan en la tabla 5. La cantidad de fluorescencia de la proteína GFP relativa a la masa del cultivo (FL*/DO) se ha utilizado como indicadora del número de copias de plásmido por masa (apartado 13 de Métodos). El promotor *BADp*, inducible en presencia de arabinosa, estuvo siempre activo a lo largo del crecimiento, al contener el medio de cultivo 0,2% de arabinosa.

1.1. LA CUANTIFICACIÓN DE GFP $mut2$ POR ESPECTROFLUORIMETRÍA ES UN MÉTODO VÁLIDO PARA LA MEDIDA DE HIR EN PLÁSMIDOS

El problema principal que plantea la medida de la replicación de plásmidos es que el tamaño de la molécula plasmídica impide la detección fiable de la señal radiactiva

cuando se debe trabajar con densidades ópticas bajas, como en el caso de HIR. Las medidas de la actividad de *GFPmut2* por citometría de flujo han sido utilizadas para cuantificar el número de copias de plásmido (Lobner-Olesen, 1999). Estas medidas presentan una efectividad comparable a la de las técnicas clásicas de hibridación y son más rápidas y económicas. Las medidas fluorimétricas de GFP son adecuadas para los estudios de determinación de la dosis génica porque no miden la actividad enzimática de ninguna proteína, sino su fluorescencia intrínseca.

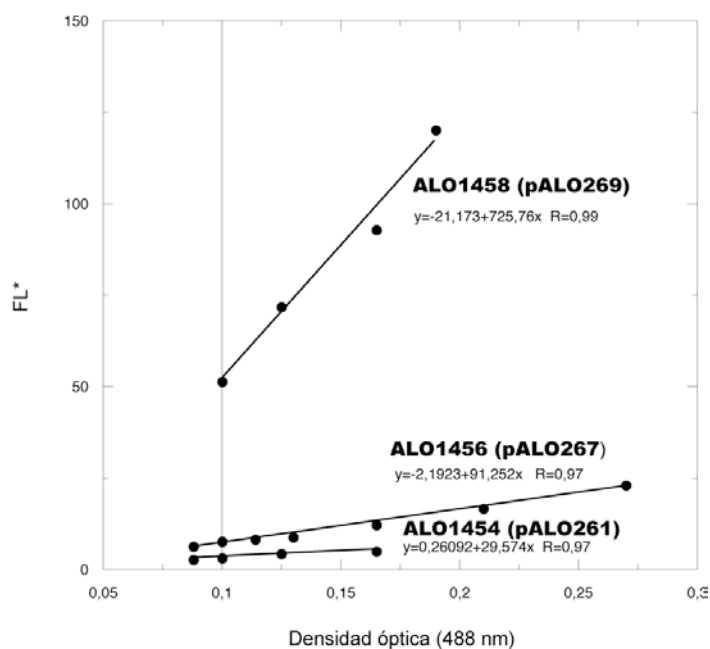
En el presente estudio se ha utilizado la cuantificación de la actividad de *GFPmut2* para la determinación del número de copias de plásmido, *n_{cp}*, mediante espectrofluorimetría (apartado 14 de Métodos). Se tomaron alícuotas de los diferentes cultivos a lo largo del crecimiento exponencial y se analizó su fluorescencia. Los valores de fluorescencia obtenidos fueron corregidos para eliminar el efecto de filtro interno (apartado 14 de Métodos). Los valores corregidos (FL*) se representaron frente a la densidad óptica del cultivo a lo largo del crecimiento (Fig. 28). Todos los datos se ajustaron a una recta con un coeficiente de correlación R superior a 0,9 (Fig. 28A).

Para el cálculo del número de copias de plásmido por masa, se consideró el valor de FL* correspondiente a una densidad óptica del cultivo de 0,1 unidades de absorbencia (apartado 13.1 de Métodos). El menor valor de FL* a densidad óptica 0,1 correspondió a la estirpe ALO1454 con el plásmido pALO261 (R1). El valor de FL* a densidad óptica de 0,1 obtenido para cada cultivo se hizo relativo al de la estirpe con pALO261 (R1). Los estudios llevados a cabo por Lobner-Olesen atribuyen a este plásmido un número de copias por célula igual a 1,7. Para hacer comparativos los resultados obtenidos por espectrofluorimetría con los obtenidos por Lobner-Olesen se multiplicó el número de copias relativa de cada plásmido obtenido en este estudio por 1,7.

En la figura 28B se presentan los valores del número de copias relativo de plásmido obtenidos en este estudio junto con los obtenidos para los mismos plásmidos mediante las técnicas de citometría de flujo y el método Southern (Lobner-Olesen, 1999).

El número de copias relativo de cada plásmido obtenido mediante espectrofluorimetría se aproxima a los obtenidos por Lobner-Olesen mediante citometría de flujo y el método Southern (Fig. 28). Sin embargo, se encuentra una gran diferencia en los valores de pALO280 (F) en el que se detectó una fluorescencia elevada a pesar de que el número de copias relativo asignado por Lobner-Olesen a este plásmido fue de 1 (el más bajo de los analizados).

A.



B.

ESTIRPE	PLÁSMIDO	FL* a DO=0,1	ncp ^a	ncp ^b	ncp ^c
ALO1455	pALO264 (<i>oriC</i>)	9,41	4,97	3,8	4,1
ALO1456	pALO267 (<i>oriC sopABC</i>)	6,995	3,69	2,1	N.D.
ALO1465	pALO280 (F)	39,437	20,83*	1	1
ALO1459	pALO270 (P1 Δ <i>incA</i>)	6,33	3,34	4,4	5,9
ALO1469	pALO284 (pSC101)	8,617	4,55	3,1	4,6
ALO1454	pALO261 (R1)	3,218	1,7	1,7	1,8
ALO1458	pALO269 (pBR322)	51,403	27,15	42,8	23,6
ALO1460	pALO275 (p15A)	29,347	15,50	19	15,5

Figura 28. A) FL* emitida por estirpes portadoras de plásmidos que contienen la construcción BAD ρ -GFP μ ut2 a lo largo del crecimiento exponencial a 30°C (para simplificar se muestran los datos de tres de las estirpes). **B)** Determinación del número relativo de copias de plásmidos (ncp) a partir de la FL* correspondiente a un cultivo de 0,1 unidades de densidad óptica (a). Se incluyen las medidas realizadas a 37°C por citometría de flujo (b) y las obtenidas a 37°C mediante el método de Southern (c) (Lobner-Olesen, 1999).

Con el objeto de determinar si realmente la construcción pALO280 (F) corresponde a la descrita por Lobner-Olesen se llevó a cabo un análisis de restricción del plásmido. Los resultados mostraron que se corresponde con pALO280, aunque la integración de la construcción que codifica la *GFPmut2* debe provocar alguna alteración en el control del número de copias de plásmido. Por tanto, esta construcción no resulta válida para el análisis del número de copias del plásmido F.

En la determinación de la cantidad de una proteína por célula o por masa hay que considerar la actividad del promotor desde el que se transcribe. En las condiciones experimentales de estrés térmico de este estudio fue necesario determinar si la expresión de GFP desde *BADp* varía o no a distintas temperaturas. Para controlar los niveles de transcripción y/o actividad de la *BADp* a distintas temperaturas se realizó un experimento control. Se cuantificó la fluorescencia emitida por cultivos de la estirpe ALO1458, que lleva el plásmido pALO269 (pBR322) de alto número de copias a lo largo del crecimiento a 30°C y tras el aumento de temperatura a 41°C. En el momento del cambio de temperatura a 41°C se añadió hidroxurea (HU) 100mM a los cultivos. La HU inhibe la replicación, mientras que la transcripción continúa. Si existe cambio en los niveles de transcripción desde *BADp* por el aumento de temperatura, se detectarán a 41°C niveles de fluorescencia de GFP diferentes a los de 30°C. Como se observa en la figura 29, en presencia de HU no se detectó variación en los niveles de la actividad de GFP a ambas temperaturas. Las variaciones observadas en los niveles de GFP en condiciones de estrés térmico dependerán, por tanto, del número de copias del plásmido y no de la expresión de *BADp*.

Los resultados presentados permiten concluir que la medida de la fluorescencia por espectrofluorimetría utilizando el sistema *BADp-GFPmut2* es un método eficaz en los estudios de determinación de la dosis génica a distintas temperaturas y constituye un sistema fiable para el estudio de HIR en plásmidos.

1.2. HIR ES OBSERVADA EN MINICROMOSOMAS

Desde su construcción, los minicromosomas han sido considerados un modelo de estudio de la replicación del cromosoma de *E. coli*. Sin embargo, la replicación en minicromosomas presenta requerimientos en la secuencia de *oriC* y en la estructura del DNA diferentes a los del cromosoma, fundamentalmente debido a la diferencia de tamaño y conformación que presentan ambas moléculas (Asai *et al.*, 1998; Dasgupta y Lobner-Olesen, 2004).

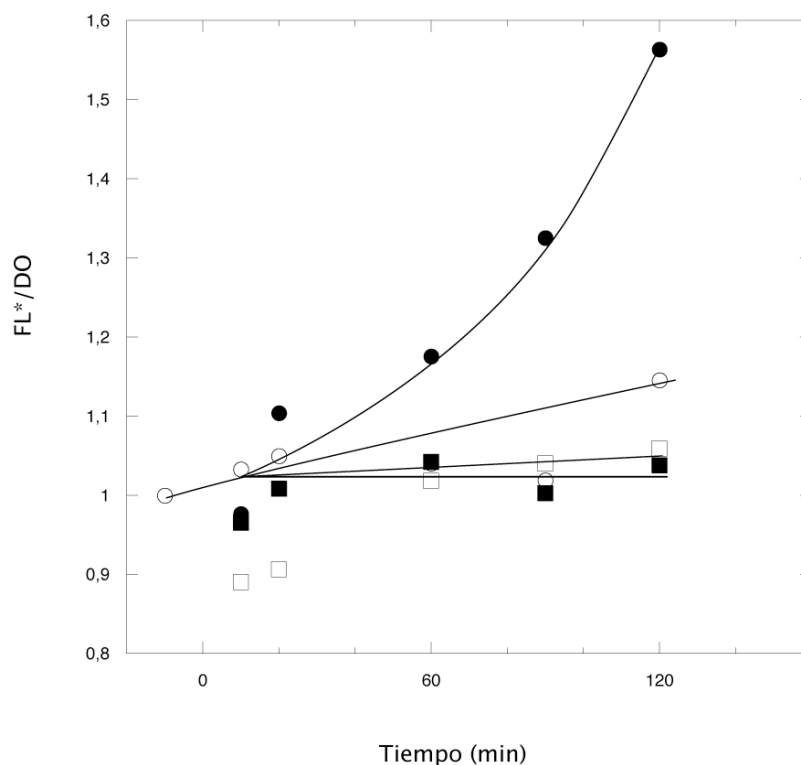


Figura 29. Relación FL*/DO para la estirpe ALO1458, que lleva el plásmido pALO269 (pBR322), creciendo exponencialmente a 30°C (O), tras el cambio de temperatura a 41°C (●) y tras la adición de HU 100mM a tiempo cero a 30°C (□) y junto con el cambio a 41°C (■).

En este trabajo se ha estudiado la inducción de HIR en dos minicromosomas: pALO264 (*oriC*) y pALO267 (*oriC sopABC*). pALO264 contiene a *oriC* y los genes flanqueantes, *mioC*, *gidA* y *asnA*. pALO267 lleva, además de *oriC*, el sistema de partición *sopABC* del plásmido F que le asegura estabilidad en el interior celular (Lobner-Olesen, 1999). En la figura 29 se representan las relaciones FL*/DO a lo largo del crecimiento a 30°C y tras el cambio a 41°C, relativas al momento del cambio de temperatura, de las estirpes ALO1455 y ALO1456 que contienen los plásmidos pALO24 (*oriC*) y pALO267 (*oriCsopABC*) respectivamente. El porcentaje de inducción se obtuvo dividiendo el valor final de FL*/OD obtenido a 41°C cuatro horas después del cambio de temperatura, respecto al obtenido a 30°C. Con los resultados obtenidos puede cuantificarse que el número de copias de ambos minicromosomas aumenta un 20% tras estrés térmico (Fig. 30). Puede concluirse que los minicromosomas presentan HIR de forma análoga al cromosoma de *E. coli* y, por tanto, pueden constituir un sistema fiable para el estudio de HIR.

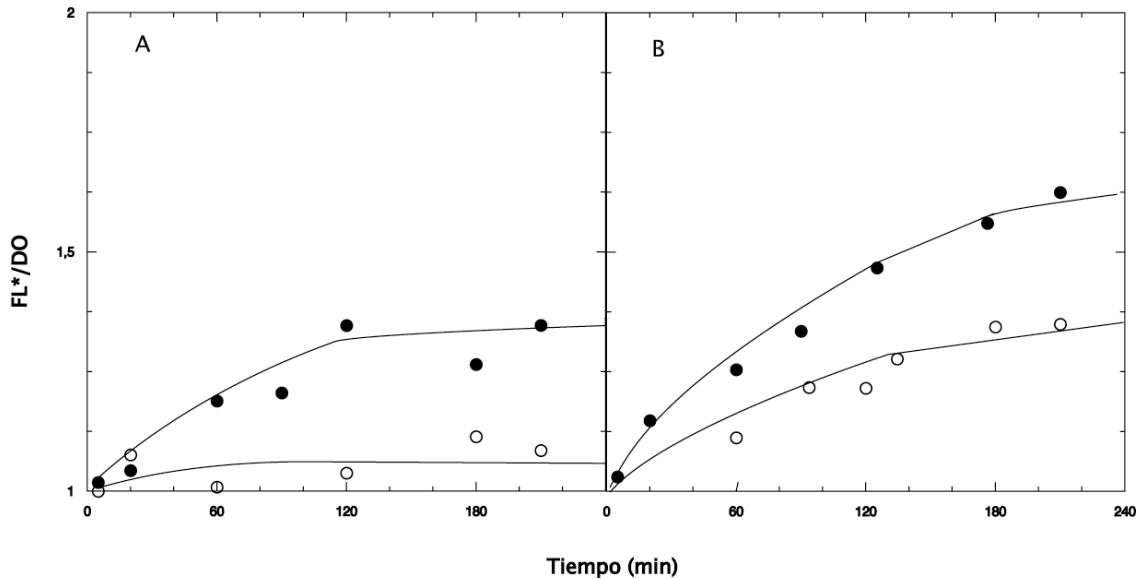


Figura 30. Relación FL*/DO en las estirpes ALO1455 (A) y ALO1456 (B) portadoras de los minicromosomas pALO264 y pALO267, respectivamente, creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C a tiempo cero (●).

1.3. LOS PLÁSMIDOS CON CONTROL DE LA REPLICACIÓN POR ITERONES PRESENTAN HIR

En el capítulo 1 de Resultados se determinó que en las estirpes CM1671 y *intFs-B*, donde *oriC* no es funcional y la replicación del cromosoma tiene lugar a partir del plásmido F, no se observa HIR (Fig. 14 y Fig. 15). Para establecer si el comportamiento de los orígenes de replicación de F para HIR es el mismo o diferente cuando el replicón se encuentra integrado en el cromosoma o en el plásmido libre, se determinó la inducción de HIR en la bacteria ALO1465 que contiene el plásmido pALO280 (F), con los orígenes de replicación *oriS* y *oriV*. Aunque en el apartado 1.1 de este capítulo se indica que esta construcción no es válida para el cálculo del número de copias de plásmido, el sistema puede ser válido para el estudio de la replicación termoinducida al tratarse de una comparación en términos relativos entre la fluorescencia obtenida a 41°C respecto a la obtenida a 30°C, no de un número concreto de copias. Los resultados de FL*/DO obtenidos del análisis de la estirpe ALO1465 se presentan en la figura 31A y en ellos se observa inducción de HIR.

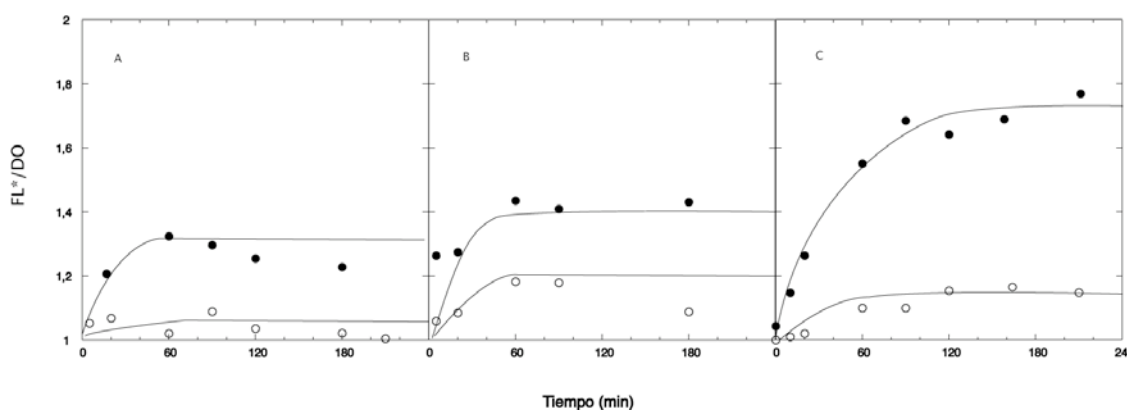


Figura 31. Relación FL*/ DO de las estirpes ALO1465 (A), ALO1454 (B) y ALO1469 (C) portadoras de los plásmidos pALO280 (F), pALO270 (P1 Δ incA) y pALO284 (pSC101), creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C a tiempo 0(●).

Los niveles de inducción que presenta pALO280 son de aproximadamente un 20%, similares a los obtenidos en minicromosomas y en el cromosoma de *E. coli* (Fig. 31A). Por tanto, F presenta inducción de HIR cuando se encuentra como plásmido libre, pero no cuando está integrado en el cromosoma. Deben existir diferencias estructurales y/o funcionales que determinen esta diferencia en la regulación de la replicación de F.

Se estudió la inducción de HIR en las estirpes ALO1459 y ALO1469 que contienen los plásmidos pALO270 (P1 Δ incA) y pALO284 (pSC101), ambos con control de la replicación por iterones (Fig. 31B y C). En el caso del plásmido pALO270 con el replicón de P1 Δ incA, los niveles de HIR fueron del 20% similares a los observados en el plásmido F. Para el plásmido pALO284, con el replicón pSC101, el valor de activación de la replicación fue del 50%, el más alto encontrado en los plásmidos controlados por iterones.

De los resultados presentados, puede concluirse que los plásmidos con control de la replicación por iterones presentan inducción de HIR cuando se encuentran en la célula como plásmido libre.

1.4. LOS PLÁSMIDOS CONTROLADOS POR RNA ANTISENTIDO PRESENTAN HIR

En el capítulo 1 de Resultados, se presenta la inducción de HIR en las estirpes CM1843 y LK211 donde el control de la replicación cromosómica lo ejerce el replicón del plásmido R1. Ambas estirpes presentaron aproximadamente la misma inducción de HIR que sus correspondientes estirpes parentales (Fig. 14; Tabla 12 y 13). De estos resultados se concluye que *oriR1* integrado en el cromosoma, presenta inducción de replicación tras estrés térmico. En este apartado, se presenta el estudio de la inducción de HIR la estirpe ALO1454, que lleva el plásmido pALO261 libre. Los resultados obtenidos se representan en

la figura 32. Igual que en el caso de los minicromosomas, la inducción de HIR en el plásmido R1 libre fue de aproximadamente el 26%, algo superior al que presenta R1 cuando se encuentra integrado en el cromosoma de *E. coli* (Fig. 32A). Por tanto, el plásmido R1 presenta inducción de la replicación por estrés térmico a los mismos niveles, tanto si se encuentra libre como si está integrado en el cromosoma de *E. coli*.

Se estudió también la inducción de HIR en plásmidos controlados por RNA antisentido y que presentan alto número de copias. Así, se estudió la inducción de HIR en dos representantes de la familia ColE1: pBR322 y p15A. Para ello, se usaron las estirpes ALO1458 y ALO1460 que contienen los plásmidos pALO275(p15A) y pALO269(pBR322) respectivamente, a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C. Se analizaron los niveles de fluorescencia de *GFPmut2* a lo largo del crecimiento a 30°C y tras el cambio a 41°C. Los niveles de inducción de la replicación por estrés térmico fueron del 54% para p15A y del 86%, para pBR322 (Fig. 32 B y C).

2. LOS REPLICONES PLASMÍDICOS PRESENTAN SITIOS SIDD

La organización de la secuencia de DNA en los orígenes de los plásmidos estudiados en este trabajo se asemeja a la de *oriC* y todos presentan una región esencial rica en A+T (revisado en del Solar *et al.*, 1998). En el capítulo 1 de Resultados se muestra la existencia de un sitio SIDD en el 13mero-L del origen de replicación del cromosoma de *E. coli* y de otros orígenes de enterobacterias. Los resultados muestran una distribución de estos sitios SIDD que guarda una relación con la distancia filogenética determinada para las diferentes especies y, probablemente, estar relacionada con los mecanismos de desestabilización de la doble hélice en los diferentes orígenes (Fig. 16).

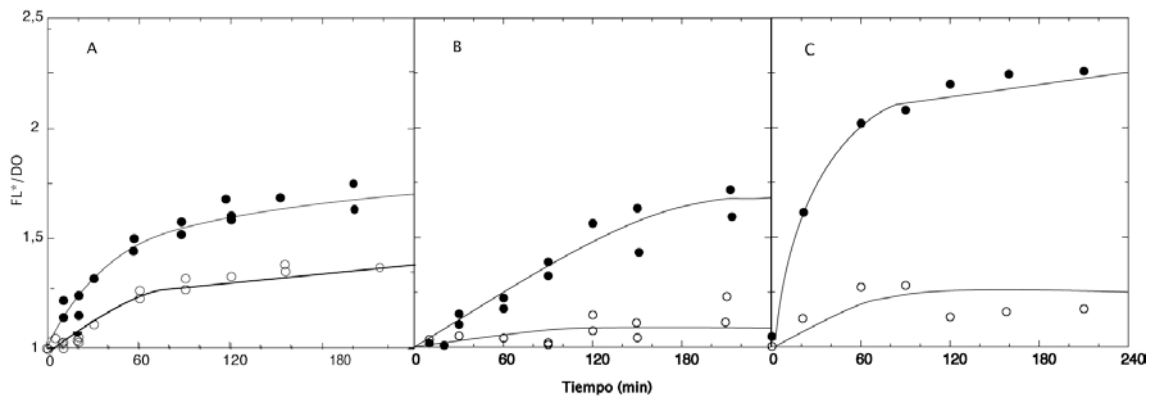


Figura 32. Relación FL*/ DO de las estirpes ALO1454, ALO1458 y ALO1460 que lleva el plásmido pALO 261 (R1) (A), pALO275 (p15A) (B) y pALO269 (BR322) (C), creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C (●).

Considerando que los orígenes de replicación en plásmidos presentan una arquitectura similar a la de los replicones de los cromosomas bacterianos, se planteó el estudio de sitios SIDD en replicones plasmídicos. Se ha analizado la presencia de sitios SIDD en los orígenes de replicación de plásmidos correspondientes a los dos grupos de control de la replicación estudiados en este trabajo: (i), control por iterones: *oriS* (plásmido F), *oriR* (plásmido P1) y *ori* (pSC101) (Fig. 33); (ii), control por asRNA: *oriR1* (plásmido R1) y origen de replicación de ColE1 (pBR322 y p15A) (Fig. 34). Las secuencias utilizadas en el análisis se indican en la tabla 6. El perfil de inestabilidad de las diferentes secuencias utilizando el programa WebSIDD ha localizado la presencia de sitios SIDD en todos los orígenes de replicación analizados. Este resultado concuerda con la presencia de inducción de replicación tras estrés térmico en todos los replicones analizados en este capítulo. Por tanto, debe existir alguna relación entre la presencia de un sitio SIDD en el origen de replicación y la inducción de la replicación por estrés térmico. Sin embargo, en el caso del plásmido F, a pesar de la presencia de un sitio SIDD en *oriS* no existe inducción HIR cuando está integrado en el cromosoma de *E. coli*. En este caso, debe existir una regulación diferente en el replicón de F cuando está libre que cuando se encuentra integrado en el cromosoma.

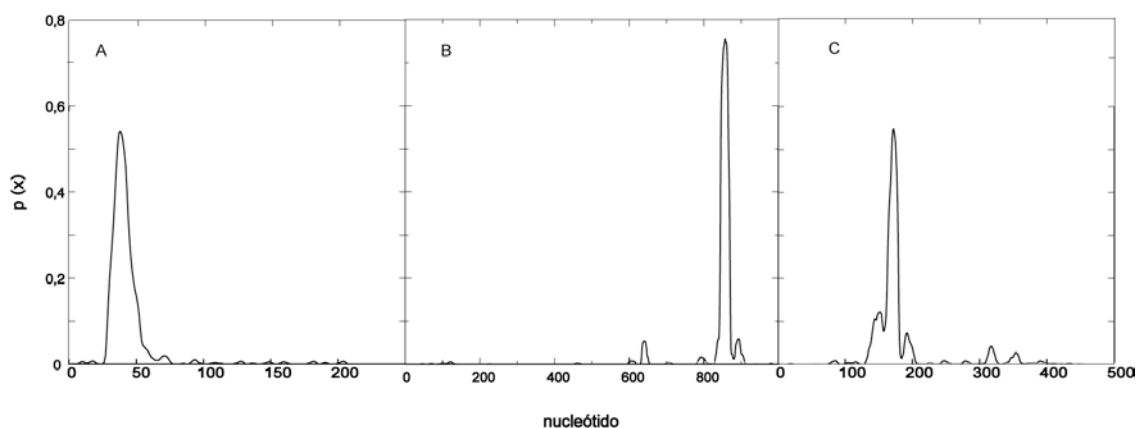


Figura 33. Predicción de sitios SIDD de los orígenes de replicación de plásmidos con control de replicación por iterones. Probabilidad de apertura de la doble hélice en las secuencias: (A) *oriS* del plásmido F (NC_002483, 48136..48352), (B) *oriR* del plásmido P1 (NC_005856.1, 61771...62950) y (C) *ori* de pSC101 y proteína RepA (K00042).

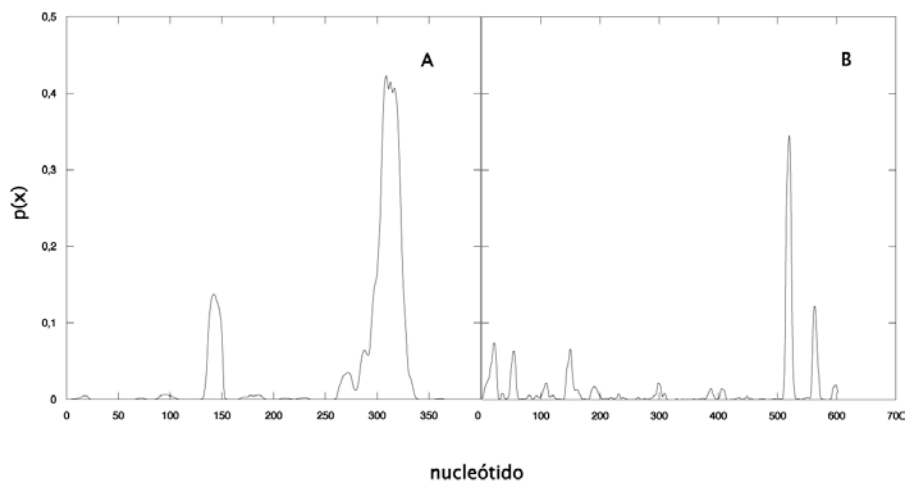


Figura 34. Predicción de sitios SIDD en orígenes de replicación de plásmidos con control de replicación por RNA antisentido. Probabilidad de apertura de la hélice en las secuencias: (A) *oriR1* del plásmido R1 (secuencia del origen de replicación de pKN15632 proporcionada por el Dr. de la Cueva) y (B) *ori* de ColE1 (embl V00270.1).

Discusión

DISCUSIÓN

Las células de todos los organismos, y especialmente los organismos unicelulares, tienen la propiedad de responder a cambios en el ambiente. Entre las diferentes respuestas a los cambios ambientales está la respuesta a la temperatura. Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación demostraron que un aumento de diez ó más grados centígrados de la temperatura de incubación de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* induce replicaciones extras acíclicas. A esta replicación inducida por estrés térmico se la denominó HIR (heat induced replication). HIR no depende de la respuesta de choque térmico, se inicia en *oriC* y, a diferencia de la replicación cíclica, no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni síntesis de proteínas *de novo* (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

En el presente trabajo se han determinado de los requerimientos de la estructura del DNA y de diversas funciones celulares necesarias tanto para el inicio, como para la elongación de HIR. Los resultados obtenidos han llevado a la propuesta de un modelo que explica el mecanismo mediante el cual las replicaciones HIR tienen lugar tras una situación de estrés térmico. El estudio de la replicación termoinducida se ha hecho extensible a minicromosomas, que contienen el replicón básico del cromosoma de *E. coli*, y a plásmidos.

1. ESTRUCTURA DE *oriC* NECESARIA PARA LA INDUCCIÓN DE HIR

El primer objetivo de este trabajo fue determinar qué secuencias de *oriC* son requeridas para la inducción de HIR. Para el inicio de la replicación cíclica en *E. coli* es necesaria la apertura de la doble hélice de DNA en *oriC*. En el caso de HIR, se propuso que una alteración termodinámica de la estructura de *oriC*, que permitiera la apertura de la doble hélice, podría disponer esta región para el ensamblaje de nuevos replisomas y explicar así las iniciaciones extras observadas (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Los orígenes de replicación son zonas de baja estabilidad termodinámica. La separación de la doble hélice a nivel local es la forma más extrema de desestabilización del DNA (Benham, 1980; Kowalski *et al.*, 1988; Lyubchenko y Shlyakhtenko, 1988; Bi y Benham, 2004; Nieduszynski *et al.*, 2007). La desestabilización parcial de la doble hélice puede ser biológicamente importante ya que hace disminuir la cantidad de energía libre necesaria para dirigir la separación de la misma en el sitio afectado y facilitar eventos reguladores en procesos como la replicación o la transcripción. En este trabajo se presentan datos que apoyan la hipótesis de una apertura parcial de la hélice tras estrés térmico en *oriC* como probable causa de HIR.

Para estudiar si en ausencia de *oriC*, otras zonas del cromosoma pueden servir como inicio de HIR, se analizaron estirpes que presentan una delección completa de *oriC* y el control de la replicación es ejercido por plásmidos integrados en el cromosoma. La

estirpe CM1671 ($\Delta oriC1071 zif:F$), que presenta una delección total de la región de *oriC* y el control de la replicación bajo el replicón del plásmido F, no presentó HIR. De este resultado se puede concluir que HIR tiene lugar sólo en *oriC* y que la inserción del replicón F no induce HIR (Fig. 13; Tabla 7). Por tanto, en ausencia de *oriC* no hay otras regiones cromosómicas desde donde inicie la replicación termoinducida.

Una vez comprobado que el inicio de la replicación termoinducida tiene lugar sólo en *oriC* en el cromosoma de *E. coli*, el siguiente objetivo fue determinar las secuencias en *oriC* que son esenciales para la inducción de HIR. Dado que el replicón del plásmido F es incapaz de inducir HIR, se estudió HIR en la estirpe *intFs-B* que presenta una delección de 16 pb en la región del 13mero-L que hace que *oriC* no sea funcional y cuyo control de la replicación es ejercido por F. No se observó inducción de HIR en *intFs-B* (Fig. 14; Tabla 13). De este resultado se concluye que el 13mero-L es esencial para el inicio de HIR. Un mutante de *oriC* en el 13mero-L no presenta hipersensibilidad a la actividad nucleasa ni muestra apertura de *oriC* en geles bidimensionales (Kowalski y Eddy, 1989). Como se muestra en la figura 15, el 13mero-L constituye el principal sitio SIDD (stress induced DNA duplex destabilization) en la región de *oriC*. La presencia de secuencias SIDD explica la susceptibilidad de la doble hélice a la apertura debido a características termodinámicas intrínsecas a la misma secuencia (Bi y Bemhan, 2004). La delección de 16 pb que elimina el 13mero-L y el principal sitio SIDD, y también la inducción de HIR (Fig. 15). La secuencia SIDD localizada a la izquierda del 13mero-L en la región rica en A+T no parece, por el contrario, ser importante para la inducción de HIR. En el mutante *oriC160*, donde desaparece este sitio SIDD secundario, los niveles de HIR observados son similares a los de la estirpe silvestre. Por tanto, sólo la presencia del sitio SIDD localizado en el 13mero-L de *oriC* es esencial para la inducción de HIR.

Los cambios que se dan en el DNA tras una situación de estrés térmico pueden afectar no sólo a su termodinámica, sino que pueden modular también la interacción de proteínas con el DNA. En *oriC* se localizan sitios de unión para diversas proteínas que actúan en la regulación de la replicación. En el inicio de la replicación cíclica la apertura del DNA está determinada por la proteína DnaA que se une a sus secuencias de unión en *oriC* y constituye un complejo oligomérico que enrolla el DNA de *oriC* generando la energía necesaria para la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T y la zona de los 13meros. En *oriC* se localizan también sitios de unión para otras proteínas como IHF y Fis (Roth *et al.*, 1994). En este trabajo se ha estudiado la inducción de HIR en mutantes en las secuencias de unión de DnaA R2-R5 y de los sitios de unión de IHF y Fis (Tablas 8, 9 y 10). Todos estos mutantes presentan niveles de HIR similares a los observados en una estirpe silvestre, excepto el mutante *oriC162*, con una inserción de 14 pb localizada entre las secuencias R3 y R4 de unión de DnaA, que presentó una reducción del 50% de los orígenes inducidos respecto a la estirpe silvestre (Tabla 10). En esta zona se localiza un sitio de unión de la girasa (Lothar *et al.*, 1984). Cambios en la actividad de la girasa provocan cambios en la estructura de la superhélice que podrían afectar a la estructura de *oriC*, a

la interacción de proteínas con esta región y, en último término, a la inducción de HIR (Franco y Drlica, 1989). De todos estos resultados puede concluirse, que la disponibilidad de un sitio de apertura de *oriC* en el 13mero-L para el posterior ensamblaje del replisoma es esencial para la inducción de HIR y ninguna otra secuencia dentro de *oriC*, al menos cambios independientes en los diferentes tipos de secuencia, eliminan la inducción de la replicación de estrés térmico.

A pesar de no existir inducción de replicación en el plásmido F cuando está integrado en el cromosoma, HIR no es una respuesta específica de *oriC*. La estirpe CM1843 ($\Delta oriC1071 zji::R1$) que también presenta una delección completa de *oriC* y donde la replicación ha sido restaurada por la integración del plásmido R1, presenta inducción de HIR (Tabla 12). La estirpe LK211 ($\Delta 16pb(13meroL)::pKN1562$) con *oriC* no funcional y la replicación bajo el control del plásmido R1, también induce HIR (Fig. 14A). Por tanto, HIR no es un fenómeno específico de *oriC*, sino que también puede inducirse en el plásmido R1.

La diferente respuesta al estrés térmico entre las respuestas observada entre F y R1 integrados en el cromosoma podría ser debida a diferencias en: (i) la secuencia y la estructura de los orígenes de replicación de ambos replicones, o (ii) los mecanismo de replicación y su control de ambos plásmidos. Los resultados que se describen en esta memoria parecen rechazar la primera hipótesis. Del alineamiento múltiple de secuencias de DNA se deduce que los orígenes *oriC*, *oriS* (plásmido F) y *oriR1* (plásmido R) y guardan similitud en su secuencia (datos no mostrados). La existencia de un sitio SIDD, que se determinado esencial para HIR en *oriC*, no es tampoco una explicación de la capacidad para la inducción de HIR en el caso de F y R1. De hecho, tanto en *oriC*, como en *oriS* y *oriR1* se han localizado sitios SIDD (Fig. 16, 33 y 34). Por tanto, la inducción de la replicación tras estrés térmico, requiere la existencia de un sitio SIDD, pero en último término debe ser el mecanismo de replicación propio del replicón el que permite que se den estas replications termoinducidas.

Todos los orígenes de replicación procarióticos presentan elementos estructurales muy conservados ya se trate de plásmidos, fagos o cromosomas bacterianos (revisado en Weigel y Seitz, 2006). Estas características estructurales explican el hecho de que sean estas regiones y no otras las que sirvan para el inicio de la replicación. Todos ellos presentan una zona rica en A+T y zonas de repeticiones directas o inversas donde se unen las proteínas iniciadoras. Si la distorsión del DNA es lo suficientemente fuerte, se puede promover la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T (revisado en Weigel y Seitz, 2006). Se ha demostrado la presencia de sitios SIDD en orígenes de replicación desde plásmidos a levaduras (AK y Benham, 2004). En este trabajo se ha estudiado la localización de sitios SIDD en algunos orígenes de replicación de representantes de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenece *E. coli*. Todos ellos presentan una extremada conservación de las secuencias con importancia funcional, incluyendo el 13mero-L y un sitio SIDD localizado en el mismo (Fig. 16). De hecho, la distribución de los

sitios SIDD guarda una relación de semejanza entre los diferentes orígenes similar a su relación evolutiva (Fig. 16B). Recientemente se ha descrito que la región del origen de replicación puede utilizarse como marcador filogenético entre enterobacterias (Rogenkamp, 2006). La distribución de los sitios SIDD puede dar una idea no sólo de la relación evolutiva, sino del patrón de apertura de la región de *oriC* previo al ensamblaje del replisoma que puede ser muy diferente de unas estirpes a otras. Estos resultados hacen pensar en la existencia de replications extras inducidas por estrés térmico en otras especies de la familia *Enterobacteraceae*.

La presencia de un sitio SIDD es esencial, aunque no determinante para la inducción de HIR. Puesto que un sitio de alta probabilidad de apertura ha sido también localizado en *oriS*, origen de replicación del plásmido F y, como se mencionó anteriormente, no presenta HIR cuando está integrado en el cromosoma de *E. coli*. Además, en ausencia de *oriC* ninguna región del cromosoma de *E. coli* es susceptible para el inicio de HIR, a pesar que ha sido demostrada la existencia de sitios SIDD en otras zonas del cromosoma de *E. coli*, como son algunas secuencias promotoras con alto contenido en A+T. En la replicación cíclica, la RNasa HI degrada específicamente RNA en moléculas híbridas RNA-DNA y evita que otras regiones del cromosoma sean utilizadas como orígenes de replicación. En ausencia de la RNasa HI se activa la replicación estable (Kogoma *et al.*, 1985). La actividad RNasa HI es requerida para HIR (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). La ausencia de activación de otros sitios SIDD localizados en otras regiones del cromosoma fuera de *oriC* podría estar relacionada con el requerimiento específico de RNasa HI para HIR.

2. TOPOLOGÍA CROMOSÓMICA E INDUCCIÓN DE HIR

La predisposición de la doble hélice para su apertura en regiones termodinámicamente inestables depende, entre otros, del estado de la superhélice (Kowalsky y Eddy, 1989). El nivel de superenrollamiento regula además las interacciones de muchas proteínas con el DNA. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar cómo afecta la topología cromosómica a la inducción de HIR.

Se ha propuesto que tras una situación de estrés térmico tienen lugar cambios en el nivel de superenrollamiento que pueden contribuir a la desestabilización de la doble hélice (López-García y Forterre, 2000). La mayor parte de estas medidas de superenrollamiento descritas hasta la fecha se han realizado en plásmidos, dada la dificultad que presenta la medida de esta propiedad en el cromosoma. Ambos sistemas, plásmidos y cromosoma, presentan, sin embargo, notables diferencias en cuanto a la regulación de la topología, de ahí que las medidas obtenidas en plásmidos no sean totalmente extrapolables al cromosoma. Recientemente se han propuesto sistemas eficaces de detección de cambios en el superenrollamiento cromosómico basadas en la

monitorización de la actividad de promotores sensibles al nivel de superenrollamiento del DNA (Peter *et al.*, 2004; Hardy y Cozzarelli, 2005). En este trabajo se ha hecho uso de estos sistemas para determinar la existencia de cambios en el superenrollamiento cromosómico tras estrés térmico en las condiciones de inducción de HIR. Los resultados obtenidos permiten concluir que el estrés térmico resultante del cambio de temperatura de 30°C a 41°C de un cultivo bacteriano no provoca cambios en el superenrollamiento cromosómico local (*gyrBp-lacZ*) ni global (microarrays de cDNA) de una estirpe silvestre. En este estudio no se observó ninguna alteración significativa en la expresión del gen *gidA* tras estrés térmico. Estudios anteriores han propuesto que cambios en la expresión de *gidA*, próximo a *oriC*, podrían contribuir a la desestabilización de la región de *oriC* (Bogan y Helmstetter, 1997). En el caso de HIR, no existen cambios en la transcripción en los alrededores de *oriC* que conduzcan a una alteración de la topología de *oriC* que pudiese explicar la inducción de la replicación.

La predisposición de la doble hélice a su apertura depende del estado de superenrollamiento del DNA, se podría pensar que diferentes niveles basales de superenrollamiento podrían afectar a la apertura inicial de *oriC* y tener un efecto sobre el nivel de la inducción de HIR. Con el objeto de determinar si diferentes estados topológicos se corresponden con diferentes niveles de la replicación termoinducida, se planteó el estudio de la inducción de HIR en mutantes donde la actividad topoisomerasa está alterada. Alteraciones en la actividad de las topoisomerasas llevan a diferentes niveles de superenrollamiento (Aleixandre *et al.*, 1989). Así, el mutante *topA10*, afectado en la actividad de Topo I, presenta un exceso de superenrollamiento negativo, mientras el doble mutante *topA10 gyrA923* presenta una mayor relajación del DNA (Aleixandre *et al.*, 1989). En estas condiciones los niveles de HIR varían entre el 12% observado en el mutante *topA10* y el 43% del doble mutante (Tabla 16). Según estos resultados la inducción de HIR está favorecida cuando el cromosoma se encuentra más relajado y, consecuentemente, una mayor compactación cromosómica afecta negativamente a la inducción de HIR. Se ha demostrado que el DNA superenrollado positivamente es más flexible que el superenrollado negativamente (Selvin *et al.*, 1992). Este aumento de la flexibilidad contribuye de forma significativa a la unión de proteínas a sus secuencias de reconocimiento en el DNA (Grove *et al.*, 1996). Por tanto, un exceso de superenrollamiento negativo podría dificultar el ensamblaje del replisoma en *oriC* al dificultar la interacción de las proteínas con el DNA, mientras que la formación y el ensamblaje de nuevos complejos de replicación tras la apertura termodinámica del DNA serían favorecidos cuando el DNA está más relajado.

Dado que la relajación cromosómica resulta en una mayor inducción de HIR, se estudió esta replicación en presencia de tratamientos inhibidores de la girasa. El cese de la actividad de la girasa al inhibir la subunidad GyrB mediante el empleo de novobiocina conduce a la relajación del DNA. Se sabe que los genes SSG sensibles al superenrollamiento varían su expresión en presencia de novobiocina (Peter *et al.*, 2004).

Tras el tratamiento de novobiocina 1 mg/ml los niveles de HIR observados duplicaron a los obtenidos sin tratamiento y fueron de un 42% (Fig. 18), porcentaje que coincide con el del doble mutante *topA10 gyrA923* (Tabla 16), también con mayor relajación cromosómica. Estos resultados muestran, de nuevo, que la relajación del cromosoma favorece la inducción de HIR.

3. REPLICACIONES TERMOINDUCIDAS EN PRESENCIA DE ÁCIDO NALIDÍXICO

Cuando se inhibió la actividad de la girasa con ácido nalidixico 10 µg/ml que inactiva a la subunidad GyrA de la girasa, no se observaron cambios en la expresión de los SSG ni en la expresión de *gyrBp*, lo que indica que no se dan cambios en el superenrollamiento cromosómico en presencia de nalidixico (apartado 3.2.1 del capítulo 2 de Resultados). Sin embargo, a pesar de no existir cambios en el superenrollamiento, existen un incremento en la inducción de la replicación tras estrés térmico 2,7 veces superior al obtenido sin pretratamiento y 2,16 veces superior al obtenido en presencia de novobiocina. Con el objeto de determinar la naturaleza de esta replicación termoinducida obtenida en presencia de nalidixico, se procedió a un estudio más detallado de estas replicaciones. Las replicaciones termoinducidas obtenidas tras tratamiento con ácido nalidixico parecen tener dos componentes, inducida por el estrés térmico y replicaciones específicamente inducidas por el tratamiento con nalidixico (Fig. 20). Estas replicaciones termoinducidas en presencia de ácido nalidixico parecen ser debidas al propio mecanismo de acción de la droga al ser dependientes de la concentración de ácido nalidixico empleada, alcanzando un máximo de inducción a la concentración subinhibitoria de ácido nalidixico de 10 µg/ml (Fig. 20). A pesar de que el inicio de estas replicaciones se localiza en *oriC* igual que en el caso de HIR, presentan a diferencia de HIR sólo un requerimiento parcial de DnaA y del 13mero-L. Los resultados del análisis de estas replicaciones mediante citometría de flujo muestran que no dan lugar a cromosomas completos y pueden observarse células con hasta ocho cromosomas equivalentes, por lo que no se pueden cuantificar de la misma manera que HIR (Fig. 24).

Previamente, T. Kogoma describió la presencia de replicaciones inducidas por tratamientos inductores de SOS, entre ellos por un tratamiento con ácido nalidixico. Kogoma denominó a esta replicación iSDR (Kogoma 1997). Con el fin de dilucidar si estas replicaciones extras obtenidas en presencia de nalidixico eran del mismo tipo que la descrita por Kogoma, pero con inducción dependiente de la temperatura, se analizaron los dos componentes principales de la replicación de Kogoma: (i) dependencia de la respuesta SOS y (ii) localización de la secuencia de inicio de la replicación tanto en la zona del inicio como en la zona del término.

La relación de la respuesta SOS con la inducción térmica de la replicación en presencia de nalidixico se estudió en un mutante *lexA3* (Ind-) (apartado 4.3 del capítulo 2 de Resultados). Este mutante presenta una activación de la replicación a 41°C de 2,34 veces, ligeramente inferior a la obtenida en su estirpe parental silvestre tras el tratamiento

con ácido nalidixico que es de 3,27 veces (Fig. 22). Este resultado permite concluir que las replications termoinducidas en presencia de ácido nalidixico no son dependientes de la inducción de la respuesta SOS, a diferencia de lo descrito para iSDR por Kogoma (Kogoma, 1979). Este aspecto determina la replicación termoinducida que se observa tras el tratamiento con ácido nalidixico es diferente a iSDR.

Por otro lado iSDR se induce a partir de varios orígenes de replicación que se localizan en la zona de *oriC*, los denominados *oriM1A* y *oriM1B*, y en la zona del término, *oriM2* (Magee *et al.*, 1992). En este trabajo se han realizado experimentos de frecuencia génica por microarrays para determinar dónde se están induciendo las replications en presencia de ácido nalidixico. El inicio de estas replications se localiza únicamente en la región de *oriC* (Fig. 23). Se observa también un pico secundario de inducción cercano a *oriC* donde no se ha descrito previamente la existencia de ningún origen de replicación. La inducción de la replicación en este segundo pico no es específico de esta replicación, sino que también ha sido descrita su presencia en otros estudios (Riber *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia de iSDR, no se detectó termoinducción de la replicación desde la zona del término (Fig. 20A). La localización del origen de la replicación termoinducida en presencia de ácido nalidixico apoya la idea de que esta replicación es diferente a iSDR. En estirpes con DNA deletado, Kogoma localizó también inducción de iSDR en otras zonas del cromosoma (Magee *et al.*, 1992). Cuando se analizó la frecuencia génica durante la replicación termoinducida en presencia de ácido nalidixico en la estirpe CM1671 que presenta una delección completa de *oriC*, no se observó ninguna inducción de la replicación por ácido nalidixico fuera de *oriC* (Fig. 23B). Por tanto, *oriC* es el único sitio del cromosoma de *E. coli* donde tiene lugar la inducción de estas replications.

El mecanismo de acción de las quinolonas como el ácido nalidixico lleva implícito la formación de complejos ternarios DNA-girasa-quinolona (Malik *et al.*, 2006). En el interior de complejos se generan roturas de doble cadena (DSBs) debido a la inhibición del mecanismo de acción de la girasa por el ácido nalidixico. Se ha propuesto que las DSBs pueden dar lugar a estructuras en lazo-D que pueden ser utilizadas para reiniciar la replicación (Kogoma, 1997). Pensando en que estas DSBs pudieran dar lugar a nuevas horquillas de replicación ensambladas en *oriC*, se analizó la presencia de DSBs en condiciones de tratamiento con ácido nalidixico y aumento de temperatura a 41°C (apartado 4.3 del capítulo 2 de Resultados). Los resultados obtenidos muestran que aparece un mayor porcentaje de DSBs tras tratamiento con ácido nalidixico, 43%, frente al 10% observado en ausencia de tratamiento con la droga. Por tanto, un tratamiento con ácido nalidixico 10 µg/ml genera DSBs. Sin embargo, se observa el mismo porcentaje de DSBs a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C (Tabla 18). Por tanto, la existencia de mayor inducción de replicación a 41°C no se explica únicamente por una mayor presencia de DSBs, ya que si la cantidad de DSBs presentes fuera determinante se esperaría la misma inducción de la replicación a 30°C.

Las replicaciones observadas en presencia de nalidixico en el desarrollo de este trabajo presentan un efecto inductor de replicación que es dependiente de la concentración de droga empleada, por lo que la formación de los complejos debe estar relacionada con su inducción (Fig. 20). Estos complejos bloquean la síntesis de DNA y las DSBs que ha generado la girasa atrapadas en el interior del mismo. Se ha descrito que la liberación de las DSBs está mediada por una proteína, independiente de la inducción de la respuesta SOS. En ausencia de síntesis de proteínas, esta proteína que media la reacción de disociación de la girasa del DNA no es expresada no se libera el DNA fragmentado (Drlica, 2004; Malik *et al.*, 2006). La disponibilidad de las DSBs para su uso como estructuras de inicio podría explicar la inducción de replicaciones extras a temperatura elevada. Los complejos formados en el DNA tras tratamiento con quinolonas son complejos reversibles. Estos complejos pueden ser revertidos si la quinolona es eliminada (Pohlhaus y Kreuzer, 2005). También se ha demostrado que el proceso puede ser revertido *in vitro* por adición de EDTA o tratamiento a temperaturas medias (Gellert *et al.*, 1977; Sugino *et al.*, 1977; Snyder y Drlica, 1979; Cozzarelli, 1980; Gellert, 1981). El aumento de temperatura podría facilitar la reanudación de la horquilla de replicación a partir de estas DSBs y de ahí el mayor número de reinicios observados a 41°C que a 30°C. Estas DSBs son generados a lo largo de todo el cromosoma incluido *oriC* (Lothar, 1984). El porqué otras regiones cromosómicas diferentes a *oriC* no constituyen un sustrato para nuevos inicios es un paradigma que puede ser explicado, como en el caso de HIR o de la replicación cíclica, por las propias características estructurales y funcionales de *oriC* que determinan que sea la estructura de inicio de nuevas replicaciones como es la presencia de la RNasa HI.

Por tanto, las replicaciones obtenidas tras tratamiento con ácido nalidixico y altas temperaturas tendrían dos causas. Por un lado, la inducción de HIR, que es específica del estrés térmico, donde la desestabilización de la región del origen de replicación iniciaría las nuevas replicaciones y, por otro lado, la disponibilidad de DSBs formadas debido al mecanismo de acción de las quinolonas que también serían sustrato para establecer nuevos replisomas.

4. REQUERIMIENTOS FUNCIONALES PARA EL INICIO Y LA ELONGACIÓN DE HIR

Una vez caracterizadas las secuencias dentro de *oriC* y el estado de la topología cromosómica necesarios para la inducción de HIR, el siguiente objetivo de este estudio fue determinar sus requerimientos funcionales para explicar el mecanismo de inicio y elongación de la replicación termoinducida en comparación con la replicación cíclica y SDR.

Una vez formado el complejo abierto, debe darse la estructura de replicación necesaria que permita la entrada de la polimerasa y la síntesis de DNA tenga lugar. En *E.*

coli se han descrito diferentes vías para la entrada de la helicasa DnaB en la horquilla de replicación. De las actividades enzimáticas necesarias para establecer un replisoma estable, la actividad helicasa es la primera que se necesita para llevar a cabo la apertura de la doble cadena más allá de la zona termodinámicamente inestable. En el inicio de la replicación cíclica, la apertura inicial de la doble hélice es promovida por la formación de un complejo oligomérico de DnaA que hace girar el DNA y favorece la apertura de la doble hélice en la zona de los 13meros (revisado en Felczak y Kaguni, 2004). La formación de este complejo es posible gracias a la interacción de DnaA con sus secuencias de unión en *oriC* y a la ayuda de la RNA polimerasa y otras proteínas (Bramhill y Kornberg, 1988).

En la replicación cíclica DnaA promueve la apertura del origen de replicación y lleva a cabo la entrada de la helicasa DnaB al complejo abierto. La interacción de DnaA con sus secuencias R1-R5 da lugar a un complejo oligomérico que promueve la distorsión estructural necesaria para facilitar y mantener ese complejo abierto. Es por ello, que DnaA es necesaria tanto para la formación inicial del complejo abierto como para estabilizarlo.

Con el objeto de determinar si la proteína DnaA es necesaria para la inducción de HIR se analizaron diferentes mutaciones que afectan a uno o varios dominios de la proteína DnaA (apartado 1 del capítulo 3 de Resultados). Los mutantes analizados fueron: *dnaA46*, *dnaAR281A*, *dnaA5* y *dnaA508*. No se observó inducción de replicación por estrés térmico en ninguno de estos mutantes (Tabla 19). Por tanto, la funcionalidad de la proteína DnaA es necesaria para la iniciación de HIR.

El mutante *dnaA46* es incapaz de promover el cambio estructural de DnaA a su conformación activa unida a ATP, por tanto, la inducción de HIR requiere DnaA en conformación activa (Tabla 19). La proteína mutante DnaAR281A presenta una mutación en la caja VII dentro del dominio III que hace que esta proteína resulte ineficaz para la formación de este complejo oligomérico, por lo que la formación de un complejo oligomérico entre diferentes proteínas DnaA es necesario para HIR al igual que para la replicación cíclica (Felczak y Kaguni, 2004). La proteína DnaA es necesaria también para asistir a DnaB en su proceso de carga en la horquilla de replicación. DnaA es también necesaria para la carga de DnaB, como resulta del análisis del mutante *dnaA508*. Del análisis de todas estas proteínas DnaA mutantes puede concluirse que la inducción de HIR en *oriC* requiere la proteína DnaA al igual que la replicación cíclica, excepto en la apertura inicial del DNA en *oriC* que sería favorecida por la desestabilización termodinámica del 13mero-L. Sin embargo, la proteína DnaA no es requerida para HIR en el plásmido R1 cuando está integrado en el cromosoma bacteriano. Se ha descrito la dependencia *in vitro*, pero no *in vivo*, de la proteína DnaA para la replicación en el plásmido R1 (revisado en Nordström y Dasgupta, 2006). Por tanto, la necesidad de DnaA para HIR debe estar relacionada con el mecanismo de replicación propio de cada replicón más que con el mecanismo de la replicación termoinducida.

La carga de la helicasa DnaB en el origen de replicación de *E. coli* es un proceso altamente regulado y considerado la clave del ensamblaje del replisoma. En este proceso DnaB es ayudada por DnaC y DnaA para entrar a formar parte de la horquilla de replicación (revisado en Messer, 2002). Kogoma y colaboradores demostraron que tanto iSDR como cSDR, mecanismos de replicación independientes de DnaA, precisa la actividad de PriA para el ensamblaje del primosoma. Sugirieron que para la replicación estable era necesaria parte de la maquinaria de ensamblaje del primosoma del fago ϕ X174 (Kogoma, 1997; Masai *et al.*, 1994). Recientemente se han mostrado datos experimentales que implican directamente a algunas de estas proteínas en la entrada de DnaB en el inicio de cSDR (Sandler, 2005). En el caso de HIR, a pesar de la necesidad de la proteína DnaA, la proteína PriA es también necesaria (Tabla 19).

PriA es necesaria para la entrada de DnaB a la horquilla de replicación en los procesos de reanudación de las horquillas paradas durante la replicación cíclica, por lo que debe reconocer algún tipo de estructura en el cromosoma de *E. coli* donde se une. Los datos obtenidos en este trabajo no permiten distinguir si en HIR el ensamblaje del primosoma en *oriC* tiene lugar vía DnaA o PriA, pero indican que PriA no sólo es necesaria para la replicación HIR (Tablas 20), sino que parece ser limitante ya que su sobreexpresión causa una inducción de HIR del doble de la observada en una estirpe silvestre (Tabla 21). En este trabajo se demuestra que la vía PriA-PriB, pero no la PriA-PriC es necesaria para la inducción de HIR (Tabla 22). Se ha observado además que la ausencia de PriA es suprimida por la mutación *dnaC809*. De hecho, el doble mutante *priA2 dnaC809* presenta mayores niveles de HIR que una estirpe silvestre, de forma similar a cuando PriA es sobreexpresada desde un plásmido (Fig. 25). Esto demuestra que el ensamblaje del primosoma no sólo puede ser llevado a cabo por PriA sino que una proteína DnaC modificada puede sustituirla.

La proteína PriA presenta dos actividades: helicasa y ensamblaje del primosoma. El análisis de HIR en el mutante *priA300*, que no presenta actividad helicasa, mostró inducción de HIR. Por tanto, la actividad helicasa de PriA no es necesaria para la inducción de HIR y PriA debe ser requerida para el ensamblaje del primosoma. La helicasa Rep es necesaria para el ensamblaje del primosoma independiente de PriA en los procesos de reanudación de la horquilla de replicación junto con PriC (Sandler, 2001). El estudio de HIR en el mutante *rep* resultó en la necesidad de la proteína Rep para la inducción de HIR, indicando la necesidad de esta actividad helicasa durante la replicación HIR.

No puede descartarse la necesidad de PriA para el reensamblaje de las horquillas de replicación durante la elongación de HIR. Se ha detectado una menor velocidad de elongación para la replicación HIR comparada con la replicación cíclica (Botello, 1994). Esta velocidad de replicación más lenta podría corresponderse con un mayor número de paradas de la horquilla de replicación tras estrés térmico y/o a una estructura o funcionalidad diferente del replisoma. Respecto al número de paradas de la

horquilla de replicación tras estrés térmico, no se ha detectado un mayor número de DSBs durante HIR (Tabla 30). Sin embargo, se ha descrito la existencia de paradas de la replicación ajenas a la formación de DSBs en mutantes *gyrB^s* (Grompone *et al.*, 2004). En el mutante *gyrB^s*, las paradas se deben a cambios topológicos delante de la horquilla de replicación y las horquillas paradas son reanudadas utilizando la vía PriA-PriB y no es requerida la actividad helicasa de PriA. Se propuso que estas paradas se debían a la formación de concatémeros por el exceso de superenrollamiento positivo en la parte delante de la horquilla de replicación que impediría el avance de la misma (Grompone *et al.*, 2004). En el caso de HIR no se han detectado cambios topológicos tras estrés térmico que den lugar a la formación de este tipo de estructuras y, por tanto, de paradas debidas a cambios estructurales en el DNA. Sin embargo, las propias características estructurales de las horquillas ensambladas tras estrés térmico que presentan notables diferencias respecto a la replicación cíclica, podrían dar cuenta de una menor velocidad de replicación. Debido a que las replications HIR corresponden a replications extras y a que durante un tiempo las horquillas de replicación HIR conviven con las horquillas que llevan a cabo la elongación de las replications cíclicas, la presencia de este mayor número de replications podría producir cambios estructurales en el DNA o inestabilidad en el replisoma que hagan necesaria la presencia de proteínas como RecA, Rep o PriA. Sin embargo, la diferente velocidad también puede ser atribuida a diferencias en la composición o estructura del replisoma. Pol I presenta una menor velocidad de síntesis de DNA que Pol III. La implicación de Pol I en el replisoma de HIR podría explicar la menor velocidad observada ya que esta proteína es estrictamente necesaria para HIR, tanto su actividad polimerasa como exonucleasa (Tabla 24). Esto indica que Pol I tiene un papel más importante en el replisoma en HIR que en la replicación normal. Un papel de la proteína Pol I en la extensión de grandes fragmentos de DNA no puede ser excluido, considerando además que la abundancia absoluta de Pol I en la célula es superior a la de Pol III. HIR es también absolutamente dependiente de Pol III. Por tanto, se podría pensar en un replisoma mixto con los dos tipos de polimerasas como el responsable de la síntesis de DNA en la replicación termoinducida y con una mayor importancia de Pol I como replicasa respecto a la replicación cíclica.

Se ha descrito la presencia de una replicación inducida por daño en el DNA en la que están implicadas diversas polimerasas translesionales de *E. coli* (revisado en Delmas y Matic, 2006). Teniendo en cuenta que HIR requiere estrictamente la actividad de Pol I, se planteó la idea de que otras polimerasas no esenciales pudieran jugar un papel en HIR. Sin embargo, ni Pol II ni Pol V, polimerasas implicadas en procesos de replicación tras un daño en el DNA, son necesarias para la inducción de HIR (Tabla 24).

En los últimos años se ha establecido una interconexión entre los mecanismos de replicación, recombinación y reparación (revisado en Michel, 2006). Estos procesos celulares deben actuar de forma precisa desde microorganismos a humanos y van encaminados al mantenimiento de la estabilidad genómica y la perpetuación celular. La

duplicación del genoma requiere la fidelidad de la copia que viene impuesta por las DNA polimerasas y las enzimas reparadoras de errores. La evolución ha permitido cierta redundancia funcional tendente a asegurar la supervivencia cuando la célula es sometida a una situación de estrés o cuando la replicación del DNA se encuentra comprometida.

Aunque se ha acumulado una extensa información sobre las funciones de RecA y otras proteínas de recombinación, ha sido recientemente cuando se ha propuesto que la importancia de esta proteína radica en el papel que juega en el de mantenimiento de la estabilidad genómica más que en su función en el establecimiento de reordenamientos cromosómicos dependientes de recombinación (Kogoma, 1996; Courcelle *et al.*, 1997; Cox, 2000). Entre las diferentes funciones de RecA está la inducción de la respuesta SOS gracias a su actividad proteásica sobre el represor LexA (apartado 5.1 de Introducción). RecA es también fundamental en procesos que requieren recombinación homóloga y en reparación por recombinación. Recientemente se ha asignado a la proteína RecA un papel estabilizador de la estructura de las horquillas de replicación paradas hasta que éstas son reparadas y la replicación puede continuar (Courcelle y Hanawalt, 2003).

En este trabajo, partiendo del requerimiento de la proteína RecA para HIR determinado por un trabajo anterior en el mutante *recA430*, se ha planteado si HIR es una replicación dependiente de recombinación (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Para ello, se ha estudiado la necesidad de las proteínas de la maquinaria de recombinación y reparación en la inducción de HIR. Respecto a la función de RecA en la activación de la respuesta SOS, se comprobó si existía una relación entre la inducción de HIR y la existencia de SOS. Se analizó HIR en un mutante *lexA3* (Ind⁻) que mostró una inducción de la replicación tras estrés térmico similar a la de la estirpe silvestre (Tabla 26). HIR no es, por tanto, consecuencia de la inducción de SOS.

En referencia a la actividad recombinasa de RecA, HIR requiere, como mínimo, entre un 40% y un 75% de los niveles de actividad recombinasa de RecA. La actividad recombinasa de RecA es necesaria para los procesos de recombinación homóloga y de reparación por recombinación. El mutante *recA423* permite distinguir entre ambas funciones siendo eficiente para la recombinación homóloga, pero no para la reparación por recombinación (Ishimori *et al.*, 1996). El análisis de HIR en este mutante detectó niveles similares a los de la estirpe silvestre (Tabla 26). Por tanto, la función de RecA necesaria para HIR debe estar relacionada con recombinación homóloga, pero no con reparación por recombinación o, en general, indica que los requerimientos de recombinación para HIR no son muy elevados. De hecho, cuando en un mutante *recA* nulo se introduce una segunda mutación que afecta a la actividad exonucleasa de RecD, HIR recupera valores normales. Los mutantes *recA* presentan una degradación específica de los cromosomas recién replicados que es llevada a cabo por RecD (Skarstad y Boye., 1993). Por tanto, la necesidad de la actividad recombinasa de RecA para HIR debe estar relacionada con la prevención de la degradación de cromosomas recién replicados por RecD.

Recientemente se ha descrito la mutación *recAS25P* carente de la función asociada a la estabilización de la horquilla de replicación, aunque presenta niveles normales de recombinación homóloga, de reparación por recombinación y de inducción de la respuesta SOS (Shibata *et al.*, 2005). Cuando se analizó HIR en una estirpe que lleva el alelo *recAS25P* no se observó inducción de la replicación termoinducida (Fig. 27; Tabla 26). Por tanto, la actividad estabilizadora de estructuras de replicación de RecA es necesaria para la estabilización de las horquillas de replicación en HIR. Este dato, junto a otros aportados en esta memoria como la necesidad de PriA o la menor velocidad de elongación, hacen pensar que las replications HIR son más inestables que las cíclicas y probablemente sean estructuralmente diferentes, además de serlo funcionalmente.

Las proteínas de recombinación son necesarias en el inicio de la replicación en iSDR para el establecimiento de la estructura en lazo-D que puede ser usada como origen de replicación (Kogoma, 1997). También se ha descrito el papel de proteínas de recombinación en el proceso de replicación cíclica en *E. coli* asociado a la reparación de DSBs (Michel, 2004). En ambos procesos la proteína RecBCD juega un papel fundamental. La actividad de esta proteína proporciona el sustrato a RecA para la recombinación (Cox, 1998). En ausencia del complejo RecBCD, la mutación *sbcA* induce otra vía de recombinación denominada vía RecET (Kolodner *et al.*, 1994; Kusano *et al.*, 1994). Las mutaciones *sbcB* y *sbcC* promueven también la recombinación homóloga en un fondo *recBC* mediante la activación de la vía RecFOR/RecQJ que promueven recombinación junto con RecA (Lloyd y Low, 1996). En el caso de HIR, cuando el complejo RecBCD está presente en la célula se requiere parcialmente la actividad helicasa de este complejo pero no la exonucleasa. Sin embargo, cuando en un mutante *recBC* se activan otras vías de recombinación como la vía RecFOR/QJ o la vía RecET, se vuelven a observar niveles silvestres de HIR (Tabla 28). Estos resultados apoyan la necesidad de ciertos niveles de recombinación homóloga para que se de HIR. Se ha descrito que la presencia de DSBs es un requisito para la formación de estructuras tipo lazo-D. Con el objeto de dilucidar si estructuras del tipo lazo-D eran necesarias para el ensamblaje del complejo de replicación en el inicio en HIR o durante la elongación, se cuantificó la formación de DSBs a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C no encontrándose diferencias significativas entre ambas condiciones (Tabla 30). Este resultado indica que no existen estructuras del tipo lazo-D que pudieran explicar el inicio de la replicación HIR. Una estructura diferente al lazo-D, probablemente la apertura termodinámica de *oriC*, es la requerida para la iniciación en HIR.

La necesidad de la actividad de recombinación homóloga de RecA podría implicar la presencia de estructuras del tipo intermediario de Holliday al inicio o durante la elongación de HIR. Se ha propuesto la implicación de las proteínas RuvABC y RecG en la resolución de estos intermediarios de recombinación (Sharples y Lloyd, 1993). Los mutantes *ruvAB*, *ruvC*, *ruvABC* o *recG* presentaron niveles silvestres de HIR, por tanto, se puede

concluir que no se forman estructuras tipo Holliday durante el inicio y/o la elongación de HIR (Tabla 29).

HIR, por tanto, presenta bajos requerimientos de recombinación, pero requiere la función estabilizadora de las estructuras de replicación asociada a RecA. Se puede descartar la formación de estructuras en lazo-D e intermediarios de Holliday durante HIR, por lo que los requerimientos de recombinación deben estar asociados con la formación de estructuras no estudiadas en este trabajo.

5. UN MODELO PARA HIR

Los resultados presentados en esta memoria, junto con los obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, llevan a proponer el siguiente modelo para explicar el inicio y la elongación de HIR en *E. coli* (Fig. 35).

El inicio de la replicación termoinducida tendría lugar a causa de una desestabilización termodinámica de la región de *oriC* en la zona del 13mero-L como resultado del cambio de temperatura. El complejo abierto formado debería ser estabilizado por proteínas para impedir que la doble hélice revierta a su estado original, previo a la situación de estrés. La formación de un complejo abierto estable tiene lugar gracias a la interacción de proteínas de unión al DNA de cadena sencilla. Entre estas proteínas se encontraría la proteína DnaA, que no sería necesaria para la apertura inicial de la doble hélice pero sí para la formación de un complejo abierto estable. El complejo abierto sería estabilizado por la unión de RecA. La actividad de RecA podría contribuir al mantenimiento del origen de replicación en su conformación abierta. Las actividades helicasa de RecBCD y Rep podrían contribuir a la extensión de la región abierta. En este complejo abierto, la helicasa RecG puede tener un papel inhibitorio, como demuestra el hecho de que un mutante *recG* presenta niveles de HIR superiores a los de una estirpe silvestre. En este punto estaría conformada la estructura que asegura el ensamblaje del primosoma.

Los resultados presentados en esta memoria excluyen la existencia de una estructura en lazo-D similar a la de iSDR para el inicio de HIR. La falta de estructuras tipo lazo-D y, por tanto, la ausencia de fenómenos de recombinación para formar esa estructura de inicio, descartan que HIR sea considerada una replicación dependiente de recombinación (RDR).

Posteriormente a la apertura de una región del DNA se debe montar el primosoma. Aunque los datos presentados señalan que el ensamblaje del primosoma en el inicio de HIR es dependiente de DnaA, la necesidad estricta de PriA no permite descartar que este ensamblaje sea realizado por PriA. Sea DnaA o PriA, el resultado sería la entrada del

complejo DnaC/DnaB a la horquilla de replicación. A continuación tendría lugar la entrada de la primasa DnaG. Seguidamente deben entrar el resto de proteínas que constituyen el replisoma.

Los datos aportados por este trabajo permiten concluir que tanto Pol I como Pol III forman parte del replisoma de HIR. Este replisoma es más lento que el de la replicación cíclica como señala la menor velocidad de replicación encontrada tras el cambio de temperatura. Esta velocidad de replicación más lenta puede ser debida a una mayor contribución de Pol I en el replisoma de HIR, probablemente en la síntesis de fragmentos de Okazaki de mayor tamaño.

Se ha descrito que las horquillas de replicación durante el proceso de replicación cíclica pueden pararse y desestabilizarse haciéndose necesarias las proteínas de reanudación de la replicación como PriA.

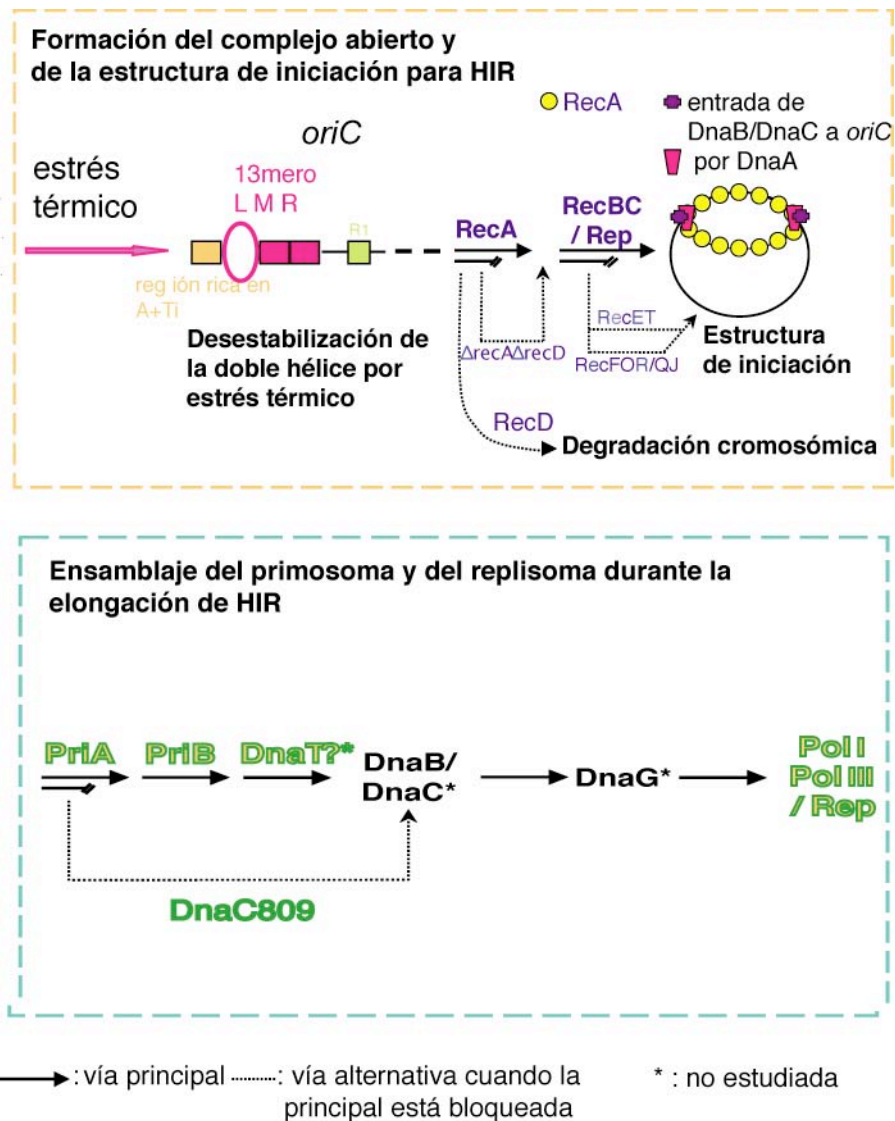


Figura 35. Modelo para el inicio y la elongación de HIR.

La menor velocidad de las horquillas de replicación en HIR podría deberse a un mayor número de paradas durante la elongación de ahí la necesidad de la vía de reensamblaje del primosoma sería PriA-PriB. En ausencia de PriA, la proteína modificada DnaC809 podría dirigir también el ensamblaje del primosoma en HIR.

La necesidad de las proteínas de reanudación de la replicación y de Pol I podrían también estar relacionadas con el mantenimiento de la integridad cromosómica. En células cuya supervivencia celular y/o estabilidad genómica se encuentra amenazada o en mutantes como *rep*, donde se ha demostrado que las horquillas de replicación se paran con mayor frecuencia que en las células silvestres, los productos requeridos para reanudar las horquillas de replicación son limitantes. El hecho de que la sobreexpresión de

productos como PriA aumente el número de orígenes activados por el cambio de temperatura viene a validar esta propuesta.

De igual forma que sucede con la replicación cíclica, y con el fin de mantener la integridad genética, el DNA recién sintetizado debe ser estabilizado y protegido por RecA de la degradación llevada a cabo por RecBCD. Una vez que las horquillas de replicación alcanzan la región del término, los cromosomas recién sintetizados se segregan y, a continuación, tendría lugar la división celular. Otros trabajos llevados a cabo por el grupo de investigación apuntan a que una situación de estrés térmico induce también división celular extra (datos no publicados).

6. HIR SE INDUCE EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS

Los minicromosomas y los plásmidos bacterianos han constituido excelentes modelos para muchos estudios de la replicación cromosómica. El inicio de la replicación de los plásmidos es un proceso crucial ya que garantiza el mantenimiento del plásmido en la célula. Para conocer la biología de un plásmido es necesario conocer cómo el plásmido se adapta a las diferentes condiciones ambientales en las que las células existen. La importancia de conocer cómo los plásmidos responden a condiciones cambiantes radica no sólo en el interés por su biología, sino también en el campo de la biotecnología, ya que distintos tipos de plásmidos se vienen usando como vectores de clonación o de expresión. La variabilidad de las condiciones ambientales que pueden darse en cultivos a gran escala pueden tener repercusiones tanto en la fisiología celular como en la del plásmido, de ahí la gran importancia de saber cómo la replicación plasmídica se regula en respuesta a diferentes condiciones de estrés.

Sin embargo, a pesar de la existencia de numerosos datos bioquímicos sobre los componentes del inicio de la replicación en plásmidos, poco se sabe de los mecanismos de adaptación de la replicación en respuesta a condiciones de estrés ambiental. En el caso del fago λ , se ha descrito que el estrés térmico provoca una desestabilización del complejo de replicación (Wegrzyn *et al.*, 1998). Sin embargo, en determinadas circunstancias como lo es la presencia del represor λ Cro, el complejo de replicación del fago λ puede resistir la situación de estrés térmico dando lugar a un complejo estable con otras proteínas, entre ellas DnaA (Herman-Anotsiewicz *et al.*, 1998; Wegrzyn y Wegrzyn, 2002). En este trabajo se ha estudiado la respuesta de la replicación de distintos tipos de plásmidos correspondientes a distintas categorías frente a una situación de estrés térmico.

Del estudio de HIR en las estirpes CM1893 y LK211, que presentan *oriC* no funcional y la replicación bajo el control del plásmido R1, se concluyó que HIR puede inducirse desde R1. HIR no es, por tanto, un fenómeno específico de *oriC*. Sin embargo, en el caso del plásmido F integrado en el cromosoma no se observaron replications termoinducidas ni desde *oriS* ni desde *oriV*. Deben existir características diferenciales

entre los mecanismos de control de la replicación ambos plásmidos que expliquen la diferente respuesta observada frente a la situación de estrés térmico. Los plásmidos cuyos mecanismos de control están mejor estudiados se encuadran fundamentalmente en dos categorías: (i) control por emparejamiento de orígenes de replicación en plásmidos que contienen iterones (*handcuffing*), y (ii) control por RNA antisentido (asRNA).

Lobner-Olesen determinó que era posible cuantificar el número de copias de minicromosomas y plásmidos utilizando la proteína de fluorescencia verde, *GFPmut2*, como marcador (Lobner-Olesen, 1999). El número de copias de plásmido determinado por monitorización de la fluorescencia de GFP medida por citometría de flujo corresponde con bastante fiabilidad al determinado mediante otras técnicas mucho más lentas y complejas, como es el caso de las técnicas de hibridación. Los plásmidos utilizados en el estudio pertenecen a las dos categorías de control de la replicación de plásmidos. En este estudio fueron utilizadas las construcciones de Lobner-Olesen para el análisis de HIR en moléculas de plásmido libre (Tabla 5).

Los datos analizados en el capítulo 4 de Resultados indican que HIR puede inducirse en minicromosomas y el porcentaje de inducción de orígenes es similar al obtenido en el cromosoma (Fig. 30). El minicromosoma pALO267 presenta el sistema *sopABC*, natural del plásmido F, que presta estabilidad al minicromosoma. La presencia de este elemento no afecta a la inducción de HIR. Estos resultados indican que a pesar de las diferencias existentes en el control de la replicación entre *oriC* y los minicromosomas, la inducción de HIR resulta similar en ambos sistemas.

Resulta llamativa la inducción de HIR en los plásmidos donde el control de la replicación es ejercido por iterones. Cuando el plásmido F se encuentra integrado en el cromosoma no se induce HIR. Sin embargo, HIR puede observarse en el plásmido F cuando este se encuentra como plásmido libre y a un nivel similar al observado en minicromosomas o en el cromosoma. El nivel de inducción de HIR en el plásmido pALO270 (*P1ΔincA*) fue similar al observado en minicromosomas y en el plásmido F (Fig. 31). En cambio, el plásmido pALO284 (pSC101), también con control de la replicación ejercido por iterones, mostró el doble de inducción de HIR que F y *P1ΔincA*. Los plásmidos con iterones en la secuencia de su origen de replicación controlan su replicación mediante el secuestro por emparejamiento de orígenes. Este mecanismo está basado en las interacciones entre dos proteínas RepE unidas a los orígenes de plásmidos diferentes. Se ha propuesto que este complejo genera impedimentos estéricos que anulan la disponibilidad del origen de replicación para que la iniciación tenga lugar. Los impedimentos estéricos pueden ser mayores entre cromosomas que entre plásmidos, que son moléculas de tamaño mucho menor y esto explicaría el hecho de que HIR pueda ser inducido en F como plásmido libre y no cuando está integrado en el cromosoma. Además, el nivel de superenrollamiento y su efecto sobre la regulación de estos replicones plasmídicos puede ser muy diferente cuando está integrado en el cromosoma bacteriano de cuando está libre en la célula.

Cuando se estudió la inducción de HIR en plásmidos donde el control de la replicación es ejercido por un asRNA, las inducciones de HIR fueron las más altas encontradas, llegando al 86% en el caso del plásmido pALO269 (pBR322) (Fig. 32C). En el caso del plásmido pALO261 (R1) la inducción de HIR alcanza un valor del 26%, algo superior al observado cuando el replicón está integrada en el cromosoma (Fig. 14 y Fig. 32A). Como en el plásmido F, la regulación de la replicación en este tipo de plásmidos parece ser diferente cuando están como plásmido libre de cuando está integrado en el cromosoma. El alto nivel de inducción observado en los plásmidos controlados por asRNA respecto a los controlados por iterones puede deberse a que la molécula de RNA sea termodinámicamente más inestable, comparada con la estabilidad de proteínas, y el control impuesto sobre el número de copias de plásmido tras estrés térmico ser más lábil en este caso. Estos resultados tienen gran importancia desde el punto de vista biotecnológico porque estos plásmidos son, de los estudiados, los más utilizados.

Se concluye, por tanto, que HIR parece ser una respuesta universal común para todos los replicones que contengan en su secuencia de inicio una agrupación rica en A+T, que por sus características estructurales, conlleva la presencia de un sitio SIDD, termodinámicamente inestable. La existencia de secuencias similares al 13mero-L de *oriC* parece ser bastante común en el mundo bacteriano.

Conclusiones

1. El inicio de la replicación termoinducida tiene lugar sólo en *oriC*
2. El inicio de HIR requiere la secuencia del 13mero-L de *oriC* donde se localiza el sitio preferente de apertura de la doble hélice (sitio SIDD) en *oriC*.
3. El estrés térmico no provoca cambios en la topología del cromosoma. Por tanto, HIR no puede ser atribuida a una alteración topológica del DNA tras estrés térmico.
4. La inducción de HIR depende del grado de superenrollamiento del DNA previo al estrés térmico. La relajación del DNA aumenta el nivel de HIR y el aumento del superenrollamiento negativo lo disminuye.
5. Un pretratamiento con ácido nalidixico aumenta notablemente la inducción de la replicación de estrés térmico. La replicación termoinducida en presencia de ácido nalidixico inicia en la región de *oriC* y no da lugar a cromosomas completos. Esta replicación es independiente de la inducción de la respuesta SOS. La inducción de la replicación por estrés térmico en presencia de ácido nalidixico se debe parcialmente a HIR y parcialmente a una inducción causada por la inhibición específica de la subunidad GyrA de la girasa.
6. La iniciación de HIR requiere la proteína DnaA.
7. HIR requiere la vía PriA-PriB de ensamblaje del primosoma. La proteína PriA no sólo es necesaria, sino limitante en la inducción de HIR. En ausencia de PriA, la proteína mutante DnaC809 es capaz de realizar el ensamblaje del primosoma. La helicasa Rep es estrictamente requerida para la replicación HIR.
8. El replisoma de HIR está compuesto por las polimerasas Pol I y Pol III. Pol I es indispensable para la replicación termoinducida.
9. HIR requiere las actividades de recombinación homóloga y de mantenimiento de las estructuras de replicación asociadas a RecA. La actividad de RecA es requerida sólo cuando la función exonucleasa de RecBCD está activa.
10. HIR es parcialmente dependiente de la actividad helicasa de RecBCD. En mutantes *recBC*, esta función puede ser suplida por los complejos RecFOR/QJ o RecET.

Conclusiones

11. HIR no es una replicación dependiente de recombinación (RDR) a pesar de requerir RecA y, parcialmente, RecBCD. No se han detectado roturas de DNA de cadena doble que pudieran generar un lazo-D como la estructura de inicio de HIR.
12. El plásmido F no presenta HIR cuando se encuentra integrado en el cromosoma de *E. coli*, ni desde *oriS* ni desde *oriV*. Por el contrario, el plásmido R1 induce HIR cuando se encuentra integrado en el cromosoma.
13. Se ha detectado la presencia de replications inducidas por estrés térmico en los plásmidos F, P1, pSC101, R1, pBR322 y p15A cuando éstos se encuentran libres en el citoplasma celular. Esto indica que HIR es una respuesta al estrés térmico probablemente de carácter general en el mundo bacteriano.
14. Tanto en *oriC* como en todos los orígenes de replicación de los plásmidos estudiados se ha localizado la existencia de una secuencia SIDD que podría justificar los inicios de la replicación termoinducida.

Bibliografía

- **Abeles, A.L., Reaves, L.D., Youngren-Grimes, B., y S.J. Austin.** 1995. Control of P1 plasmid replication by iterons. *Mol. Microbiol.* **18**:903-912.
- **Abeles, AL, y SJ Austin.** 1988. P1 plasmid replication requires *Escherichia coli* Dam-methylated DNA. *Gene* **74**:185-186.
- **Adachi, T, Mizuuchi K, Menzel R, y M Gellert.** 1984. DNA sequence and transcription of the region upstream of the *Escherichia coli* gyrB gene. *Nucleic Acids Res.*;12(16):6389-95.
- **Adamcik, J., Viglasky, V., Valle, F., Antalík, M., Podhradský, D., y G. Dietler.** 2002. Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability. *Electrophoresis* **23**:3300-3309.
- **Ak, P., y C.J. Benham.** 2005. Susceptibility to superhelically driven DNA duplex destabilization: a highly conserved property of yeast replication origins. *PLoS Comput Biol.* **1**:e7.
- **Aleixandre V, y M. Blanco.** 1987. Heterogeneity in the level of ampicillin resistance conferred by pBR322 derivatives with different DNA supercoiling. *Mol Gen Genet.* **209**(1):56-60.
- **Aleixandre, V., Urios, A., Herrera, G., y M. Blanco.** 1989. New *Escherichia coli* gyrA and gyrB mutations which have a graded effect on DNA supercoiling. *Mol Gen Genet.* **219**(1-2):306-312.
- **Amundsen, S.K., y G. R. Smith.** 2003. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell.*112:741-744.
- **Armengod, M. E.** 1982. recF-dependent recombination as a SOS function. *Biochimie.* **64**:629-32.
- **Arsene F, Tomoyasu T, y B Bukau.** 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:3-9.
- **Asai T., Sommer, S., Bailone, A., y T Kogoma.** 1993. Homologous recombination-dependent initiation of DNA replication from DNA damage-inducible origins in *Escherichia coli* *EMBO J.* **12**: 3287-3295.
- **Asai, T., y T. Kogoma.** 1994. D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **176**:1807-1812.
- **Bahloul, A., Boubrik, F., y J Rouviere-Yaniv.** 2001. Roles of *Escherichia coli* histone-like protein HU in DNA replication: HU-beta suppresses the thermosensitivity of *dnaA46ts*. *Biochimie* **83**:219-229.
- **Baker, T. A., y A. Kornberg.** 1988. Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell* **55**:113-123.
- **Bates, D.B., Asai, T., Cao, Y., Chambers M.W., Cadwell, G.W., Boye, E., y T. Kogoma.** 1995. The DnaA box R4 in the minimal *oriC* is dispensable for initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *Nucleic Acids Res.* **23**(16):3119-25.

- **Bates, D.B., Boye, E., Asai, T., y T. Kogoma.** 1997. The absence of effect of *gid* or *mioC* transcription on the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:12497-12502.
- **Beachmam, I. R., P. T. Barth y R. H. Pritchard.** 1968. Constitutivity of thymidine phosphorylase in deoxyriboaldolase negative strains: dependence on thimine requirement and concentration. Bioph. Biochem. Abstrac **166**: 589-592.
- **Been, M.D., y J.J. Champoux.** 1980. Breakage of single-stranded DNA by rat liver nicking-closing enzyme with the formation of a DNA-enzyme complex. Nucleic Acids Res.**8**(24):6129-42.
- **Benham, C.J.** 1980. Kinetics of reactions involving DNA containing stress-induced single-stranded regions. Biopolymers **19**:2143-2164.
- **Benham, C.J.** 1981. Theoretical analysis of competitive conformational transitions in torsionally stressed DNA. J. Mol. Biol. **150**:43-68.
- **Benham, C.J., y C. Bi.** 2004. The analysis of stress-induced duplex destabilization in long genomic DNA sequences. J Comput Biol. **11**(4):519-43.
- **Bernander, R., Dasgupta, S., y K. Nordstrom.** 1991. The *E. coli* cell cycle and the plasmid R1 replication cycle in the absence of the DnaA protein. Cell **64**:1145-1153.
- **Betteridge, T., Yang, J., Pittard, A.J., Praszquier, J.** 2004. Role of RepA and DnaA proteins in the opening of the origin of DNA replication of an IncB plasmid. J Bacteriol. **186**(12):3785-93.
- **Biek, D.P., y S.N. Cohen.** 1989. Involvement of integration host factor (IHF) in maintenance of plasmid pSC101 in *Escherichia coli*: characterization of pSC101 mutants that replicate in the absence of IHF. J. Bacteriol. **171**:2056-2065.
- **Bierne, H., Ehrlich, S.D., y B. Michel.** 1997. Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. EMBO J. **16**:3332-40.
- **Bierne, H., Seigneur, M., Ehrlich, S.D., y B. Michel.** 1997. uvrD mutations enhance tandem repeat deletion in the *Escherichia coli* chromosome via SOS induction of the RecF recombination pathway. Mol Microbiol. **26**:557-567.
- **Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, y Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. **277**(5331):1453-1474.
- **Boeneman, K. y E. Crooke.** 2005. Chromosomal replication and the cell membrane. Current Opinion in Microbiology **8**:143-148.
- **Boeneman, K. y E. Crooke.** 2006. Spatial relationship between the chromosomal origin and membrane rafts of acidic phospholipid during the *Escherichia coli* cell-cycle. EMBO Workshop on Cell Cycle and Cytoskeletal Elements in Bacteria. pp.75.
- **Bogan, J.A., y C.E. Helmstetter.**1997. DNA sequestration and transcription in the oriC region of *Escherichia coli*. Mol Microbiol.**26**(5): 889-96

- **Botello, E.** 1994. Inducción térmica del inicio de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*. Tesis Doctoral. Departamento de Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. ISBN. 84-7723-725-5.
- **Botello, E., y A. Jimenez-Sanchez.** 1997. A temperature upshift induces initiation of replication at *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* **26**:133-144.
- **Boye, E., Lobner-Olesen, A., y K. Skarstad.** 2000. Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep.* **1**:479-483.
- **Bramhill, D., y A. Kornberg.** 1988. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**:915-918.
- **Breier, A.M., Weier, H.U., Cozzarelli, N.R.** 2005. Independence of replisomes in *Escherichia coli* chromosomal replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 15;102(11):3942-7.
- **Bremer, H, y S Lin-Chao.** 1986. Analysis of the physiological control of replication of ColE1-type plasmids. *J. Theor. Biol.* **123**:453-470.
- **Brendler T, Abeles A, y S Austin.** 1995. A protein that binds to the P1 origin core and the *oriC* 13mer region in a methylation-specific fashion is the product of the host *seqA* gene. *EMBO J.* **14**:4083-4089.
- **Budman, D. R. y A. B. Pardee.** 1967. Thymidine and thymine incorporation into nucleic acid: inhibition and repression by uridine of thymidine phosphorylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **94**: 1546-1550.
- **Bukau, B., y G. C. Walker.** 1989. *dnaK52* mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenance at normal growth temperatures. *J. Bacteriol.* **171**:6030-6038
- **Burland, V., Plunkett, G. 3rd, Daniels, D.L., y F.R. Blattner.** 1993. DNA sequence and analysis of 136 kilobases of the *Escherichia coli* genome: organizational symmetry around the origin of replication. *Genomics* **16**:551-561.
- Cangai 2004
- **Campbell, J.L., y N. Kleckner.** 1990. *Escherichia coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* **62**:967-979.
- **Camps, M., y L.A. Loeb.** 2004. When Pol I goes into high gear: processive DNA synthesis by pol I in the cell. *Cell Cycle.* **3**:116-8.
- **Canghai Lu, Albano CR, Bentley WE y G. Rao.** 2005. Quantitative and kinetic study of oxidative stress regulons using green fluorescent protein. *Biotechnol Bioeng.* **89**(5):574-87.
- **Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez y D. Vinella.** 1996. The stringent response. *Escherichia coli* and Salmonella : Cellular and Molecular Biology. 2da edic. F. C. Neidhardt *et al* (eds.), ASM, Washington, D. C., pp. 1458-1496.
- **Cassler, M.R., Grimwade, J.E., y A.C. Leonard.** 1995. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *EMBO J.* **14**:5833-5841.

- **Chen CR, Malik M, Snyder M, y K. Drlica.** 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol.* **258**(4):627-637. **Clark, A.J., y S.J. Sandler.** 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit Rev Microbiol.* **20**(2):125-42
- **Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., y R.B. Helling.** 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**:3240-3244.
- **Cormack, B.P., Valdivia, R.H. y S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
- **Courcelle J, Carswell-Crumpton C, y PC Hanawalt.** 1997. *recF* and *recR* are required for the resumption of replication at DNA replication forks in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(8):3714-9.
- **Courcelle, J., Ganesan A.K., y P.C. Hanawalt .** 2001. Therefore, what are recombination proteins there for? *Bioessays.* **23**:463-70.
- **Courcelle, J., y P.C. Hanawalt.** 2003. RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet.* **37**:611-646.
- **Cox, M.M.** 1999. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **63**:311-366.
- **Cox, M.M.** 2001. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet.* **35**:53-82.
- **Cozzarelli N. R.** 1980. DNA topoisomerases. *Cell.* **22** (2 Pt 2):327-8. **Cozzarelli NR, Cost GJ, Nollmann M, Viard T, Stray JE.** 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(8):580-588.
- **Champoux JJ.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* **70**:369-413.
- **Chattoraj D. K.** 2000. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**: 467-476.
- **Churchward, G., Linder, P., y L. Caro.** 1984. Replication functions encoded by the plasmid pSC101. *Adv. Exp. Med. Biol.* **179**:209-214.
- **Churchward, G., E. Estiva y H. Bremer.** 1981. Growth rate-dependent control of chromosome replication initiation in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **145**: 1232-1238.
- **D'Arcy A, Stihle M, Kostrewa D, y G. Dale.** 1999. Crystal engineering: a case study using the 24 kDa fragment of the DNA gyrase B subunit from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **55**(Pt 9):1623-5.
- **Dasgupta S, y A. Lobner-Olesen.** 2004. Host controlled plasmid replication: *Escherichia coli* minichromosomes. *Plasmid.* **52**(3):151-68.
- **Datta HJ, Khatri GS, y D Bastia.** 1999. Mechanism of recruitment of DnaB helicase to the replication origin of the plasmid pSC101. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:73-78.
- **del Solar G, y M. Espinosa.** 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol.* **37**(3):492-500.
- **del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, y R Diaz-Orejas.** 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:434-

464.

- **Delmas, S y I. Matic.** 2006. Interplay between replication and recombination in *Escherichia coli*: impact of the alternative DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(12):4564-9.
- **den Blaauwen T, Aarsman ME, Wheeler LJ, Nanninga N.** 2006. Pre-replication assembly of *Escherichia coli* replisome components. *Mol Microbiol.* 62(3):695-708.
- **Deng, S., Stein, R.A., y N.P. Higgins.** 2005. Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol Microbiol.* 57(6):1511-1521.
- **Diaz, R., Nordstrom, K., y W.L. Staudenbauer.** 1981. Plasmid R1 DNA replication dependent on protein synthesis in cell-free extracts of *E. coli*. *Nature* **289**:326-328.
- **Dibbens JA, Muraiso K, y DK Chatteraj.** 1997. Chaperone-mediated reduction of RepA dimerization is associated with RepA conformational change. *Mol. Microbiol.* **26**:185-195.
- **Dixon, N.E. y A. Kornberg.** 1984. Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:424-428.
- **Donachie, W. D.** 2001. Co-ordinate regulation of the *Escherichia coli* cell cycle or The cloud of unknowing. *Mol. Microbiol.* **40**: 779-785.
- **Drlica, K. y M. Malik.** 2003. Fluoroquinolones: Action and Resistance. *Current topics in Medicinal Chemistry.* 3: 249-282.
- **Drlica, K., Engle, E.C. y S.H. Manes.** 1980. DNA gyrase on the bacterial chromosome: possibility of two levels of action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **77**(11):6879-83.
- **Eguchi, Y., y J. Tomizawa.** 1991. Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol.* 220(4):831-842.
- **Eliasson A, Bernander R, y K Nordstrom.** 1996. Random initiation of replication of plasmids P1 and F (*oriS*) when integrated into the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* **20**:1025-1032.
- **Espeli, O., y K.J., Mariani.** 2004. Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol.* 252(4):925-931.
- **Erzberger JP, Pirruccello MM, y J. M. Berger.** 2002. The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation. *EMBO J.* 21(18):4763-73.
- **Fang L., Davey M.J., y M. O'Donnell.** 1999. Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol. Cell* **4**:541-553.
- **Fangman, W.L., y A. Novick.** 1966. Mutant bacteria showing efficient utilization of thymidine. *J Bacteriol.* 90:2390-3001.
- **Felczak, M.M., y J.M. Kaguni.** 2004. The box VII motif of *Escherichia coli* DnaA protein is required for DnaA oligomerization at the *Escherichia coli* replication origin. *J Biol Chem.* 279(49):51156-62.

- **Fernandez De Henestrosa, A.R., Ogi T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., y R.** 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **35**:1560-1572.
- **Fernandez-Tresguerres, M.E., Martin, M., Garcia de Viedma, D., Giraldo, R., y R. Diaz-Orejas.** 1995. Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J. Bacteriol.* **177**:4377-4384.
- **Fijalkowska, I.J., Dunn R.L., y R.M. Schaaper.** 1997. Genetic requirements and mutational specificity of the *Escherichia coli* SOS mutator activity. *J Bacteriol.* **179**:7435-45.
- **Flores, M.J., Ehrlich, S.D., y B. Michel.** 2002. Primosome assembly requirement for replication restart in the *Escherichia coli* holDG10 replication mutant. *Microbiol.* **44**:783-792.
- **Foster, P.L.** 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat Res.* **569**:3-11.
- **Franco, R.J., y K Drlica.** 1989. Gyrase inhibitors can increase *gyrA* expression and DNA supercoiling. *J. Bacteriol.* **171**:6573-6579.
- **Froelich JM, Phuong TK, y JW Zyskind.** 1996. Fis binding in the *dnaA* operon promoter region. *J. Bacteriol.* **178**:6006-6012.
- **Fuller RS, Funnell BE, y A Kornberg.** 1984. The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* **38**:889-900.
- **Gamas P, Burger AC, Churchward G, Caro L, Galas D, y M Chandler.** 1986. Replication of pSC101: effects of mutations in the *E. coli* DNA binding protein IHF. *Mol. Gen. Genet.* **204**:85-89.
- **Gardner, T.S., di Bernardo D., Lorenz D., y J.J.Collins.** 2003. Inferring genetic networks and identifying compound mode of action via expression profiling. *Science.* **301**:102-105.
- **Gellert M, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa J.** 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**(12):4474-8.
- **Germينو, J., y D. Bastia.** 1983. Interaction of the plasmid R6K-encoded replication initiator protein with its binding sites on DNA. *Cell* **34**:125-134.
- **Gil, D., y J. P. Bouche.** 1991. ColE1-type vectors with fully repressible replication. *Gene.* **105**:17-22.
- **Gillen, J.R., Willis, D.K. y A.J. Clark.** 1981. Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **145**:521-32.
- **Giraldo, R., Fernandez-Tornero, C., Evans, P.R., Diaz-Orejas, R., y A. Romero.** 2003. A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat. Struct. Biol.* **10**:565-571.
- **Giraldo, R., y R. Diaz.** 1992. Differential binding of wild-type and a mutant RepA protein to *oriR* sequence suggests a model for the initiation of plasmid R1 replication. *J. Mol. Biol.* **228**:787-802.

- **Giraldo, R.** 2003. Common domains in the initiators of DNA replication in Bacteria, Archaea and Eukarya: combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* **26**(5):533-54.
- **Glover, B.P., y C.S. McHenry.** 1998. The chi psi subunits of DNA polymerase III holoenzyme bind to single-stranded DNA-binding protein (SSB) and facilitate replication of an SSB-coated template. *J Biol Chem.* **273**(36):23476-84.
- **Gonzalez-Soltero, R., Botello, E., y A. Jimenez-Sanchez.** 2006. Initiation of heat-induced replication requires DnaA and the L-13-mer of *oriC*. *J Bacteriol.* **188**(23):8294-8298.
- **Grompone, G., Ehrlich, S.D., y B. Michel.** 2003. Replication restart in *gyrB Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol.* **48**:845-854.
- **Grove, A., Galeone, A., Mayo, I. L., y E.P. Geiduschek.** 1996. Localized DNA flexibility contributes to target site selection by DNA-bending proteins. *J. Mol. Biol.* **260**:120-125.
- **Guzman, LM, Belin, D, Carson, MJ, y J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-4130.
- **Guzman, E.C., Caballero, J.L., Jimenez-Sanchez, A.** 2002. Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **43**(2):487-495.
- **Haber JE.** 1999. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci.* **24**(7): 271-275.
- **Handa, H., y I., Kobayashi.** 2003. Accumulation of large non-circular forms of the chromosome in recombination-defective mutants of *Escherichia coli*. *BMC Mol Biol.* **4**:5.
- **Hansen, E.B., y M.B. Yarmolinsky.** 1986. Host participation in plasmid maintenance: dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4423-4427.
- **Hardy, C.D., y N.R. Cozzarelli.** 2005. A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *J. Mol Microbiol.* **57**(6):1636-165252.
- **Hasunuma, K., y M. Sekiguchi.** 1977. Replication of plasmid pSC101 in *Escherichia coli* K12: requirement for *dnaA* function. *Mol. Gen. Genet.* **154**:225-230.
- **Heddle, J.G., Mittelheiser S, Maxwell, y N. H. Thompson.** 2004. Nucleotide binding to DNA gyrase causes loss of DNA wrap. *J Mol Biol.* **337**(3):597-610.
- **Helmstetter, C.E., y A.C. Leonard.** 1987. Coordinate initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:3489-3494.
- **Helmstetter, C.E., Thornton, M., Zhou, P., Bogan, J.A., Leonard, A.C., y J. E. Grimwade.** 1997. Replication and segregation of a minif plasmid during the division cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **179**(4):1393-1399.
- **Herman-Antosiewicz, A., Wegzyn, A., Taylor, K. y G. Wegzyn.** 1998. DnaA-mediated regulation of phage lambda-derived replicons in the absence of pR and Cro

- function. *Virology*. 249 (1):98-107.
- **Hiasa, H., y K.J. Mariani.** 1994. Fis cannot support *oriC* DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:24999-25003.
 - **Hinds, T., y S. J. Sandler.** 2004. Allele specific synthetic lethality between *priC* and *dnaAts* alleles at the permissive temperature of 30 degrees C in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* 4:47.
 - **Hingorani, MM, y M. O'Donnell.** 1998. ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem.* **273**(38):24550-63.
 - **Holmes ML, Pfeifer F, Dyall-Smith ML.** 1995. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene.* **153**(1):117-21.
 - **Horii, Z., y Clark, A.J.** 1973. Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol.* **80**: 327-44.
 - **Horiuchi T, y Y. Fujimura.** 1995. Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork: a model based on analysis of an *Escherichia coli* strain with a chromosome region difficult to replicate. *J Bacteriol.* **177**(3):783-791.
 - **Hoshino K, Kitamura A, Morrissey I, Sato K, Kato J, Ikeda H.** 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(11):2623-2627.
 - **Hwang, D.S., y A. Kornberg.** 1990. A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E. coli* minichromosome. *Cell* **63**: 325-331.
 - **Hwang, D.S., y A., Kornberg.** 1992. Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem.* **267**(32): 23083-6.
 - **Ishimori, K., Sommer, S., Bailone, A., Takahashi, M., Cox, M. M. y R. Devoret.**1996. Characterization of a Mutant RecA Protein that Facilitates Homologous Genetic Recombination but not Recombinational DNA Repair: RecA423. *J Mol Biol.* **264**:696-712.
 - **Ishioka, K., Iwasaki, H., y H. Shinagawa.** 1997. Roles of the *recG* gene product of *Escherichia coli* in recombination repair: effects of the delta *recG* mutation on cell division and chromosome partition. *Genes Genet Syst.* **72**: 91-99.
 - **Ivancic-Bace I., Peharec P., Moslavac S., Skrobot N., Salaj-Smic E., y K. Brcic-Kostic.** 2003. RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient *recB* mutant of *Escherichia coli*. *Genetics.*163:485-494.
 - **Jacob F, y S Brenner .** 1963. On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci.* **256**:298-300.
 - **Jacq A., y B. Holland.** 1991. Control of the bacterial cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**:237-241.
 - **Jeong, K.S., Ahn J., y Khodursky, A.B.** 2004. Spatial patterns of transcriptional activity in the chromosome of *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **5**(11):R86.
 - **Jeong, K.S., Xie, Y., Hiasa, H., y A. B. Khodursky.** 2006. Analysis of pleiotropic

- transcriptional profiles: a case study of DNA gyrase inhibition. *PLoS Genet.* 2(9):e152.
- **Jimenez-Sanchez, A. y J. Jiménez-Martínez.** 1998. *Genetica Microbiana*. Editorial Síntesis.
 - **Jiménez-Sánchez, A., Guzmán, E. C., Botello E. C.** 1993. An approach to the control of initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Current Topics in Molecular Genetics*,1:33-48.
 - **Jiménez-Sánchez, A., y E. C. Guzmán.** 1988. Direct procedure for determination of the number of replication forks and the reinitiation fraction in bacteria. *CABIOS* 4:431-433.
 - **Johnson, A., y M. O'Donnell.** 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem.*74:283-315.
 - **Kaguni JM.** 2006. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu Rev Microbiol.* 60:351-75.
 - **Kaguni, J. M.** 1997. *Escherichia coli* DnaA protein: the replication initiator. *Mol. Cells* 7:145-157.
 - **Katayama T., Kubota T., Kurokawa K., Croke E., y K. Sekimizu.** 1998. The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94:61-71.
 - **Kato M, y A. Furuno.** 1992. Unusual structure of plasmid DNA formed in transformants of *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 143(7):665-9.
 - **Kato J.** 2005. Regulatory network of the initiation of chromosomal replication in *Escherichiacoli*. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40(6):331-42.
 - **Kato J., y T. Katayama.** 2001. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20:4253-4262.
 - **Kawasaki, Y., Matsunaga, F., Kano, Y., Yura, T., y C. Wada.** 1996. The localized melting of mini-F origin by the combined action of the mini-F initiator protein (RepE) and HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 253:42-49.
 - **Kelman, Z., y M. O'Donnell.** 1995. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* 64:171-200.
 - **Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., y KJ Marians.** 1996. Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* 84:643-650.
 - **Kimura T, Asai T, Imai M, y M Takanami.** 1989. Methylation strongly enhances DNA bending in the replication origin region of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 219:69-74.
 - **Khodursky A.B, Peter B.J., Schmid MB, DeRisi J, Botstein D, Brown PO, y N. R. Cozzarelli.** 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97 (17):9417-24.
 - **Kogoma T, y K.G. Lark.** 1975. Characterization of the replication of *Escherichia coli* DNA in the absence of protein synthesis: stable DNA replication. *J. Mol. Biol.* 94:243-256.
 - **Kogoma, T.** 1996. Recombination by replication. *Cell.* 85:625-627.

- **Kogoma, T.** 1997. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:212-238.
- **Kolodner R., Hall S.D., y C. Luisi-DeLuca.** 1994. Homologous pairing proteins encoded by the *Escherichia coli* recE and recT genes. *Mol Microbiol.* 11:23-30.
- **Kollek, R, Oertel, W., y W. Goebel.** 1978. Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. *Mol. Gen. Genet.* **162**:51-57.
- **Koppes, L, y K. Nordstrom.** 1986. Insertion of an R1 plasmid into the origin of replication of the *E. coli* chromosome: random timing of replication of the hybrid chromosome. *Cell* **44**:117-124.
- **Koppes, LJ, Woldringh CL, Nanninga N.** 1999. *Escherichia coli* contains a DNA replication compartment in the cell center. *Biochimie*;81(8-9):803-10.
- **Kornberg, A., y T. Baker.** 1992. *DNA Replication*, 2da edic, New York: W. H, Freeman y Compañía.
- **Kowalczykowski S. C.** 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* 25:156-165.
- **Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehauer, W.M.** 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* 58(3):401-65.
- **Kowalski, D., y M.J. Eddy.** 1989. The DNA unwinding element: a novel, *cis*-acting component that facilitates opening of the *Escherichia coli* replication origin. *EMBO J.* **8**:4335-4344.
- **Kozłowski, M., Thatte, V., Lau, P.C., Visentin, L.P., y V.N. Iyer.** 1987. Isolation and structure of the replicon of the promiscuous plasmid pCU1. *Gene* **58**:217-228.
- **Krause, M., y W. Messer.** 1999. DnaA proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: coordinate actions with single-stranded DNA-binding protein and interspecies inhibition during open complex formation at the replication origins. *Gene* **228**:123-132.
- **Kreuzer, KN.** 2000. Recombination-dependent DNA replication in phage T4. *Trends Biochem Sci.* (4):165-73.
- **Kusano, K., Takahashi N.K., Yoshikura H., Kobayashi I.** 1994. Involvement of RecE exonuclease and RecT annealing protein in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Gene.* 138:17-25.
- **Kuzminov, A.** 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(4):751-813.
- **Lakowicz, J.** 1998. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, pp 1-24.
- **Lamour, V, Hoermann, L, Jeltsch, JM, Oudet, P, y D. Moras.** 2002. An open conformation of the *Thermus thermophilus* gyrase B ATP-binding domain. *J Biol Chem.* 277(21):18947-53.
- **Langer, U, Richter, S, Roth, A, Weigel, C, y W Messer.** 1996. A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*

21:301-311.

- **Larminat, F., Cazaux, C., Germanier, M., y M. Defais.** 1992. New mutations in and around the L2 disordered loop of the RecA protein modulate recombination and/or coprotease activity. *J Bacteriol.* **174**:6264-9.
- **Laskos, L., Ryan, C.S., Fyfe, J.A., y J.K. Davies.** 2004. The RpoH-mediated stress response in *Neisseria gonorrhoeae* is regulated at the level of activity. *J. Bacteriol.* **186**:8443-8452.
- **László N. Csonka y A. J. Clark.** 1979. Deletions generated by the transposon Tn10 in the *srl recA* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Genetics* **93**: 321-343.
- **Lee, E.H., y A. Kornberg.** 1991. Replication deficiencies in *priA* mutants of *Escherichia coli* lacking the primosomal replication *n'* protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:3029-32.
- **Lehman, I.R., y D.G. Uyemura.** 1976. DNA polymerase I: essential replication enzyme. *Science* **193**:963-969.
- **Lemon, K.P., y A.D. Grossman.** 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**:1516-1519.
- **Leonard, A.C., Whitford WG, y C.E. Helmstetter.** 1985. Involvement of DNA superhelicity in minichromosome maintenance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **161**(2): 687-695.
- **Leonard, A.C., y J.E. Grimwade.** 2005. Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol.* **55**(4):978-985.
- **Leonard, A.C., Grimwade, J. E., Nievera, C., Torgue, J.C.J., McGarry, K.C., and S.Chandan.** Examining the role of I sites in initiation timing and resetting the *E. coli* orisome complex. *EMBO Workshop on Cell Cycle and Cytoskeletal Elements in Bacteria.* p.22.
- **Lewis, R.J., Singh, O.M., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J., y D.B. Wigley.** 1993. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines
- **Lewis, R.J., Tsai, F.T., Wigley, D.B.** 1996. Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays.* **18**(8): 661-671.
- **Li Y., Sergueev K., y S. Austin.** 2002. The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol. Microbiol.* **46**:985-996.
- **Liu y Wang.** 1980. Supercoiling of the DNA template during transcription. *PNAS.* **84** (20): 7024.
- **Liu, J., Xu, L., Sandler, S.J., y K. J. Mariani.** 1999. Replication fork assembly at recombination intermediates is required for bacterial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:3552-3555.
- **Lobner-Olesen, A., y E. Boye.** 1992. Different effects of *mioC* transcription on initiation of chromosomal and minichromosomal replication in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**:3029-3036.
- **Lobner-Olesen A.** 1999. Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells: implications for replication control. *EMBO J.* **18**(6):1712-1721.

- **Lobocka, M. B., Rose, D. J., Plunkett, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M. B. y Blattner, F. R.** 2004. Genome of bacteriophage p1. *J. Bacteriol.* **186**: 7032-7068.
- **Lopez-Garcia P., y P. Forterre.** 2000. DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. *Bioessays* **22**:738-746.
- **Lothar, H., Lurz, R, y E. Orr.** 1984. DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res.* **12**:901-914.
- **Lovett, S.T.** 2003. Connecting replication and recombination. *Mol Cell.* **11**:554-556.
- **Lu, YB, Datta, H.J., y D. Bastia.** 1998. Mechanistic studies of initiator-initiator interaction and replication initiation. *EMBO J.* **17**:5192-5200.
- **Lu, Y.B., Ratnakar, P.V., Mohanty, B.K., y D. Bastia.** 1996. Direct physical interaction between DnaG primase and DnaB helicase of *Escherichia coli* is necessary for optimal synthesis of primer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12902-12907.
- **Lusetti, S.L., y M. M. Cox.** 2002. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem.* **71**:71-100.
- **Lyubchenko, Yul, y LS Shlyakhtenko.** 1988. Early melting of supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* **16**:3269-3281.
- **Lloyd, R. G., y K. B. Low.** 1996. Homologous recombination, p. 2236-2255. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Mackiewicz, P, Zakrzewska-Czerwinska, J, Zawilak, A, Dudek, MR, y S. Cebrat.** 2004. Where does bacterial replication start? Rules for predicting the oriC region. *Nucleic Acids Res.*;32(13):3781-91.
- **Magee TR, Asai T, Malka D, y T Kogoma.** 1992. DNA damage-inducible origins of DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**:4219-4225.
- **Maisnier-Patin, S., Nordstrom, K., y S. Dasgupta.** 2001. RecA-mediated rescue of *Escherichia coli* strains with replication forks arrested at the terminus. *J Bacteriol.* **183**(20):6065-73.
- **Maki, H., y A. Kornberg.**1985. The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II.Purification of the alpha subunit, devoid of nuclease activities. *J Biol Chem.***260**:12987-12992.
- **Malik, M., Zhao X, y K. Drlica.** 2006. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol Microbiol.* **61**(3):810-25
- **Manwaring N. P., Skurray R. A., Firth N.** 1999. Nucleotide sequence of the F plasmid leading region. *Plasmid.* **41**: 219-225.
- **Marians, K. J.** 1992. Prokaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:673-719.
- **Marians, K.J.** 2000. PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci.* **25**:185-9.

- **Marians, K.J.** 2003. Mechanisms of replication fork restart in *Escherichia coli*. Reunión "Replicating and reshaping DNA: a celebration of the jubilee of the double helix". pp. 71-76.
- **Marszalek J., y J.M. Kaguni.** 1994. DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **269**:4883-4890.
- **Masai, H., Kaziro Y, y K Arai.** 1983. Definition of *oriR*, the minimum DNA segment essential for initiation of R1 plasmid replication *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:6814-6818.
- **Masai, H., y K Arai.** 1988. RepA protein and *oriR*-dependent initiation of R1 plasmid replication: identification of a rho-dependent transcription terminator required for *cis*-action of RepA protein. Nucleic Acids Res. **16**:6493-6514.
- **Masai, H., y K. Arai.** 1996. DnaA- and PriA-dependent primosomes: two distinct replication complexes for replication of *Escherichia coli* chromosome. Front Biosci. **1**:48-58.
- **Matsui M, Oka A, Takanami M, Yasuda S, y Y Hirota.** 1985. Sites of *dnaA* protein-binding in the replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J. Mol. Biol. **184**:529-533.
- **Matsunaga F, Ishiai M, Kobayashi G, Uga H, Yura T, y C Wada.** 1997. The central region of RepE initiator protein of mini-F plasmid plays a crucial role in dimerization required for negative replication control. J. Mol. Biol. **274**:27-38
- **Maxwell A, Costenaro L, Mittelheiser S, Bates AD.** 2005. Coupling ATP hydrolysis to DNA strand passage in type IIA DNA topoisomerases. Biochem Soc Trans. **33**(Pt 6):1460-4.
- **Maxwell A.** 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. Mol Microbiol. **9**(4):681-6.
- **Maxwell A.** 1996. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase.
- **Mc Murry L. M., Stephan, M., y S.B. Levy.** 1992. Decreased function of the class B tetracycline efflux protein Tet with mutations at aspartate 15, a putative intramembrane residue J. Bacteriol. **174**: 6294-6297.
- **McCool JD, y S.J. Sandler.** 2001. Effects of mutations involving cell division, recombination, and chromosome dimer resolution on a *priA2::kan* mutant. Proc Natl Acad Sci U S A. **98**:8203-8210.
- **Mcchesney EW, Froelich, EJ, Leshner GY, Crain AV y D. Rosi.** 1964. Absorption, excretion, and metabolism of a new antibacterial agent, nalidixic acid. Toxicol Appl Pharmacol. **6**:292-309.
- **McGarry KC, Ryan VT, Grimwade JE, y AC Leonard.** 2004. Two discriminatory binding sites in the *Escherichia coli* replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:2811-2816.
- **McGlynn P, Al-Deib AA, Liu J, Marians KJ, Lloyd RG.** 1997. The DNA replication protein PriA and the recombination protein RecG bind D-loops. J Mol Biol. **270**(2):212-21.
- **McHenry C., y A. Kornberg.** 1977. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. Purification and resolution into subunits. J. Biol. Chem. **252**:6478-6484.

- **McHenry CS.** 1982. Purification and characterization of DNA polymerase III'. Identification of tau as a subunit of the DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem.* 257(5):2657-63.
- **McHenry, C. S.** 1988. The asymmetric dimeric polymerase hypothesis: a progress report. *Biochim. Biophys. Acta* **951**:240-248.
- **Meacock PA, y SN Cohen.** 1980. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a *cis*-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell* **20**:529-542.
- **Meddows, T.R., Savoie, A.P., Grove, J.I., Moore, T., y R.G. Lloyd.** 2005. RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Mol Microbiol.* **57**:97-110.
- **Mejia, R, Gomez-Eichelmann, M.C., y S. Fernández.** 1995. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim Biophys Acta.* 1239 (2):195-200.
- **Messer, W.** 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:355-374.
- **Messer, W., M. Meijer, H. E. N. Bergmans, F. G. Hansen, K. Von Meyenburg, E. Beck y H. Schaller.** 1979. Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 139-145.
- **Michel, B., Ehrlich, S.D., y Uzest, M.** 1997. DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J.* **16**:430-438.
- **Michel, B, Baharoglu, Z y R.Lestini.** 2006. Genetics of recombination in the model bacterium *Escherichia coli*. *Current topics in genetics.* DOI: 10.1007/4735_2006_0211
- **Miller C, y SN Cohen.** 1999. Separate roles of *Escherichia coli* replication proteins in synthesis and partitioning of pSC101 plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **181**:7552-7557.
- **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. J. H. Miller (ed), Cold Spring Harbor laboratory Press.
- **Miron A, Patel I, y D Bastia.** 1994. Multiple pathways of copy control of gamma replicon of R6K: mechanisms both dependent on and independent of cooperativity of interaction of tau protein with DNA affect the copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6438-6442.
- **Mizushima T., Katayama T., y K Sekimizu.** 1996. Effect on DNA topology by DnaA protein, the initiation factor of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**:11512-11516.
- **Mizuuchi K, Mizuuchi M, O'Dea MH, Gellert M.** 1984. Cloning and simplified purification of *Escherichia coli* DNA gyrase A and B proteins. *J Biol Chem.* 259(14):9199-901.
- **Morigen, Molina, F., y K. Skarstad.** 2005. Deletion of the *datA* site does not affect once-per-cell-cycle timing but induces rifampin-resistant replication. *J. Bacteriol.* **187**:3913-3920.
- **Morimatsu, K., y S.C. Kowalczykowski.** 2003. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell.*11:1337-1347.

- **Moraita, M.T., Kanemori, M., Yanagi, H. Y T. Yura.** 2000. Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:5860-5865.
- **Morrison PF, y DK Chatteraj.** 2004. Replication of a unit-copy plasmid F in the bacterial cell cycle: a replication rate function analysis. Plasmid **52**:13-30.
- **Mukhopadhyay G, Carr KM, Kaguni JM, y DK Chatteraj.** 1993. Open-complex formation by the host initiator, DnaA, at the origin of P1 plasmid replication. EMBO J. **12**:4547-4554.
- **Murotsu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H., y M. Takanami.** 1981. Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. Gene **15**:257-271.
- **Myers, R.S., Kuzminov, A., y F.W. Stahl.** 1995. The recombination hot spot chi activates RecBCD recombination by converting *Escherichia coli* to a recD mutant phenocopy. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(14):6244-2488.
- **Neidhardt, F. C., R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. Brooks Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H. E. Umbarger, eds.** 1996. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. ASM Press, Washington, D.C.
- **Neumann S, Quinones A.** 1997. Discoordinate gene expression of gyrA and gyrB in response to DNA gyraseinhibition in *Escherichia coli*. J Basic Microbiol. :37(1):53-69.
- **Neylon C, Kralicek AV, Hill TM, y N. E. Dixon.** 2005. Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. Microbiol Mol Biol Rev. **69**(3):501-26.
- **Ni Brillan NA y C.J: Dorman.** 1988. A novel genetic locus determines *in vivo* B-Z DNA structural transitions in *Escherichia coli*. Trends Biochem. Sci. **13**:130.
- **Nieduszynski, C.A., Hiraga, S. Ak, P. Benham, C. J., y A.D. Donaldson.** 2007. OriDB: a DNA replication origin database. Nucleic Acids Res. D40-6.
- **Nevera, C., Torgue, J. J., Grimwade, J. E., y A. C. Leonard.** 2006. SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the *Escherichia coli* pre-RC. Mol Cell. **24**(4):581-92.
- **Nordstrom, K. y S. Dasgupta.** Copy-number control of the *Escherichia coli* chromosome: a plasmidologist's view. EMBO Rep. **7**(5):484-489
- **Norris, V., den Blaauwen, T., Cabin-Flaman, A., Doi, R.H., Harshey, R., Janniere, L., Jimenez-Sanchez, A., Jin, D.J., Levin, P.A., Mileykovskaya, E., Minsky, A., Saier, M Jr, Skarstad, K.** 2007. Functional taxonomy of bacterial hyperstructures. Microbiol Mol Biol Rev. **71**(1):230-53.
- **O'Donovan, G. A.** 1978. Thymidine metabolism in bacteria and how or how not to label DNA. DNA synthesis: Present and Future. Plenum Publishing Corporation. pp. 219-253.
- **Ogawa T, Pickett GG, Kogoma T, y A Kornberg.** 1984. RNase H confers specificity in the *dnaA*-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome *in vivo* and *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**:1040-1044.

- **Ogawa T, y T Okazaki.** 1991. Concurrent transcription from the *gid* and *mioC* promoters activates replication of an *Escherichia coli* minichromosome. *Mol. Gen. Genet.* **230**:193-200.
- **Ogura T, Niki H, Kano Y, Imamoto F, y S Hiraga.** 1990. Maintenance of plasmids in HU and IHF mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **220**:197-203.
- **Oka A, Sugimoto K, Takanami M, y Y Hirota.** 1980. Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol. Gen. Genet.* **178**:9-20.
- **Ortega-Jimenez S, Giraldo-Suarez R, Fernandez-Tresguerres ME, Berzal-Herranz A, y R Diaz-Orejas.** 1992. DnaA dependent replication of plasmid R1 occurs in the presence of point mutations that disrupt the *dnaA* box of *oriR*. *Nucleic Acids Res.* **20**:2547-2551.
- **Pak M, y S Wickner.** 1997. Mechanism of protein remodeling by ClpA chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**:4901-4906.
- **Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., Helinski, D.R., Schwab, H., Stanisich, V.A., y C.M. Thomas.** 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* **239**:623-663.
- **Park K, Han E, Paulsson J, y D. K. Chattoraj.** 2001. Origin pairing ('handcuffing') as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *EMBO J.* **20**(24):7323-7332.
- **Patel, P.H., Suzuki, M., Adman E, Shinkai A, Loeb LA.** Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J Mol Biol.* **308**:823-37.
- **Paulsson, J., y D. K. Chattoraj.** 2006. Origin inactivation in bacterial DNA replication control. *Mol Microbiol.* **61**(1):9-15.
- **Peng H, Marians KJ.** 1999. Overexpression and purification of bacterial topoisomerase IV. *Methods Mol Biol.* **94**:163-9.
- **Peter B.J., Arsuaga J., Breier A.M., Khodursky A.B., Brown P.O., y N.R. Cozzarelli.** 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **5**(11):R87.
- **Pohlhaus JR, Kreuzer KN.** 2005. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol Microbiol.* **56**(6):1416-29.
- **Polaczek P, Kwan K, Liberias DA, y JL Campbell.** 1997. Role of architectural elements in combinatorial regulation of initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **26**:261-275.
- **Polaczek P, Kwan K, y JL Campbell.** 1998^a. GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N6-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Mol. Gen. Genet.* **258**:488-493.
- **Polaczek P, Kwan K, y JL Campbell.** 1998^b. Unwinding of the *Escherichia coli* origin of replication (*oriC*) can occur in the absence of initiation proteins but is stabilized by DnaA and histone-like proteins IHF or HU. *Plasmid* **39**:77-83.

- **Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., y N.R. Cozzarelli.** 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* 18(14):1766-1779.
- **Prasher, D. D., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, y M. J. Cormie.** 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- **Pritchard, R. H.** 1974. On the growth and from of a bacterial cell. (Review Lecture). Royal Society of London Biological Sciences 267:3303-333.
- **Radman M.** 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* 5:355-367.
- **Riber, L., Olsson, J.A., Jensen, R.B., Skovgaard, O., Dasgupta, S., Marinus, M.G., Lobner-Olesen A.** 2006. Hda-mediated inactivation of the DnaA protein and dnaA gene autoregulation act in concert to ensure homeostatic maintenance of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* 20(15):2121-34.
- **Rice, P.A., Yang S., Mizuuchi K., y H.A. Nash.** 1996. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87:1295-1306.
- **Riola, J., Guarino, E., Guzman, E.C., y A. Jimenez-Sanchez.** 2007. Differences in the degree of inhibition of NDP reductase by chemical inactivation and by the thermosensitive mutation nrdA101 in *Escherichia coli* suggest an effect on chromosome segregation. *Cell Mol Biol Lett.* 12(1):70-81.
- **Roggenkamp, A.** 2006. Phylogenetic analysis of enteric species of the family Enterobacteriaceae using the *oriC*-locus. *Syst Appl Microbiol.* 2006 [Epub ahead of print]
- **Roth A, y W Messer.** 1995. The DNA binding domain of the initiator protein DnaA. *EMBO J.* 14:2106-2111.
- **Rothstein, R., Michel, B., y S. Gangloff.** 2000. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev.* 14:1-10.
- **Rowbury, R. J.** 2004. Enterobacterial responses to external protons, including responses that involve early warning against stress and the functioning of extracellular pheromones, alarmones and varisensors. *Sci. Prog.* 87:193-225.
- **Saecker RM, y MT Record Jr.** 2002. Protein surface salt bridges and paths for DNA wrapping. *Opin. Struct. Biol.* 12:311-319.
- **Sandler SJ.** 1996. Overlapping functions for recF and priA in cell viability and UV-inducible SOS expression are distinguished by dnaC809 in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 1996 Feb;19(4):871-80.
- **Sandler, S. J.** 2000. Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics.* 155: 487-497.
- **Sandler, S.J.** 2005. Requirements for replication restart proteins during constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Genetics.* 169:1799-1806.
- **Sandler, S.J., McCool J.D., Do, T.T., y R. U. Johansen.** 2001. PriA mutations that affect PriA-PriC function during replication restart. *Mol Microbiol.* 4:697-704.

- **Sassanfar M., y J.W. Roberts.** 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol.* **212**:79-96.
- **Sawitzke J, Austin S.** 2001. An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol Microbiol.* **40**(4):786-94.
- **Schaper S., y W. Messer.** 1995. Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J. Biol. Chem.* **270**:17622-17626.
- **Schoemaker JM, Gayda RC, y A. Markovitz.** 1984. Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the *sulA* protein, a key to lon-associated filamentation and death. *J Bacteriol.* **158**(2):551-61.
- **Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich S.D., y B. Michel.** 1998. RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell.* **95**:419-430.
- **Seigneur, M., Ehrlich, S.D., y B. Michel.** 1999. *recD sbcB sbcD* mutants are deficient in recombinational repair of UV lesions by RecBC. *J Bacteriol.* **181**:6220-6621.
- **Sekimizu K., Bramhill D., y A. Kornberg.** 1988. Sequential early stages in the *in vitro* initiation of replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **263**:7124-7130.
- **Selvin PR, Cook DN, Pon NG, Bauer WR, Klein MP, y JE Hearst.** 1992. Torsional rigidity of positively and negatively supercoiled DNA. *Science* **255**:82-85.
- **Seufert W., y W. Messer.** 1987. Start sites for bidirectional *in vitro* DNA replication inside the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6**:2469-2472.
- **Shan, D., y T. D. Yuk-Ching.** 2003. Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Frontiers in Bioscience* **8**:256-263.
- **Sharples GJ, y R. G. Lloyd.** 1993. An *E. coli* RuvC mutant defective in cleavage of synthetic Holliday junctions. *Nucleic Acids Res.* **21**(15):3359-64. **Sharples, G.J., Ingleston, S.M., y R.G. Lloyd.** 1999. Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J Bacteriol.* **181**:5543-5550.
- **Sherratt D.J., Soballe B., Barre F.X., Filipe S., Lau I., Massey T., y J. Yates.** 2004. Recombination and chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **359**:61-69.
- **Sherratt, D.J.** 2003. Bacterial chromosome dynamics. *Science.* **301**(5634):780-785.
- **Shibata, T., Hishida, T., Kubota, Y., Han, Y.W., Iwasaki, H., Shinagawa, H.** 2005. Functional overlap between RecA and MgsA (RarA) in the rescue of stalled replication forks in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* **10**:181-191.
- **Shiraishi, K., Imai, Y., Yoshizaki, S., y H. Ikeda.** 2005. Rep helicase suppresses short-homology-dependent illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* **10**:1015-1023.
- **Skarstad, K., Boye E, Y HB Steen.** 1986. Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J.* **5**:1711-1717.
- **Skarstad, K., Thony, B., Hwang, D.S., y A, Kornberg.** 1993. A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **268**:5365-5370.

- **Skarstad, K., y A. Lobner-Olesen.** 2003. Stable co-existence of separate replicons in *Escherichia coli* is dependent on once-per-cell-cycle initiation. *EMBO J.* 22(1):140-150.
- **Skarstad, K., y E. Boye.** 1994. The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1217:111-130.
- **Skarstad, K., y E. Boye.** 1993. Degradation of individual chromosomes in recA mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175:5505-5509.
- **Smelkova, N. Y K. J. Mariani.** 2001. Timely release of both replication forks from *oriC* requires modulation of origin topology. *J Biol Chem.* 276 (42): 39186-91.
- **Smith G. R.** 2001. Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Annu Rev Genet.* 35:243-74.
-
- **Snyder M., y K. Drlica K.** 1979. DNA gyrase on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J Mol Biol.* 131(2):287-302.
- **Soultanas, P.** 2002. A functional interaction between the putative primosomal protein DnaI and the main replicative DNA helicase DnaB in *Bacillus*. *Nucleic Acids Res.* 30:966-974.
- **Speck, C., y W. Messer.** 2001. Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *EMBO J.* 20:1469-1476.
- **Stalker, D.M., Thomas, C.M., y D.R. Helinski.** 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181:8-12.
- **Stenzel, T.T., Patel, P., y D. Bastia.** 1987. The integration host factor of *Escherichia coli* binds to bent DNA at the origin of replication of the plasmid pSC101. *Cell* 49:709-717.
- **Stukenberg P.T., Turner J., y M. O'Donnell.** 1994. An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* 78:877-887.
- **Sueoka, N. y H. Yoshikawa.** 1965. The chromosome of *Bacillus subtilis*. I. Theory of marker frequency analysis. *Genetics* 52: 747-757.
- **Su'etsugu, M., Takata, M., Kubota, T, Matsuda, Y., y T. Katayama.** 2004. Molecular mechanism of DNA replication-coupled inactivation of the initiator protein in *Escherichia coli*: interaction of DnaA with the sliding clamp-loaded DNA and the sliding clamp-Hda complex. *Genes Cells* 9:509-522.
- **Sugino, A., Higgins, N.P., Brown, P.O., Peebles, C.L., Cozzarelli, N.R.** 1978. Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(10):4838-42.
- **Sun, J.Z., Julin, D.A., y J.S. Hu.** 2006. The Nuclease Domain of the *Escherichia coli* RecBCD Enzyme Catalyzes Degradation of Linear and Circular Single-Stranded and Double-Stranded DNA. *Biochemistry.* 45:131-140.
- **Svitil, A.L., Cashel M., y J.W. Zyskind.** 1993. Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis *in vivo*. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:2307-2311.
- **Swanberg, S.L, y J.C. Wang.** 1987. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* gyrA gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *Mol Biol.* 197(4):729-36.

- **Tait, R.C., Kado, C.I., y R.L. Rodriguez.** 1983. A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. *Mol. Gen. Genet.* **192**:32-38.
- **Tanaka, T., Taniyama, C., Arai, K., y H. Masai.** 2003. ATPase/helicase motif mutants of *Escherichia coli* PriA protein essential for recombination-dependent DNA replication. *Genes Cells.* **8**:251-261.
- **Tang, X.B., Womble, D.D., y R.H. Rownd.** 1989. DnaA protein is not essential for replication of IncFII plasmid NR1. *J. Bacteriol.* **171**:5290-5295.
- **Tolun, A., y D.R. Helinski.** 1981. Direct repeats of the F plasmid *incC* region express F incompatibility. *Cell* **24**:687-694.
- **Tougu, K., Peng, H, y K. J. Marians.** 1994. Identification of a domain of *Escherichia coli* primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J Biol Chem.* **269**(6):4675-82.
- **Travers, A., Schneider R, y G. Muskhelishvili.** 2001. DNA supercoiling and transcription in *Escherichia coli*: The FIS connection. *Biochimie* **83**:213-217.
- **Uga, H., F. Matsunaga, y C. Wada.** 1999. Regulation of DNA replication by iterons: an interaction between the *ori2* and *incC* regions mediated by RepE-bound iterons inhibits DNA replication of mini-F plasmid in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**:3856-3867.
- **Uzest M, Ehrlich SD, Michel B.** 1995. Lethality of rep recB and rep recC double mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **17**(6):1177-88.
- **Uhlin, B. E., y K. Nordstrom.** 1978. A runaway-replication mutant of plasmid R1drd-19: temperature-dependent loss of copy number control. *Mol. Gen. Genet.* **165**:167-179.
- **Ussery, D., Larsen, T.S., Wilkes, K.T., Friis, C., Worning, P., Krogh, A., y S. Brunak.** 2001. Genome organisation and chromatin structure in *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**:201-212.
- **von Freiesleben, U., y K.V. Rasmussen.** 1992. The level of supercoiling affects the regulation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **143**:655-663.
- **von Meyenburg, K., y F. G. Hansen.** 1980. The origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome: Genes near to *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. En: Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination, pp. 137-159. Academic Press, New York, NY.
- **Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T., y F. Imamoto.** 1988. Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **204**:581-591.
- **Wahle, E., Lasken R.S., y A. Kornberg.** 1989. The *dnaB-dnaC* replication protein complex of *Escherichia coli*. I. Formation and properties. *J. Biol. Chem.* **264**:2463-2468.
- **Wegrzyn, A., y G. Wegrzyn.** 1998. Random inheritance of the replication complex by one of two daughter lambda plasmid copies after a replication round in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **246**(3):634-9.
- **Wegrzyn, G, y A Wegrzyn.** 2002. Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microb. Cell Fact.* **1**:2.
- **Weigel, C, Messer W, Preiss S, Welzeck M, Morigen, y E Boye.** 2001. The sequence

requirements for a functional *Escherichia coli* replication origin are different for the chromosome and a minichromosome. Mol. Microbiol. 40:498-507.

- **Weigel, C, Schmidt A, Ruckert B, Lurz R, y W Messer.** 1997. DnaA protein binding to individual DnaA boxes in the *Escherichia coli* replication origin, *oriC*. EMBO J. 16:6574-6583.
- **Weigel, C, Seitz H.** 2006. Bacteriophage replication modules. FEMS Microbiol Rev.:30(3):321-81.
- **Weigel, C., y H. Seitz.** 2002. Strand-specific loading of DnaB helicase by DnaA to a substrate mimicking unwound *oriC*. Mol. Microbiol. **46**:1149-1156.
- **Weinstein-Fischer, D., y S. Altuvia.** 2007. Differential regulation of *Escherichia coli* topoisomerase I by Fis. Mol Microbiol. **63**(4):1131-44.
- **West, S.C.** 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. Nat Rev Mol Cell Biol. **4**(6):435-45.
- **Wickner, S., Hoskins, J., y K, McKenney.** 1991. Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:7903-7907.
- **Wickner, S.H., y D.K. Chattoraj.** 1987. Replication of mini-P1 plasmid DNA *in vitro* requires two initiation proteins, encoded by the *repA* gene of phage P1 and the *dnaA* gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:3668-3672.
- **Wild J, Rossmeissl P, Walter WA, y C.A. Gross.** 1996. Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 178(12):3608-13.
- **Willetts, N.S., y A. J. Clark.** 1969. Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of *Escherichia coli*. J Bacteriol. **100**:231-239.
- **Woese, C.R., Kandler, O., y M.L. Wheelis.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:4576-4579.
- **Wold S., Crooke E., y K. Skarstad.** 1996. The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from *oriC in vitro*. I. Nucleic Acids Res. **24**:3527-3532.
- **Yancey-Wrona, J.E., y S.W. Matson.** 1992. Bound Lac repressor protein differentially inhibits the unwinding reactions catalyzed by DNA helicases. Nucleic Acids Res. **20**:6713-6721.
- **Yura T., Nakahigashi K., y M. Kanemori.** 1996. Transcriptional regulation of stress-inducible genes in procaryotes. EXS. **77**:165-181.
- **Yuzhakov A., Kelman Z., Hurwitz J., y M. O'Donnell.** 1999. Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. EMBO J. **18**:6189-6199.
- **Zavitz, K.H., y K.J. Marians.** 1992. ATPase-deficient mutants of the *Escherichia coli* DNA replication protein PriA are capable of catalyzing the assembly of active primosomes. J Biol Chem. **267**:6933-6940.
- **Zillig, W., A. Kletzin, C. Schleper, I. Holz, D. Janekovic, J. Hain, M. Lanzendörfer, y J. K.**

Bibliografía

- Kristiansson.** 1994. Screening for *Sulfolobales*, Their Plasmids and Their Viruses in Icelandic Solfataras. System. Appl. Microbiol. 16:609-628.
- **Zyskind J.W., y D. W. Smith.** 1986. The bacterial origin of replication, oriC. Cell. 46(4):489-90.
 - **Zzaman S, y D. Bastia.** 2005. Oligomeric initiator protein-mediated DNA looping negatively regulates plasmid replication in vitro by preventing origin melting. Mol Cell. 20(6):833-843.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, el Dr. Alfonso Jiménez - Sánchez y la Dra. Emilia Botello, por haberme guiado a lo largo de todos estos años. Gracias por mostrarme lo que es la Ciencia, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por vuestra disposición y ayuda y por vuestros consejos. Gracias, porque al fin y al cabo, el trabajo que se presenta en esta memoria es también vuestro.

Al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de la beca de Formación de Profesorado Universitario que me ha permitido realizar este trabajo (AP1259-2002). Tampoco hubiera sido posible llevarlo a cabo sin los proyectos BMC2002-00830 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y 2PR04A036 de la Junta de Extremadura.

Agradecer muy especialmente al Prof. Anders Lobner-Olesen (Roskilde University, Dinamarca) por su ayuda infinita con todas las bacterias, plásmidos y comentarios... Muchísimas gracias por toda la atención prestada tanto a Emilia como a mi en todo este tiempo.

A los Drs. M. Defais, A. Bailone, J.E. Rebollo, E. Armengod, I. Kobayashi, S. Sandler, B. Michel, A. J. Clark, T. Hishida, J. Zynskind, J.M. Kaguni, A. Lobner-Olesen y C. Weigel por la cesión de parte de las bacterias y plásmidos utilizadas en este trabajo, al Dr. de la Cueva por la secuencia del origen de replicación de pKN1562 y a Israel Salguero por cederme las estirpes derivadas de JK607.

Gracias también especialmente a la Dra. B. Michel (INRA, France), al Dr. D. Chatteraj (NIH, Bethesda USA) y al Dr. K. Drlica (Public Health Research Institute Center, New Jersey USA) por los comentarios y sugerencias.

Me gustaría agradecer personalmente a los Drs. Fernando de la Cruz Calahorra (Dpto. Biología Molecular, Universidad de Cantabria) y Arkady B. Khodursky (Dpt. Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, USA) por darme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios. Gracias a Raúl del Lab. del Dr. de la Cruz por su ayuda con las matemáticas que tenía ya oxidadas. Gracias a toda la gente del laboratorio del Dr. Khodursky porque fue una experiencia estupenda trabajar con vosotros; al Dr. Kyeong Soo Jeong, por proporcionarme parte de los microarrays impresos que se utilizaron en este trabajo y las primeras lecciones de microarrays; a Dipen Sangurdekar, por las lecciones de R, lowess, ANOVA; al Dr. G. Prasad por todas las conversaciones y consejos y, sobre todo, a la Dra. Poonam Srivastava y a Hoosein Zare por su amistad, por acercarme a sus culturas y por ser tan buena gente.

Agradecer a mis compañeros del área de Genética: Jose, Israel, M^a Toñi y Estrella por todos los ratos de tertulia de cafés, viajes y experiencias compartidos que han sido muchos a lo largo de estos años, tanto dentro como fuera del laboratorio. También gracias al resto de los profesores del área de Genética, al Dr. Felipe Molina por toda la lata que le he dado con los ordenadores y por sus conversaciones geniales, a la Dra. Elena Guzmán y al Dr. J.E. Rebollo. Mi especial agradecimiento a Encarna Ferrera por su disposición, su ayuda y su buen hacer.

Gracias también al resto del personal del edificio de Biología de la Universidad de Extremadura y muy especialmente al personal del Área de Bioquímica y Biología Molecular: a la gente de los laboratorios de Ana Mata, muy especialmente a Chary por su amistad, y del laboratorio de Mamen y Pedro Macías; al Dr. Carlos Gutiérrez por permitirme realizar las medidas de fluorimetría en su laboratorio y a la gente del grupo del Dr. Pedro Fernández por todas las enzimas, células competentes... A la dirección del Dpto., a los Drs. Pedro Macías y Jaime Merino porque siempre me habéis atendido con toda la amabilidad y mira que os he molestado durante estos años. Gracias también al personal del Área de Zoología, a Bettina por su amistad y al resto por ser una muestra de amabilidad.

A mis amig@s de Lobón porque siempre andan por ahí, pase el tiempo que pase. A Vanessa Ferreira y a mis niñ@s de los Oscos por demostrarme que hay gente inquieta y que merece la pena por el mundo.

Por último, aunque deberían ser los primeros, A MI FAMILIA. Este trabajo no estaría aquí sin mis padres, ellos han estado ahí siempre confiando en mí, me han apoyado en cada decisión, y ellos les debo todo. Gracias también a mi hermana por ser partícipe de tantas conversaciones sobre *E. coli*, incrementos de G y plásmidos, sin poner nunca pegos. Gracias a mis abuelos y al resto de mi familia.

"Siempre di lo que sientes y haz lo que piensas"

Gabriel García-Márquez

Figuras y tablas

Figura 1. Cambios conformacionales durante el mecanismo de acción de la girasa (Pág. 7).

Figura 2. Estructura de *oriC* (Pág. 10).

Figura 3. Iniciación de la replicación cromosómica en *E. coli* (Pág. 12).

Figura 4. Recombinación en extremos de roturas de doble cadena (DSBs) en bacterias (Pág. 21).

Figura 5. Vías de entrada de DnaB para la reanudación de las horquillas de replicación en *E. coli* (Pág.24).

Figura 6. Inducción de la respuesta SOS en *E. coli* (Pág. 25).

Figura 7. HIR en la estirpe silvestre AB1157 de *E. coli* (Pág. 27).

Figura 8. Mecanismos de inicio de la replicación cromosómica en *E. coli* (Pág. 28).

Figura 9. A) Mecanismos de regulación del inicio de la replicación en plásmidos regulados por iterones. **B)** Estructura de los orígenes de replicación *oriS(F)*, *oriR(P1)* y *ori* (pSC101) regulados por iterones (Pág. 32).

Figura 10. Organización de los orígenes de replicación de los plásmidos controlados por asRNA R1 y ColE1 (Pág. 36).

Figura 11. Electroforesis de campo pulsante (PFEG) para la cuantificación de DNA lineal (Pág. 69).

Figura 12. Microarrays de DNA genómico para estudios de replicación (Pág. 75).

Figura 13. Síntesis relativa de DNA en las estirpes CM1565 (A), CM1671(B) y CM1588 (C), creciendo en LB, tras la adición de rifampicina 150 µg/ml, a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) (Pág. 88).

Figura 14. Síntesis relativa de DNA de las estirpes LK211 (A) e intFs-B (B), a 30°C (O)creciendo en LB, tras la adición de rifampicina 150 µg/ml, a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) (Pág. 94).

Figura 15. Probabilidad de desestabilización de sitios SIDD en *oriC* (Pág. 98).

Figura 16. A) Alineamiento múltiple de secuencias de orígenes de replicación pertenecientes a especies la familia *Enterobacteraceae*. **B)** Dendrograma obtenido del

Índice de figuras

alineamiento múltiple de las secuencias mostradas en (A). **C**) Localización de sitios SIDD en enterobacterias. Se muestran las posiciones de la región rica en A+T y de los tres 13meros: L, M y R (Pág. 100).

Figura 17. Actividad β -galactosidasa en la estirpe W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C(●) (Pág. 103).

Figura 18. Síntesis relativa de DNA de la estirpe AB1157 tras la adición de rifampicina a 30°C (O), tras el cambio a 41°C en cultivos tratados con novobiocina 1 mg/ml durante una hora antes de la adición de rifampicina (●) y tras el cambio a 41°C en ausencia de tratamiento con novobiocina (■) (Pág. 107).

Figura 19. Actividad β -galactosidasa en la estirpe W3110 *gyrBp-lacZ gyrBp-bla* en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30°C (O) (Pág. 109).

Figura 20. A) Acumulaciones de DNA en la estirpe AB1157 tras tratamiento con diferentes concentraciones de ácido nalidíxico durante una hora y posterior inhibición de nuevos inicios de replicación con rifampicina 150 μ g/ml durante cuatro horas a 30°C (O) y tras el aumento de temperatura a 41°C (●). **B)** Incremento relativo de la acumulación de DNA a 41°C respecto a 30°C de las acumulaciones mostradas en A (Pág. 110).

Figura 21. Morfología celular, distribución de nucleoides y síntesis de DNA en la estirpe IC2076 (A,B y C) tras pretratamiento con ácido nalidíxico 10 μ g/ml durante una hora. La síntesis relativa de DNA se determinó tras la adición de rifampicina 150 μ g/ml a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) a tiempo cero, que corresponde a una hora después de la adición de ácido nalidíxico. (D) Tabla con los valores de síntesis relativa finales a 30°C (Δ DNA 30°C) y tras el cambio a 41°C (Δ DNA 41°C) y el incremento relativo obtenido a 41°C respecto a 30°C (Δ DNA 41°C/ Δ DNA 30°C (Pág. 113).

Figura 22. Morfología celular, distribución de nucleoides y síntesis de DNA de las estirpes AB1157 (A, B y C) y GY773 (*lexA3 Ind*-) (D, E y F) tras pretratamiento con ácido nalidíxico 10 μ g/ml durante una hora y posterior adición de rifampicina 150 μ g/ml a 30°C (O) y tras cambio a 41°C (●). Las muestras para microscopía se tomaron tras una hora de

tratamiento con ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$, justo antes de la adición de rifampicina. (G) Síntesis relativa de DNA finales a 30°C ($\Delta\text{DNA } 30^\circ\text{C}$) y tras el cambio a 41°C ($\Delta\text{DNA } 41^\circ\text{C}$) y el incremento relativo obtenido a 41°C respecto a 30°C ($\Delta\text{DNA } 41^\circ\text{C}/\Delta\text{DNA } 30^\circ\text{C}$) (Pág. 115).

Figura 23. Análisis de la frecuencia génica en la estirpe AB1157 (A) y CM1671 (B) mediante microarrays de DNA genómico (Pág. 117).

Figura 24. Histogramas de DNA de la estirpe AB1157 analizada por citometría de flujo cuatro horas después de la adición de rifampicina 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina 50 $\mu\text{g/ml}$ creciendo exponencialmente a 30°C (A), junto con el cambio a 41°C (B), una hora posterior a la adición de ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ a 30°C (C) y una hora posterior a la adición de ácido nalidíxico 10 $\mu\text{g/ml}$ y junto con el cambio a 41°C (D) (Pág. 119).

Figura 25. Acumulación de DNA tras la adición de rifampicina a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) en las estirpes RG731 (*priA2::kan*) (A) y JC19008 (*priA2::kan dnaC809*) (B) (Pág. 127).

Figura 26. Acumulación de DNA tras la adición de rifampicina a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●) en las estirpes AB1157 (A) y JJC1954 (*dnaE486*) (B) (Pág. 129).

Figura 27. Síntesis relativa de DNA tras la adición de rifampicina en la estirpe RG840 (*recA525P*) a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C (●) (Pág. 135).

Figura 28. A) FL* emitida por estirpes portadoras de plásmidos que contienen la construcción BAD*p*-GFP*mut2* a lo largo del crecimiento exponencial a 30°C (para simplificar se muestran los datos de tres de las estirpes). **B)** Determinación del número relativo de copias de plásmidos (ncp) a partir de la FL* correspondiente a un cultivo de 0,1 unidades de densidad óptica (a). Se incluyen las medidas realizadas a 37°C por citometría de flujo (b) y las obtenidas a 37°C mediante el método de Southern (c) (Lobner-Olesen, 1999) (Pág 141).

Figura 29. Relación FL*/DO para la estirpe ALO1458, que lleva el plásmido pALO269 (pBR322), creciendo exponencialmente a 30°C (O), tras el cambio de temperatura a 41°C (●) y tras la adición de HU 100mM a tiempo cero a 30°C (□) y junto con el cambio a 41°C (■) (Pág. 143).

Índice de figuras

Figura 30. Relación FL*/DO en las estirpes ALO1455 (A) y ALO1456 (B) portadoras de los minicromosomas pALO264 y pALO267, respectivamente, creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C a tiempo cero (●) (Pág. 144).

Figura 31. Relación FL*/ DO de las estirpes ALO1465 (A), ALO1454 (B) y ALO1469 (C) portadoras de los plásmidos pALO280 (F), pALO270 (P1 Δ incA) y pALO284 (pSC101), creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C a tiempo 0(●) (Pág. 145).

Figura 32. Relación FL*/ DO de las estirpes ALO1454, ALO1458 y ALO1460 que lleva el plásmido pALO 261 (R1) (A), pALO275 (p p15A) (B) y pALO269 (BR322) (C), creciendo exponencialmente a 30°C (O) y tras el cambio a 41°C (●) (Pág. 146).

Figura 33. Predicción de sitios SIDD de los orígenes de replicación de plásmidos con control de replicación por iterones. Probabilidad de apertura de la doble hélice en las secuencias: (A) *oriS* del plásmido F (NC_002483, 48136..48352), (B) *oriR* del plásmido P1 (NC_005856.1, 61771...62950) y (C) *ori* de pSC101 y proteína RepA (K00042) (Pág. 147).

Figura 34. Predicción de sitios SIDD en orígenes de replicación de plásmidos con control de replicación por RNA antisentido. Probabilidad de apertura de la hélice en las secuencias: (A) *oriR1* del plásmido R1 (secuencia del origen de replicación de pKN15632 proporcionada por el Dr. de la Cueva) y (B) *ori* de ColE1 (embl V00270.1) (Pág. 148).

Figura 35. Modelo para el inicio y la elongación de HIR (Pág. 165).

Tabla 1. Características de los dos tipos de primosomas para la replicación cromosómica en *E. coli* (Pág. 13).

Tabla 2. Estirpes de *E. coli* K-12 utilizadas para la determinación de secuencias esenciales en *oriC* para HIR (capítulo 1 de Resultados) (Pág. 43).

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* utilizadas para los estudios topológicos de HIR (capítulo 2 de Resultados) (Pág 44).

Tabla 4. Estirpes de *E. coli* utilizadas para analizar los requerimientos funcionales de HIR (capítulo 3 de Resultados) (Pág. 45).

Tabla 5. Estirpes de *E. coli* K-12 utilizadas para el análisis de la replicación termoinducida en plásmidos (Capítulo 4 de Resultados) (Pág. 49).

Tabla 6. Las secuencias de orígenes de replicación (Pág. 57).

Tabla 7. HIR en ausencia de *oriC* (Pág. 88) .

Tabla 8. HIR en mutantes en las secuencias de unión a DnaA en *oriC* (Pág. 90).

Tabla 9. HIR en mutantes de las secuencias de unión de IHF y Fis en *oriC* (Pág. 91).

Tabla 10. HIR en mutantes que contienen una inserción o una deleción en *oriC* (Pág. 91).

Tabla 11. Asincronía de la replicación y HIR (Pág. 92).

Tabla 12. HIR en el replicón R1 (Pág. 94).

Tabla 13. HIR en mutantes de deleción de 16pb en el 13mero-L e integración plasmídica (Pág. 95).

Tabla 14. Localización de sitios SIDD en mutantes *oriC* (Pág. 97).

Tabla 15. Genes (Proteínas) implicados en la respuesta de choque térmico con cambios significativos en los niveles de transcripción ($p < 0,05$) (Pág. 105).

Tabla 16. Nivel de superenrollamiento y HIR (Pág. 106).

Índice de tablas

Tabla 17. Síntesis relativa de DNA tras cuatro horas desde la adición de rifampicina 150 µg/ml en cultivos tratados, previamente a la adición de rifampicina durante una hora, con ácido nalidíxico 10 µg/ml (Pág. 118).

Tabla 18. DNA lineal en la estirpe silvestre AB1157 y en el mutante JC5519 (Pág. 120)

Tabla 19. Dependencia de las actividades de la proteína DnaA en *oriC* y *oriR1* para HIR (Pág. 123).

Tabla 20. Dependencia de las actividades de PriA para HIR (Pág. 124).

Tabla 21. HIR en ausencia y tras sobreexpresión de PriA (Pág. 125).

Tabla 22. HIR en mutantes nulos *priB* y *priC* (Pág. 126).

Tabla 23. Dependencia de la helicasa Rep en HIR (Pág. 127).

Tabla 24. Pol I en la inducción de HIR (Pág. 129).

Tabla 25. HIR en mutantes en Pol II y Pol V (Pág. 130).

Tabla 26. HIR en estirpes con diferente grado de actividad recombinasa y proteásica de RecA (Pág. 132).

Tabla 27. HIR en mutantes *recA*, *recD* y *recA recD* (Pág. 134).

Tabla 28. Dependencia de HIR de las proteínas de las vías de recombinación RecBCD, RecFOR/QJ y RecET (Pág. 135).

Tabla 29. HIR en mutantes de proteínas implicadas en la resolución de intermediarios de Holliday (Pág. 138).

Tabla 30. DNA lineal en un fondo *recB recC* o *recA recD*, a 30°C y tras 1h de incubación a 41°C (Pág. 138).

Anexos

Anexo I. Genes con cambios significativos en la expresión (valor-p<0,05) tras cambio de temperatura de 30°C a 41°C en LB durante 20 minutos.

GEN	LogRatio	puntuación-Z	Valor-p
b1153	5,92601	8,20375155	0
b0830	5,32896	7,37762846	1,6231E-13
b0934	-4,89474	-6,7686485	1,3074E-11
b1170	4,86575	6,73669641	1,6294E-11
lig	4,5341	6,27780064	3,4487E-10
b3739_b3740	-4,5279	-6,2610612	3,8399E-10
b1529_b1530	4,50881	6,2428075	4,3159E-10
Z0853_Z0855	4,47862	6,20103436	5,6323E-10
b3060	-4,47178	-6,1834093	6,2986E-10
b0075_b0076	-4,42585	-6,1198571	9,4023E-10
ppdA	4,34566	6,01706094	1,7826E-09
b0935	-4,33444	-5,9933754	2,0626E-09
b2045_b2046	4,26287	5,9025065	3,5922E-09
yaiH	-4,15128	-5,7399415	9,4991E-09
hnr	-4,14653	-5,7333691	9,8746E-09
metW	-4,10516	-5,6761264	1,3817E-08
b0718	3,99653	5,53397853	3,1384E-08
rhaR	-4,0014	-5,5325563	3,164E-08
b2483	3,97466	5,50371756	3,7279E-08
ybhD	-3,97043	-5,4897039	4,0359E-08
b1065_b1066	3,88655	5,38180197	7,3909E-08
b0271	3,80228	5,26519968	1,4032E-07
b4286_b4287	3,76965	5,22005037	1,7922E-07
uhpT	-3,61332	-4,9955798	5,8752E-07
b4048_b4049	3,59756	4,98193376	6,305E-07
yhdW	3,5547	4,92262946	8,5514E-07
b0759_b0760	-3,50019	-4,8390446	1,3064E-06
b0819	3,468	4,80266484	1,5677E-06
b3638_b3639	3,45203	4,78056756	1,7502E-06
yciN	-3,45471	-4,7761151	1,7894E-06
sdhB	-3,42511	-4,7351583	2,1915E-06
b1384	-3,39081	-4,6876983	2,7661E-06
insB_1	-3,36595	-4,6533001	3,2702E-06
b0303	3,3457	4,63344141	3,6002E-06
cspA	-3,3444	-4,6234819	3,7775E-06
b3615_b3616	-3,32298	-4,5938436	4,356E-06
b0398_b0399	-3,32191	-4,5923631	4,3871E-06
b3483_b3484	-3,29245	-4,5516	5,3292E-06
yehA	3,26854	4,52667705	5,9975E-06
alaT_rrlA	-3,23688	-4,4747092	7,6584E-06
b2987_b2988	-3,23301	-4,4693544	7,8526E-06
yjjW	-3,21976	-4,4510207	8,5537E-06
yohC	-3,21246	-4,4409199	8,9652E-06
yehX	-3,20873	-4,4357588	9,1827E-06
b0265_b0266	3,19255	4,4215316	9,8086E-06
rrsD	-3,17134	-4,3840232	1,166E-05

rplW	-3,14567	-4,3485042	1,3717E-05
fabB	-3,12614	-4,3214811	1,551E-05
yfhA	3,09794	4,29062212	1,783E-05
yibD	3,05834	4,23582859	2,2786E-05
b0621	-3,06168	-4,2322894	2,3148E-05
b1498_b1499	3,04021	4,21074257	2,5469E-05
cynX	3,02034	4,18324895	2,8755E-05
b2974	3,00255	4,15863337	3,2035E-05
lytB	-3,00637	-4,1557583	3,244E-05
yqjG	-2,9748	-4,1120757	3,9233E-05
b0539_b0540	2,96346	4,10454552	4,0533E-05
atpC	2,96063	4,10062972	4,1225E-05
xapB	-2,93404	-4,0556771	5,0015E-05
b2463	2,92209	4,04730289	5,1837E-05
yafQ	-2,92526	-4,0435284	5,2679E-05
b2446	-2,88767	-3,9915161	6,5682E-05
b1339_b1340	2,87908	3,98779103	6,6722E-05
trpL	2,8574	3,95779296	7,5679E-05
b1140	2,79435	3,87055226	0,00010863
yicM	2,70256	3,74354474	0,0001815
rhlB	2,70069	3,74095727	0,00018338
srIA_1	-2,68965	-3,7175208	0,00020125
b0324	-2,68771	-3,7148365	0,00020339
b3914	-2,68563	-3,7119584	0,00020572
yadB	-2,68334	-3,7087898	0,00020831
b1161	2,67014	3,698686	0,00021678
prfB	2,65816	3,68210958	0,00023138
b0818	2,63438	3,64920579	0,00026312
yiaY	-2,62979	-3,634694	0,00027838
Z0352_Z0353	2,62078	3,63038781	0,00028307
Z0923_Z0924	-2,62337	-3,6258108	0,00028813
yfhG	-2,61722	-3,6173012	0,00029776
cpsG	2,59279	3,59165875	0,00032866
panC	2,59082	3,58893291	0,00033211
b3944_b3945	2,58008	3,57407224	0,00035155
b3644_b3645	2,57331	3,56470476	0,00036435
tonB	-2,57744	-3,5622586	0,00036776
b2484	-2,52026	-3,4831401	0,00049566
b0221_b0222	-2,50642	-3,4639901	0,00053232
gusC	-2,45059	-3,3867395	0,00070739
gatB	2,4427	3,38398298	0,00071453
pckA	-2,43323	-3,3627189	0,0007719
b3828_b3829	-2,42447	-3,3505979	0,00080648
b4110_b4111	2,39439	3,31713765	0,00090956
hdhA	2,38799	3,30828213	0,00093882
rrfG	2,38787	3,30811609	0,00093937
b0713	2,38776	3,30796389	0,00093989
Z0410_Z0412	2,36838	3,28114827	0,00103397
b2302	2,3591	3,26830776	0,00108205
gadA	2,34439	3,24795391	0,0011625
b2339_b2340	2,34021	3,24217015	0,00118636
htgA	2,33698	3,23770088	0,0012051

ybgT	2,33009	3,22816736	0,00124599
b2295_b2296	-2,32838	-3,2176406	0,00129262
b3226_b3227	-2,32793	-3,2170179	0,00129543
Z0649_Z0651	-2,31598	-3,200483	0,0013721
b1674_b1675	-2,31387	-3,1975635	0,00138607
b1044	-2,30934	-3,1912954	0,00141649
b3927_b3928	-2,30652	-3,1873935	0,00143574
thrT	-2,30568	-3,1862312	0,00144152
b1582_b1583	-2,30536	-3,1857884	0,00144373
glyQ	-2,28368	-3,1557903	0,00160077
nuol	2,25946	3,1304384	0,00174559
csgD	-2,25421	-3,1150134	0,0018395
b2490	-2,24809	-3,1065453	0,00189301
b1684_b1685	2,22316	3,080211	0,00206868
b3466	-2,21514	-3,0609532	0,00220647
araH	2,20009	3,04828962	0,00230162
ytfK	2,19487	3,04106684	0,00235755
b1788_b1789	2,17198	3,00939452	0,00261783
ycfA	-2,17502	-3,0054402	0,00265211
b0648	2,16798	3,00385982	0,00266592
b0905_b0906	2,1585	2,99074258	0,00278314
fucU	2,15126	2,98072478	0,00287581
Z0720_Z0721	2,14515	2,97227052	0,0029562
ykfA	-2,14866	-2,9689665	0,00298817
yi52_4	2,13699	2,96097974	0,00306676
dgoA	2,12725	2,94750274	0,00320366
b2014_b2015	-2,13132	-2,9449736	0,00322996
b1160	-2,12447	-2,9354954	0,00333029
mopA	2,11431	2,92959799	0,00339414
ais	2,11096	2,92496268	0,00344511
ybcF	-2,10678	-2,9110182	0,00360266
b0023_b0024	2,08675	2,89146391	0,00383465
osmC	2,081	2,88350778	0,00393286
b0325_b0326	-2,08361	-2,8789585	0,00399004
yhcA	-2,05246	-2,835857	0,00457042
b0778_b0779	2,03552	2,82057825	0,00479384
b1483	2,03499	2,8198449	0,00480481
yjhl	-2,02657	-2,8000337	0,00510985
b0688_b0689	-2,02413	-2,7966575	0,00516354
stpA	2,01586	2,7933752	0,00521623
b2483	2,0123	2,78844931	0,00529622
baeR	-2,0181	-2,7883139	0,00529844
b3543_b3544	1,99887	2,76986656	0,00560804
mopB	1,99194	2,76027769	0,00577534
b2015	-1,98262	-2,7392212	0,0061586
yi52_3	-1,97214	-2,7247202	0,0064357
b2735_b2736	-1,96295	-2,7120043	0,00668787
b3715	1,9249	2,66751613	0,00764151
rpiR	1,91414	2,65262779	0,00798687
b0679_b0680	-1,91961	-2,6520358	0,00800089
hslT	-1,9183	-2,6502232	0,00804395
b3087_b3088	-1,91298	-2,642862	0,00822093

b2547	1,90624	2,64169676	0,00824927
clpB	1,90162	2,63530418	0,00840627
b1916_b1917	-1,90234	-2,6281397	0,0085854
b0646	-1,88541	-2,6047141	0,00919516
b1377_b1378	1,8785	2,60331362	0,00923281
valZ	1,87143	2,59353103	0,00949966
b0271	-1,87276	-2,5872106	0,00967571
topA	-1,86189	-2,5721701	0,01010638
yhfV	1,84961	2,56333925	0,01036712
b0878	-1,85108	-2,5572126	0,01055152
b3687_b3688	1,84384	2,55535544	0,01060799
yibS	1,84185	2,55260193	0,01069221
betT	-1,83786	-2,5389204	0,01111956
ybdG	1,82247	2,52578631	0,01154401
b2288_b2289	-1,8145	-2,5065977	0,01218997
sdiA	1,80595	2,502928	0,01231709
b3012_b3013	1,80278	2,49854175	0,01247057
htpG	1,79728	2,49093154	0,01274089
csgE	1,78709	2,47683189	0,01325545
b0761_b0762	-1,7833	-2,4634271	0,0137616
b1202_b1203	-1,77908	-2,457588	0,01398737
b0884_b0885	1,77299	2,45732208	0,01399772
b2005	-1,77815	-2,4563012	0,01403756
b4069_b4070	1,77071	2,4541673	0,01412114
hemG_rrsA	-1,77358	-2,4499778	0,01428651
dfp	-1,77204	-2,4478469	0,01437128
hemB	1,76013	2,43952802	0,01470647
proK	-1,75435	-2,4233697	0,01537727
b0222_b0223	-1,75369	-2,4224565	0,01541597
ompT	1,74772	2,42235661	0,01542021
rriA	-1,74453	-2,409782	0,01596205
yefI	-1,7416	-2,4057278	0,01614027
b1057_b1058	-1,73804	-2,400802	0,01635917
frwC	-1,7358	-2,3977025	0,01649824
yjeN	-1,73446	-2,3958484	0,01658193
b0557_b0558	-1,72856	-2,3876847	0,01695486
b1019_b1020	1,72221	2,38705907	0,01698374
aceA	-1,7202	-2,3761172	0,01749588
b1355_b1356	1,71305	2,37438461	0,0175782
galF	-1,71827	-2,3734467	0,01762291
b2935_b2936	-1,71825	-2,373419	0,01762423
yaeD_rrsH	-1,71762	-2,3725473	0,01766587
xyIH	-1,71478	-2,3686177	0,01785467
fdoH	-1,69361	-2,3393253	0,01931856
ccmB	1,68559	2,33638889	0,01947094
rhlE	-1,69141	-2,3362812	0,01947655
b0931_b0932	1,68104	2,33009317	0,01980118
b0220	1,66892	2,31332303	0,02070483
Z0873_Z0875	1,66699	2,31065254	0,020852
rbsA	-1,67056	-2,3074316	0,02103072
moeA	1,66301	2,30514551	0,02115837
b2105_b2106	1,66246	2,30438449	0,02120101

ygcE	-1,66816	-2,3041108	0,02121637
b1052	-1,66413	-2,2985345	0,02153133
flp	1,65129	2,28892884	0,02208342
b1846_b1847	1,65114	2,28872129	0,02209549
b0300_b0301	1,64606	2,28169222	0,02250745
b3195	1,63923	2,27224173	0,02307184
trpT	-1,64195	-2,2678446	0,02333861
yihE	-1,64126	-2,2668899	0,02339688
b1161_b1162	-1,63594	-2,2595287	0,02385044
flgE	-1,63426	-2,2572042	0,02399524
aceK	1,6267	2,25490428	0,02413926
rob	-1,62604	-2,2458304	0,0247148
sbcB	1,6049	2,22474017	0,0260986
fabG	-1,60116	-2,2114045	0,02700774
metT	-1,59836	-2,2075302	0,02727694
uspA	1,59159	2,20632345	0,02736127
polA	-1,59687	-2,2054686	0,02742114
yicP	-1,59053	-2,1966961	0,02804206
sieB	1,58388	2,19565532	0,02811652
rbsC	-1,58703	-2,1918532	0,02839001
rhsA	1,57972	2,18989923	0,02853144
nrpE	-1,58349	-2,186955	0,02874571
Z0468_Z0469	-1,57036	-2,1687873	0,03009872
rpoE	-1,57004	-2,1683446	0,03013237
rhdD	1,55442	2,15489226	0,03117015
b1339	-1,54933	-2,1396887	0,03237982
pqiA	1,53266	2,12478349	0,03360456
hycC	-1,52994	-2,1128592	0,0346127
mdh	1,52169	2,10960458	0,03489231
lrp	1,5211	2,10878821	0,03496274
b4271_b4272	1,51082	2,09456403	0,03620964
yhhI	1,50524	2,08684313	0,03690219
tyrP	1,5038	2,08485064	0,03708273
b0831	-1,50725	-2,0814636	0,03739136
flgD	-1,50701	-2,0811315	0,03742174
araC	1,4992	2,07848573	0,03766451
b2920	-1,4996	-2,0708785	0,03837002
rpsS	1,49132	2,06758237	0,03867918
yihW	1,48985	2,06554837	0,03887101
caiC	1,48586	2,06002751	0,03939578
hofD	1,48581	2,05995832	0,03940239
yabB	-1,49143	-2,0595739	0,03943916
cpxR	1,48364	2,05695575	0,03969035
ycaC	-1,48026	-2,0441182	0,04094173
b1533_b1534	1,47315	2,042441	0,04110767
b3954_b3955	1,46717	2,03416662	0,04193466
nikD	1,46487	2,03098417	0,04225646
phnK	-1,46329	-2,0206373	0,04331719
b0220	1,45583	2,01847575	0,0435416
b0247	1,45289	2,01440775	0,0439666
b2269	1,45135	2,01227689	0,04419062
b0024	1,44934	2,0094957	0,04448445

ybcJ	-1,45366	-2,0073125	0,04471626
b2899	-1,45257	-2,0058043	0,04487699
b3025	1,44374	2,00174712	0,0453118
b1072_b1073	1,44212	1,99950557	0,04555354
nlpC	1,44209	1,99946406	0,04555803
uidA	1,43517	1,98988903	0,04660302
yagW	-1,43967	-1,9879549	0,04681654
phoB	-1,43743	-1,9848554	0,04716042
yjjA	-1,43083	-1,9757232	0,048186

Anexo II. Genes con cambios significativos en la expresión ($p < 0,05$) tras tratamiento con Nal 10 mg/ml a 30°C en LB durante 1 hora y posterior cambio a 41°C durante 20 minutos.

GEN	LogRatio	puntuación -Z	valor-p
b1004_b1005	6,09448	5,94520424	2,7706E-09
b2341	6,01715	5,87051092	4,3588E-09
minE	-5,92244	-5,6619816	1,5005E-08
hisC	-5,85304	-5,5949479	2,2128E-08
msbB	-5,78645	-5,5306284	3,1989E-08
b0442	5,34859	5,22474644	1,7473E-07
tsr	-5,41075	-5,1677384	2,3738E-07
ygiC	5,21587	5,09655172	3,465E-07
b2560_b2561	4,95129	4,84099295	1,2937E-06
glfB	-4,99856	-4,7696026	1,8482E-06
b2668	4,82082	4,71497151	2,4203E-06
mcrD	4,80955	4,70408578	2,553E-06
pspD	-4,90882	-4,6829224	2,8314E-06
yaaA	-4,89733	-4,6718242	2,9887E-06
molR_1	-4,83135	-4,6080939	4,068E-06
sohB	-4,80297	-4,5806815	4,6393E-06
glgS	-4,73347	-4,5135512	6,3811E-06
lrp	4,56737	4,47016326	7,8229E-06
speD	-4,65666	-4,4393602	9,0304E-06
moaE	-4,61658	-4,4006468	1,0802E-05
b4012_b4013	4,48928	4,39473585	1,11E-05
flgE	-4,49189	-4,2802082	1,8685E-05
b2519	4,33847	4,24906793	2,1481E-05
b1781	-4,43129	-4,2216745	2,4265E-05
b0790	4,29655	4,20857725	2,5715E-05
Z0472_Z0473	4,29115	4,20336137	2,6315E-05
fkpA	-4,38727	-4,1791554	2,9277E-05
b0819_b0820	4,24184	4,15573267	3,2444E-05
lacI	-4,36185	-4,1546021	3,2605E-05
yehD	4,20394	4,11912492	3,8053E-05
valW	4,17808	4,09414666	4,2395E-05
b2787	-4,28156	-4,0770498	4,5635E-05
flgC	-4,27935	-4,0749151	4,6055E-05
cysQ	-4,26091	-4,0571038	4,971E-05
fliM	-4,25822	-4,0545056	5,0266E-05
yihW	4,12438	4,04227764	5,2961E-05
Z0855_Z0856	-4,2422	-4,0390318	5,3699E-05
b1318	-4,21654	-4,0142467	5,9664E-05
fliC	-4,16324	-3,962764	7,412E-05
b0983	-4,1458	-3,9459187	7,9529E-05
ycgB	-4,10542	-3,9069155	9,352E-05
flgJ	-4,01691	-3,8214234	0,00013273
b1192	3,85649	3,78352173	0,00015468
lamB	-3,97099	-3,7770691	0,00015874
yeiA	-3,94167	-3,7487488	0,00017777
fliD	-3,92511	-3,7327534	0,00018945
yehE	-3,88956	-3,6984156	0,00021701

ykfC	3,73404	3,66524684	0,00024717
yacA	-3,85225	-3,6623777	0,00024995
filL	-3,84457	-3,6549596	0,00025729
epd	-3,82796	-3,6389159	0,00027386
b1923_b1924	-3,81317	-3,6246302	0,00028945
ispB	3,66669	3,60019324	0,00031806
hemE	3,62537	3,5602821	0,00037054
b0023_b0024	3,61203	3,54739695	0,00038914
b2351	3,6075	3,5430214	0,00039565
cvpA	3,60458	3,54020097	0,00039991
malE	-3,70195	-3,5172024	0,00043621
malQ	-3,70159	-3,5168547	0,00043678
malP	-3,70037	-3,5156763	0,00043872
creB	-3,66673	-3,4831833	0,00049558
b1327_b1328	3,51765	3,45623497	0,00054787
lit	-3,6223	-3,4402682	0,00058124
b2492	-3,61924	-3,4373125	0,00058762
mhpB	-3,61413	-3,4323767	0,00059841
fliH	-3,5939	-3,4128365	0,00064301
thrC	-3,5704	-3,3901378	0,00069868
b1147	-3,55864	-3,3787787	0,00072819
Z0269_Z0271	3,42409	3,36586503	0,00076315
b1202	-3,49724	-3,3194723	0,00090199
b0349	-3,48576	-3,3083837	0,00093848
insB_1	-3,46736	-3,2906111	0,00099982
gatB	-3,44779	-3,2717083	0,00106912
b0804	-3,43744	-3,2617112	0,00110754
ppiC	3,31382	3,25935485	0,00111678
b1498_b1499	-3,41221	-3,2373415	0,00120661
ycdB	-3,39942	-3,2249876	0,00125991
b0805	-3,35175	-3,178943	0,00147826
rrfE	3,21351	3,16246506	0,00156453
glcC	-3,29349	-3,1226694	0,00179232
b1502	-3,26298	-3,0931997	0,00198024
accC	-3,25822	-3,088602	0,00201114
b1140	-3,25688	-3,0873077	0,00201992
b0563_b0564	3,13531	3,0869314	0,00202248
flgD	-3,22551	-3,0570073	0,00223573
ybhB	-3,20928	-3,0413307	0,00235549
cspA	-3,198	-3,0304353	0,00244215
osmB	-3,18718	-3,0199842	0,00252802
b0879	-3,16531	-2,9988599	0,00271006
b4295	-3,1565	-2,9903503	0,00278672
yiaL	3,02532	2,98069167	0,00287612
nrdB	3,00404	2,96013724	0,00307516
yafZ	2,99724	2,9535691	0,00314136
cadB	2,98576	2,94248052	0,00325608
lrp	2,98456	2,94132144	0,00326829
rseA	-3,07023	-2,9070218	0,00364901
b1928_b1929	2,90721	2,8666088	0,00414909
b2233_b2234	2,9016	2,86119008	0,00422067
b0335	2,87751	2,83792146	0,00454096

b1200	-2,98469	-2,8243984	0,00473707
argR	2,86209	2,82302723	0,00475738
rbsR	-2,98306	-2,822824	0,00476039
eaeh	2,85115	2,81246024	0,00491653
rrsB_gltT	-2,95434	-2,7950832	0,00518876
rfbA	-2,95251	-2,7933156	0,0052172
speB	-2,95221	-2,7930259	0,00522187
purM	-2,90951	-2,7517818	0,00592731
b3592_b3593	-2,90075	-2,7433205	0,00608224
b3193	-2,89571	-2,7384523	0,00617302
fecE	-2,89271	-2,7355546	0,00622763
yagl	2,77114	2,7351783	0,00623476
flgB	-2,88438	-2,7275086	0,00638156
b4310	-2,87861	-2,7219353	0,00649019
yagF	-2,87593	-2,7193467	0,0065412
yjhF	-2,87156	-2,7151257	0,00662516
b2016	2,74406	2,70902163	0,00674829
b1165	2,73254	2,69789442	0,00697805
yfbB	-2,85291	-2,6971116	0,00699448
yfiA	2,72934	2,69480353	0,00704311
b0788	-2,84781	-2,6921855	0,00709864
ygjU	-2,84331	-2,687839	0,0071917
yjeS	2,7085	2,6746741	0,00748028
atoD	2,70772	2,6739207	0,00749711
cbpA	2,7075	2,6737082	0,00750186
dam	2,69536	2,66198213	0,00776829
purH	-2,80297	-2,6488744	0,00807612
b1873	2,67644	2,64370723	0,00820044
dctA	-2,7961	-2,6422386	0,00823608
b4031_b4032	2,66936	2,63686864	0,0083676
yicE	2,66505	2,63270559	0,00847085
rfaZ	-2,78033	-2,6270063	0,00861405
ykgE	-2,77057	-2,6175791	0,00885567
pepE	2,64265	2,61106935	0,00902603
emrY	-2,75941	-2,6067996	0,00913935
hypF	-2,75515	-2,6026849	0,00924976
tnaA	2,62822	2,59713136	0,00940066
b0417	-2,7456	-2,5934605	0,00950161
leuO	-2,74256	-2,5905242	0,00958305
tolB	-2,70498	-2,5542255	0,01064248
b1113	-2,70021	-2,5496182	0,01078415
b1287	-2,69385	-2,543475	0,01097564
b0867	-2,69276	-2,5424222	0,01100876
fliS	-2,68832	-2,5381336	0,01114459
ilvC	2,56269	2,5338357	0,0112822
clpP	2,55894	2,53021356	0,01139935
pepQ	2,55063	2,52218691	0,01166281
uidA	-2,67122	-2,5216166	0,01168173
umuC	2,52749	2,4998359	0,01242511
b1315	2,51894	2,49157742	0,01271775
rrlA_rrfA	2,5168	2,48951039	0,01279194
rseB	2,51655	2,48926891	0,01280063

lamB	-2,63263	-2,4843424	0,01297912
b0966	-2,63154	-2,4832896	0,01301754
rfaB	-2,62608	-2,4780157	0,01321155
yhaG	2,50159	2,474819	0,01333039
eutE	2,49197	2,465527	0,0136812
yi81_2	-2,6122	-2,464609	0,0137163
ygcA	2,48488	2,45867875	0,01394495
hofG	-2,60146	-2,4542352	0,01411847
b0080_b0081	-2,60044	-2,45325	0,0141572
flgH	-2,58704	-2,4403068	0,01467479
b1191_b1192	2,46065	2,4352749	0,01488048
yhjE	2,44987	2,42486246	0,01531418
yihX	2,4481	2,42315281	0,01538645
cspD	2,44427	2,4194534	0,01554385
cspD	2,438	2,41339719	0,01580458
b0281	2,43777	2,41317503	0,01581421
b0561	2,42664	2,40242452	0,01628678
tar	-2,54143	-2,396252	0,01656368
argE	2,4145	2,39069845	0,01681634
greA	-2,53325	-2,3883509	0,01692415
fliG	-2,52458	-2,3799765	0,01731372
gip	-2,51662	-2,3722879	0,01767828
b4238_b4239	-2,51091	-2,3667726	0,01794392
malZ	-2,5062	-2,3622232	0,01816567
b3175_b3176	2,37991	2,35728785	0,01840894
Z0077_Z0078	-2,49856	-2,3548437	0,01853046
yibT	2,37678	2,35426457	0,01855936
pyrD	-2,49728	-2,3536073	0,0185922
yigN	2,36104	2,33906125	0,01933222
hslT	2,35498	2,33320787	0,01963719
cheY	-2,47064	-2,3278757	0,01991866
uxuA	2,34735	2,32583803	0,02002715
b1660_b1661	2,34128	2,319975	0,02034218
glmU	2,33077	2,30982335	0,02089788
ugpQ	-2,44537	-2,3034673	0,02125251
b3207	2,32234	2,30168078	0,02135312
b4235_b4236	-2,43817	-2,2965128	0,02164652
b0379_b0380	2,30582	2,28572406	0,02227034
fhuC	-2,42317	-2,2820242	0,02248784
ycgC	-2,42096	-2,2798896	0,02261417
narV	2,29673	2,27694399	0,0227895
b2044	-2,41325	-2,2724425	0,02305973
fliF	-2,41152	-2,2707715	0,02316075
yfcB	-2,40295	-2,2624937	0,02366685
pmrD	-2,39973	-2,2593835	0,02385947
flgK	-2,39707	-2,2568141	0,02401961
ugpB	-2,39196	-2,2518784	0,02432988
rhaT	-2,39002	-2,2500045	0,02444858
b3644_b3645	2,26658	2,247822	0,02458746
yojI	-2,38727	-2,2473483	0,0246177
fliE	-2,38271	-2,2429438	0,02490036
osmY	2,25655	2,23813399	0,02521224

ompX	-2,37571	-2,2361824	0,02533974
glmS	2,25415	2,23581582	0,02536375
yaG	-2,37176	-2,2323671	0,02559062
b3890_b3891	2,25051	2,23229993	0,02559506
yidE	-2,36998	-2,2306478	0,02570438
clpB	2,24879	2,23063858	0,02570499
pnuC	-2,3689	-2,2296046	0,02577361
b2487	-2,365	-2,2258376	0,02602497
modF	-2,36452	-2,225374	0,02605605
yhfN	2,24184	2,22392555	0,02615337
ybil	-2,35525	-2,2164201	0,02666266
asnC	-2,34267	-2,204269	0,02750534
cheW	-2,34161	-2,2032451	0,02757738
pntA	-2,33999	-2,2016804	0,0276878
b1161_b1162	-2,33741	-2,1991883	0,02786444
nrdA	2,2109	2,19404049	0,0282324
uxaA	2,21082	2,19396322	0,02823795
nrff	2,20794	2,19118141	0,02843857
b1966_b1967	-2,32409	-2,1863225	0,02879192
csrC	2,20101	2,1844877	0,02892633
b1534_b1535	2,19964	2,18316442	0,0290236
uvrC	-2,31629	-2,1787885	0,02934728
glcG	-2,31223	-2,1748669	0,02963999
b3071	-2,30983	-2,1725487	0,02981419
yaC	2,18786	2,17178607	0,0298717
b3618_b3619	2,18765	2,17158323	0,02988701
rspA	-2,30858	-2,1713413	0,02990527
yejF	-2,30813	-2,1709067	0,02993812
yjeK	-2,29764	-2,1607744	0,03071266
accD	2,17234	2,15679525	0,03102151
pepT	-2,28648	-2,1499949	0,03155551
gatA	-2,28312	-2,1467494	0,03181312
torC	-2,27406	-2,1379984	0,03251676
rpoH	2,15179	2,13694593	0,03260227
yjbE	-2,27142	-2,1354484	0,03272429
tsr	-2,27037	-2,1344342	0,03280714
b0893_b0894	-2,26775	-2,1319035	0,03301466
gatR_2	2,14539	2,13076415	0,03310846
yqjD	2,14439	2,12979824	0,03318815
hslV	2,13939	2,12496873	0,0335891
b0813_b0814	2,1379	2,12352953	0,03370938
b0821	2,13607	2,12176193	0,03385761
cspE	-2,24685	-2,1117161	0,03471068
tnaL	2,12519	2,11125289	0,03475046
yihD	2,11768	2,10399896	0,03537841
b0958_b0959	2,11183	2,09834842	0,03587425
hycB	2,10803	2,09467799	0,0361995
fliA	-2,22009	-2,0858685	0,0369904
fmt	2,09781	2,08480646	0,03708674
sbcD	2,09203	2,07922353	0,03759668
yefl	-2,21243	-2,0784697	0,03766599
proC	-2,20307	-2,0694289	0,03850573

livF	-2,20247	-2,0688493	0,0385601
amn	2,08043	2,06801905	0,0386381
b3472	2,06732	2,05535606	0,03984449
nuoB	2,06676	2,05481515	0,03989673
yhfR	2,06633	2,05439981	0,03993688
vacJ	-2,18354	-2,0505648	0,04030922
b4356	-2,18134	-2,0484398	0,04051679
gltB	-2,18033	-2,0474642	0,04061239
nuoN	-2,17997	-2,0471165	0,04064651
leuA	2,05776	2,04612202	0,04074423
b0463_b0464	2,0555	2,04393908	0,04095943
yiaE	2,03979	2,02876473	0,04248212
ompF	-2,16096	-2,0287547	0,04248315
yjJR	-2,15592	-2,0238865	0,04298169
minC	-2,15449	-2,0225053	0,04312404
b1044	-2,15223	-2,0203223	0,04334983
cyaY	2,02313	2,01267278	0,04414893
flhD	-2,1435	-2,01189	0,0442314
glnA	2,02105	2,0106637	0,04436085
flhC	-2,14208	-2,0105184	0,04437621
tra5_3	-2,142	-2,0104411	0,04438438
yeil	2,01997	2,00962052	0,04447123
mgtA	-2,13831	-2,0068769	0,04476263
fliR	-2,13322	-2,0019605	0,04528884
pyrL	2,00807	1,99812627	0,04570283
b0479_b0480	-2,12846	-1,9973628	0,04578565
gatZ	-2,12735	-1,9962906	0,04590216
cdh	2,00304	1,99326777	0,04623199
frdD	-2,12162	-1,990756	0,04650758
yaeC	-2,10993	-1,9794646	0,04776358
oxyR	1,98802	1,9787599	0,0478429
rffG	-2,10871	-1,9782862	0,04789629
tbpA	-2,10848	-1,978064	0,04792134
ycal	1,98323	1,97413323	0,04836646
b0905_b0906	1,98202	1,97296448	0,04849947
b2299	1,98151	1,97247187	0,04855562
kdpE	-2,1008	-1,9706459	0,04876425
dnaC	1,97667	1,9677969	0,04909127
avtA	-2,09758	-1,9675357	0,04912135
ybaM	-2,09208	-1,9622232	0,04973636
b2985_b2986	1,97079	1,96211738	0,04974868