



Departamento de Bioquímica,  
Biología Molecular y Genética  
Facultad de Ciencias

“Replicación cromosómica en  
presencia de una Nucleósido-  
difosfato reductasa codificada por el  
alelo *nrdA101* de *Escherichia coli*”

*Memoria presentada por el Licenciado  
Israel Salguero Corbacho  
para optar al grado de  
Doctor en Biología  
Badajoz, 2007*

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

Caldereros 2. Planta 3<sup>a</sup>  
Cáceres 10071  
Correo e.: [publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>

**M<sup>a</sup> Elena Guzmán Cabañas**, Profesora titular de Genética de la  
Universidad de Extremadura y  
**Alfonso Jiménez Sánchez**, Catedrático de Genética de la  
Universidad de Extremadura

## **CERTIFICAN**

Que el presente trabajo de investigación, titulado “Replicación cromosómica en presencia de una Nucleósido-difosfato reductasa codificada por el alelo *nrdA101* de *Escherichia coli*”, ha sido realizado por el Lcdo. D. Israel Salguero Corbacho, bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, 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 así conste, expedimos el presente certificado en Badajoz a 14 de noviembre de 2007.

Fdo.: Prof. Dra. *M<sup>a</sup> Elena Guzmán Cabañas*

Fdo.: Prof. Dr. *Alfonso Jiménez Sánchez*



*A Estrella*



*“No entiendes realmente algo a  
menos que seas capaz de  
explicárselo a tu abuela”*

*Albert Einstein*





<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1. El ciclo celular bacteriano	11
2. La replicación en <i>Escherichia coli</i>	14
2.1. Iniciación	14
2.1.1. Estructura de <i>oriC</i>	14
2.1.2. Etapas de la iniciación	16
2.1.3. Regulación del inicio de la replicación cromosómica	18
2.2. Elongación	19
2.2.1. Funcionamiento del replisoma	21
2.2.2. Recombinación en la elongación	23
2.2.3. Procesamiento de las horquillas paradas	24
2.2.4. Estabilización de las horquillas paradas por RecA	28
2.3. Terminación	29
3. Nucleósido-difosfato reductasa	31
3.1. Estructura y clases	32
3.2. Acción catalítica y control alostérico	33
3.3. Regulación transcripcional	34
3.4. La mutación <i>nrdA101</i>	36
4. Hiperestructura de replicación	38
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>

## Índice

---

<b>MATERIALES</b>	<b>45</b>
1. Estirpes bacterianas	47
2. Fagos	49
3. Plásmidos	49
3.1. pDnaA116	49
3.2. pRecA y pRecAS25P	49
4. Productos químicos	49
4.1. Antibióticos	50
4.2. Productos radiactivos	50
4.3. Soluciones y tampones	51
4.3.1. Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico	51
4.3.2. Electroforesis de DNA	51
4.3.3. Electroforesis de proteínas	52
4.3.4. Electroforesis en campo pulsante	52
4.3.5. Southern blot	52
4.3.6. Western blot	53
4.3.7. Medida de la síntesis de DNA <i>in vivo</i>	53
4.3.8. Manipulación <i>in vivo</i> de bacterias y fagos	53
4.3.9. Citomería de flujo	54
4.3.10. Microscopía óptica	54
5. Medios de crecimiento	55
5.1. Medios de crecimiento para bacterias	55
5.2. Medios de crecimiento para el fago PI	55
6. Enzimas	56
7. Anticuerpos	56
8. Oligonucleótidos	57

<b>MÉTODOS</b>	<b>59</b>
1. Crecimiento de estirpes	61
1.1. Cambios en las condiciones de crecimiento	61
2. Conservación de las estirpes bacterianas	62
3. Medida de la cantidad de DNA sintetizado	62
3.1. Marcaje del DNA <i>in vivo</i>	62
3.2. Medida de la síntesis de DNA	63
3.2.1. Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial	64
3.2.2. Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los orígenes de replicación	64
3.2.3. Medida de la degradación de DNA	65
4. Aislamiento de DNA	65
4.1. Aislamiento de DNA cromosómico	65
4.2. Aislamiento de DNA plasmídico	66
5. Purificación y concentración de DNA	66
5.1. Purificación de DNA mediante extracciones con fenol/cloroformo	66
5.2. Concentración de DNA mediante precipitación	67
5.3. Obtención de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	68
6. Electroforesis de DNA	68
7. Medida de la concentración de DNA mediante densimetría de geles	68
8. Electroforesis en campo pulsante	69
8.1. Preparación de bloques de DNA	69
8.2. Electroforesis y procesamiento del gel	70

## Índice

---

9.	Electroporación	72
10.	Transducción	73
	10.1. Multiplicación de fagos	73
	10.2. Transducción	73
	10.3. Comprobación de los transductantes	74
	10.3.1. Comprobación de los requerimientos de aminoácidos y de la resistencia a antibióticos	74
	10.3.2. Comprobación de la correcta incorporación de timidina radiactiva	75
11.	Análisis de viabilidad	76
12.	Citometría de flujo	76
	12.1. Fundamento de la citometría de flujo	76
	12.2. Toma y análisis de las muestras	77
	12.2.1. Toma y fijado de las muestras	77
	12.2.2. Tinción	77
	12.2.3. Análisis de las muestras	78
13.	Microscopía óptica de contraste de fase y fluorescencia	78
	13.1. Instrumentación	79
	13.2. Tratamiento de las muestras	79
	13.2.1. Fijado de las muestras	79
	13.2.2. Preparación de las muestras para su visualización	79
14.	Amplificación de segmentos de DNA mediante PCR	80
15.	Secuenciación	80
16.	Southern Blot	81
	16.1. Aislamiento del DNA cromosómico de las estirpes a analizar	81
	16.2. Fragmentación del DNA	81

16.3. Separación de los fragmentos de DNA	82
16.4. Desnaturalización del DNA	82
16.5. Trasferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nylon	82
16.6. Marcaje de las sondas	83
16.7. Hibridación de las sondas al DNA fijado a las membranas	84
16.7.1. Prehibridación	85
16.7.2. Hibridación	85
16.7.3. Lavado de las membranas	85
16.8. Detección	86
17. Análisis de frecuencia de marcadores	86
18. Western Blot	87
18.1. Obtención de extractos celulares	87
18.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	88
18.3. Trasferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa	89
18.4. Inmunodetección de las proteínas	90
<b>RESULTADOS</b>	<b>91</b>

*Capítulo 1: Requerimientos de enzimas de recombinación en la replicación de una estirpe *nrdA101* en presencia de rifampicina*

1.1. Requerimientos a temperatura permisiva en presencia de rifampicina	95
1.2. La proteína RecA es absolutamente requerida para la replicación del DNA en una estirpe <i>nrdA101</i> a 42°C en ausencia de síntesis de proteínas	97
1.3. Degradación cromosómica en el doble mutante <i>nrdA101 recA</i>	99

## Índice

---

- 1.4. Papel de RecA en la estabilización de las horquillas de replicación en una estirpe *nrdA101* a 42°C en ausencia de síntesis de RNA y/o de proteínas 100

### **Capítulo 2: La inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas no es necesaria para que un mutante *nrdA101* complete las rondas de replicación a temperatura restrictiva**

- 2.1. La inhibición de la síntesis de proteínas permite a un mutante *nrdA101* completar las rondas de replicación a temperatura restrictiva 105
- 2.2. Inhibición del inicio de la replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 107
- 2.2.1. Determinación de los parámetros de ciclo celular de los mutantes *dnaA46* a 30°C 108
- 2.2.2. Efecto del alelo *dnaA46* sobre la replicación cromosómica de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 110
- 2.2.3. Efecto de la mutación *dnaA46* sobre la morfología de una estirpe *nrdA101* a 42°C 113
- 2.2.4. La inhibición de la iniciación por inactivación de DnaA permite la replicación íntegra de los cromosomas en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 118
- 2.2.5. La inhibición de la iniciación por inactivación de DnaC no permite la replicación completa de los cromosomas a 42°C en un mutante *nrdA101* 121

### **Capítulo 3: La inhibición de la iniciación no es necesaria para que un mutante *nrdA101* replique íntegramente su cromosoma a temperatura restrictiva**

- 3.1. Parámetros de ciclo celular de los mutantes *dnaAT174P* a 30°C 125
- 3.2. Efecto del alelo *dnaAT174P* sobre la replicación cromosómica de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 127

- 3.3. Efecto del alelo *dnaAT174P* sobre la morfología de una estirpe *nrdA101* a temperatura restrictiva 128
- 3.4. Concentraciones subóptimas de timidina provocan un aumento de la termorresistencia de la replicación en un mutante *nrdA101* 130

**Capítulo 4: Condiciones que mantienen un nivel suficiente de NDP reductasa termosensible a 42°C permiten la replicación cromosómica en un mutante *nrdA101* in vivo a temperatura restrictiva**

- 4.1. Niveles de NrdA a 42°C en condiciones de sobreexpresión 135
- 4.2. NrdA es degradada por una proteasa sintetizada a 42°C en un mutante *nrdA101* 136

**DISCUSIÓN 139**

- Papel de RecA en la estabilización de las horquillas de replicación en una estirpe *nrdA101* 142
- La inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas no es necesaria para que un mutante *nrdA101* complete las rondas de replicación a temperatura restrictiva 144
- La inhibición de la iniciación no es necesaria para que un mutante *nrdA101* finalice la replicación a temperatura restrictiva 148
- Condiciones que mantienen un nivel suficiente de NDP reductasa permiten la replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 151
- Modelo de replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva 153

**CONCLUSIONES 155**

## Índice

---

ANEXO	159
• Procesamiento de las horquillas de replicación paradas por carencia de nucleótidos y su relación con la muerte por carencia de timina en <i>Escherichia coli</i>	161
BIBLIOGRAFÍA	173
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	205
AGRADECIMIENTOS	213



# *Introducción*



## 1. El ciclo celular bacteriano

En bacterias, al igual que sucede en otros organismos unicelulares, se da una identificación entre el ciclo de vida y el ciclo celular. Este último puede definirse como el conjunto de procesos que permiten que una célula recién nacida duplique todos sus componentes para que dé lugar, mediante fisión binaria, a dos células hijas idénticas.

Existe gran analogía entre el ciclo celular bacteriano y el de los organismos eucariontes. Así, los dos poseen una fase de crecimiento celular y otra en la que se duplica el genoma o replicación, que es seguida de la separación de los cromosomas replicados (llamada mitosis en eucariontes y partición en bacterias), para que finalmente acaezca la división celular (Donachie, 1992, 1993).

El ciclo celular bacteriano comprende tres fases denominadas *B*, *C* y *D*. *B* es el periodo que transcurre desde el nacimiento de la célula hasta el inicio de la replicación y se corresponde con la fase *G1* en eucariontes. *C* es el tiempo dedicado a la duplicación del material genético y es el equivalente de la fase *S* en organismos eucariontes. *D* es el tiempo comprendido entre el final de la replicación y la división celular y es conocido como *G2* en eucariontes. En ambos tipos de ciclo la fase de mayor variabilidad es la que comprende el tiempo transcurrido entre el nacimiento de la célula y el inicio de la replicación. Esta fase desaparece totalmente en células que crecen rápidamente y puede abarcar el ciclo completo de células quiescentes.

La diferencia más notoria entre el ciclo celular bacteriano y el de organismos eucariontes reside en que, en bacterias, el tiempo requerido para completar la replicación del cromosoma, periodo *C*, puede ser mayor que el tiempo del ciclo celular o tiempo de generación ( $\tau$ ). Sin embargo, en eucariontes el tiempo de replicación es siempre inferior a la duración total del ciclo.

Es destacable que, a pesar de su simplicidad y del tiempo transcurrido desde que se abordara su estudio, aún no se ha podido desvelar el mecanismo que controla y coordina las diferentes etapas del ciclo celular de *Escherichia coli*.

Cuando una población bacteriana crece en medio no limitante, su crecimiento es continuo y exponencial. A lo largo de todo el crecimiento exponencial los valores medios relativos de todos los parámetros celulares no cambian (masa por célula o DNA, RNA y proteínas por célula o por masa). A esto se le denomina crecimiento equilibrado.

Cuando las bacterias crecen en diferentes medios de cultivo más o menos ricos en nutrientes, se adaptan a estos medios con velocidades de crecimiento mayores o menores, desde tres generaciones por hora hasta una generación cada muchas horas. A diferentes velocidades de crecimiento la composición de las células varía en términos de DNA, RNA, proteínas o masa celular, independientemente del tipo de medio utilizado para conseguir cada velocidad de crecimiento. El estado fisiológico celular depende de la velocidad de crecimiento y no de la composición del medio de cultivo.

## Introducción

---

Las células que crecen lentamente son más pequeñas, tienen menos DNA y RNA y menos nucleoides por célula que las que crecen rápidamente.

En cada ciclo celular tiene lugar una duplicación del cromosoma, lo que permite asegurar que cada célula hija reciba el genoma completo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el RNA, con las proteínas y con los otros componentes celulares, el DNA no es sintetizado exponencialmente desde el nacimiento hasta la división de la célula. La replicación cromosómica transcurre linealmente a velocidad constante y existen, antes y después, fases en que no hay síntesis de DNA (Haber, 1999; Helmstetter, 1996; Holland, 1987).

Cuando el tiempo requerido para completar la replicación y división supera al transcurrido desde el nacimiento hasta la división de la célula, es decir, cuando  $C + D > \tau$ , las replications que finalizan en un ciclo comienzan en el anterior o en dos precedentes. En estas condiciones se da un solapamiento de ciclos de replicación comenzando una ronda de replicación antes de que finalice la que estaba en curso. Por otro lado, si se produjera más de una iniciación por ciclo celular, la cantidad de DNA por célula aumentaría después de cada división hasta que el cultivo dejara de ser viable (Cooper y Helmstetter, 1968; Donachie, 1992, 1993).

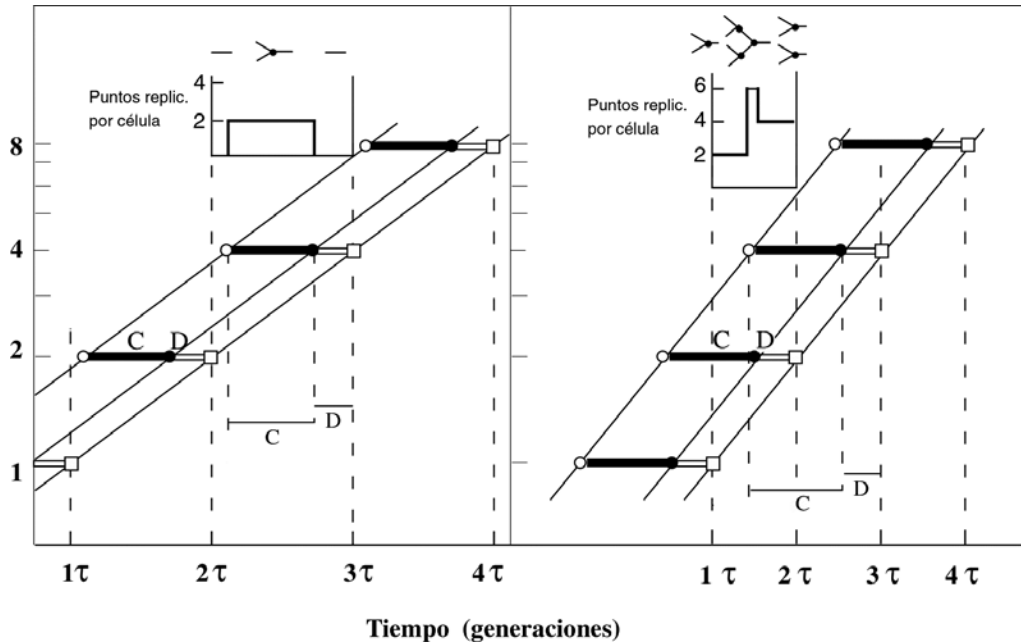
De este modo, independientemente de la velocidad de replicación, el tiempo transcurrido entre dos inicios consecutivos o tiempo de interiniciación ( $I$ ), ha de ser igual al tiempo de generación  $\tau$ . Se determina así que, durante el crecimiento celular equilibrado, la frecuencia de inicio de la replicación ( $f$ ) sea:

$$f = \tau / I = 1$$

Esta expresión indica que el control de la replicación se ejerce sobre el inicio de la replicación, siendo independientes las velocidades de replicación y de crecimiento celular. Como la frecuencia de inicio determina la tasa de síntesis de DNA por célula, si su valor se mantiene constante en la unidad se asegura el crecimiento equilibrado. De lo expuesto se concluye que el número de ciclos de replicación por cromosoma,  $n$ , depende exclusivamente de la relación entre el tiempo de replicación y el de generación:

$$n = C / \tau$$

$n$  puede ser calculado experimentalmente a partir del DNA acumulado tras inhibir el inicio de replicación  $\Delta C$ , como se detalla en el apartado 3.2.2. de *Métodos*.



**Fig. 1.** Fases del ciclo celular en cultivos creciendo lenta ( $\tau > C$ ) y rápidamente ( $\tau < C$ ). Se indica el inicio (O) y fin (●) de la replicación así como el tiempo requerido para su completación (C). Además, se muestra el tiempo que transcurre desde el fin de la replicación hasta la división celular (D) y el momento en que ésta tiene lugar (□). El esquema pequeño representa el número de puntos de replicación por célula y en la parte superior se muestra el número de puntos de replicación por cromosoma equivalente (modificado de Jiménez-Sánchez, 1998).

Este parámetro determina a su vez la relación entre el número de orígenes por cada término de replicación,  $2^n$ . La capacidad de modular  $n$  facilita que a una temperatura determinada el periodo C mantenga valores constantes en un amplio intervalo de velocidades de crecimiento. A  $37^\circ\text{C}$  el valor de C se mantiene próximo a 40 minutos cuando  $\tau$  varía entre 20 y 60 minutos y aumenta progresivamente cuando disminuye la velocidad de crecimiento. Así, a altas velocidades de crecimiento el valor de C duplica a  $\tau$ , y pasa a ser un tercio de este parámetro en cultivos creciendo muy lentamente. El periodo D está comprendido entre 15 y 40 minutos para distintas estirpes de *E. coli* K-12 cuando el tiempo de generación oscila entre 25 y 80 minutos (Fig. 1). Tiempos de generación mayores dan lugar a un aumento de D que depende de la estirpe analizada (Bremer, 1996; Churchward *et al.*, 1981).

### 2. La replicación en *Escherichia coli*

*E. coli* posee un cromosoma circular con un tamaño aproximado de 4,7 Mpb que debe ser replicado una vez por cada ciclo celular (Rudd, 1998). La replicación cromosómica en *E. coli*, modelo de la replicación cromosómica bacteriana, ha sido objeto de una investigación intensa.

Todos los elementos requeridos para completar el proceso de replicación tienen que estar disponibles en el inicio; una vez que la replicación se inicia, no se requiere ni síntesis de RNA ni de proteínas y el cromosoma es replicado en su totalidad en ausencia de síntesis de cualquiera de estas dos macromoléculas. Esto significa que todas las proteínas requeridas para el proceso completo tienen que estar presentes en el paso del inicio. Se estima que se requieren al menos 23 proteínas para el inicio y más de 25 para la elongación, cada una con diferente número de copias (Baker y Wickner, 1992; Marians, 1992). Si además incluimos las enzimas requeridas para la síntesis de precursores, entonces hay que añadir de diez a quince proteínas más, que deben funcionar de forma coordinada y corregulada.

Las diferencias estructurales y funcionales que se han encontrado en el proceso de la replicación han provocado que para facilitar su estudio se divida en tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

#### 2.1. Iniciación

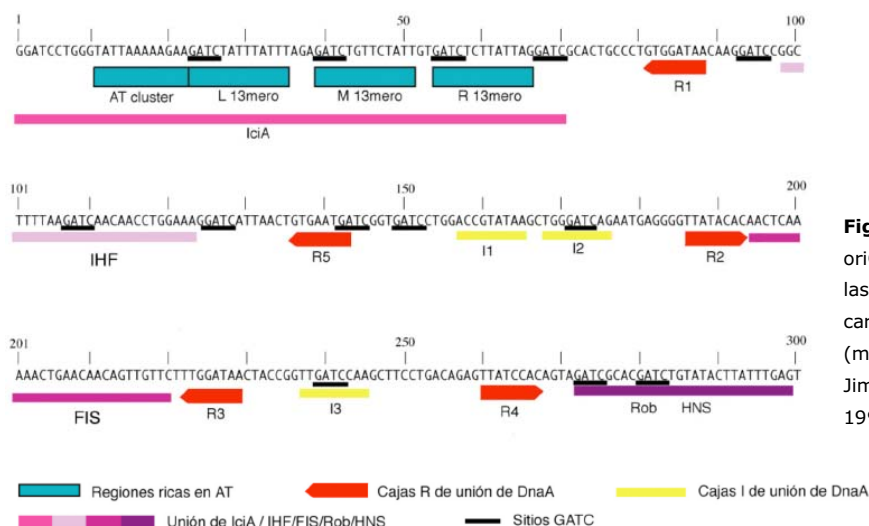
##### 2.1.1. Estructura de *oriC*

La replicación del cromosoma en *E. coli* se inicia en *oriC*, una secuencia de 260 pb localizada en el minuto 84,57 del mapa genético (Langer *et al.*, 1996). La replicación iniciada aquí procede bidireccionalmente hasta terminar en la región *ter*, diametralmente opuesta a *oriC* (Leonard y Grimwade, 2005; Messer, 2002; Paulsson y Chatteraj, 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 trecémeros (L, M y R) que constituyen tres repeticiones directas, cada una de las cuales comienza por un sitio GATC, reconocido por la metilasa Dam; y cinco secuencias de unión de la proteína DnaA (R1, R5, R2, R3 y R4) con la secuencia consenso 5'-TT<sup>A</sup><sub>T</sub>TNCACA (Fig. 2). Además, a lo largo de su secuencia, *oriC* presenta otros nueve sitios GATC y tres secuencias de 6 pb de unión a DnaA-ATP (Messer, 2002; Schaper y Messer, 1995). Recientemente se han descrito otros sitios de unión para la proteína DnaA en *oriC* que difieren en su secuencia consenso a 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 al 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 existe una secuencia diana para la proteína Fis (Fig. 2). La unión de IHF a *oriC* ocasiona un incremento en 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.*, 1998a, b). Fis actúa contrarrestando la acción de IHF. Extractos de Fis inhiben *in vitro* la apertura de *oriC* por DnaA, siendo esta acción suprimida por la adición de IHF (Hiasa y Marians, 1994; Hwang y Kornberg, 1990). En la secuencia mínima de *oriC* se ha localizado entre las secuencias R3 y R4 un sitio de unión de la girasa (Lothar *et al.*, 1984) y 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.*, 1998a; Weigel and 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 la RNasa HI, la topoisomerasa I y la proteína HU (Bahloul *et al.*, 2001; Mizushima *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1984). 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) (Kim *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 1994; Skarstad y Boye, 1993).



**Fig. 2.** Esquema de *oriC*. Se muestran las regiones más características (modificado de Jiménez-Sánchez, 1998).

## Introducción

---

### 2.1.2. Etapas de la iniciación

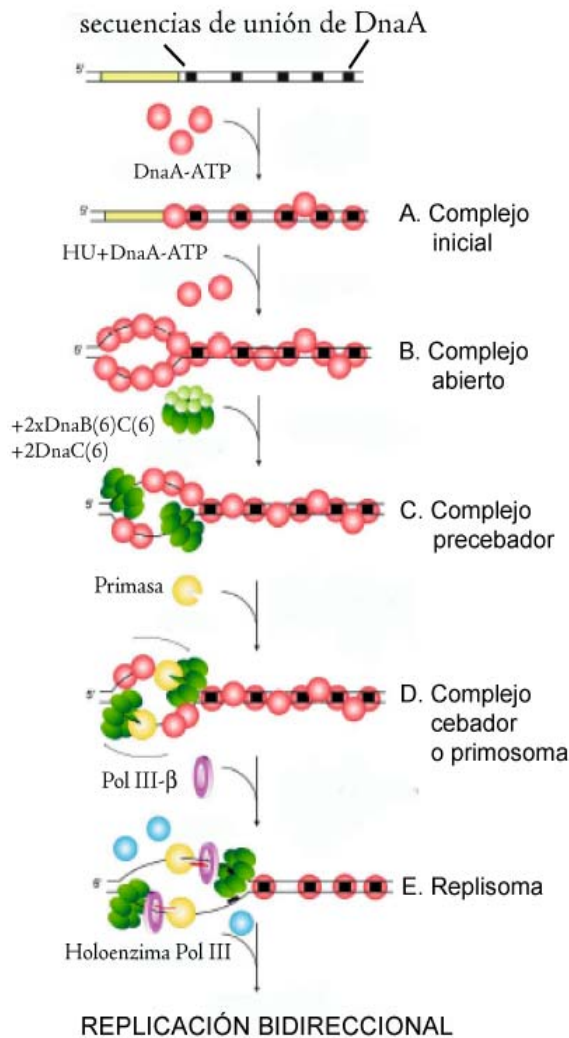
La replicación comienza con la unión altamente cooperativa de la proteína DnaA a *oriC*. DnaA pertenece a la familia de proteínas AAA+, altamente conservada en la escala evolutiva. En todos los organismos, bacterias, archeas y eucariontes, estudiados hasta el momento, la unión de una proteína de características similares a DnaA es necesaria para el inicio de la replicación (Giraldo *et al.*, 2003). DnaA sólo es funcional en el inicio de la replicación unida a ATP, DnaA-ATP (Messer, 2002; Schaper y Messer, 1995).

DnaA se une a cinco secuencias R en *oriC*, formando un complejo nucleoproteínico denominado complejo inicial (Fig. 3-A). 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 establece el inicio de la replicación (Cashel, 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. 3-B) (Kaguni, 1997; Langer *et al.*, 1996; Skarstad y Boye, 1994). 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 Mariani, 1994; Messer, 2002; Wold *et al.*, 1996), mientras que HU e IHF a altas concentraciones de ATP (>2 mM), alta temperatura (38°C) y en presencia de activación transcripcional, estimulan la apertura de *oriC* (Baker y Kornberg, 1988; Dixon y Kornberg, 1984; Krause y Messer, 1999; Messer, 2002; Sekimizu *et al.*, 1988). 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. 3-B).





**Fig. 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 (adaptado de Messer, 2002).

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. 3-C). 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 (Fang *et al.*, 1999; Wahle *et al.*, 1989). 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 denomina complejo cebador o primosoma (Fig. 3-D).

## Introducción

---

### 2.1.3. Regulación del inicio de la replicación cromosómica

Es absolutamente necesario para la célula controlar que el inicio de la replicación sólo se dé una vez por ciclo celular y de forma simultánea en todos los orígenes presentes en la célula. Aunque aún no se sabe con certeza qué determina que la replicación se inicie en el momento adecuado, sí se conocen mecanismos que controlan que no haya inicios fuera del control del ciclo celular.

Uno de ellos se basa en la reducción de la actividad de DnaA. Esta reducción se lleva a cabo mediante un mecanismo conocido como RIDA (Inactivación Reguladora de DnaA) que es dependiente de la subunidad  $\beta$  de la Polimerasa III y de la proteína Hda. La entrada de la subunidad  $\beta$  al final de la iniciación activa la actividad ATPasa intrínseca de DnaA en cooperación con la proteína Hda que posee homología de secuencia con DnaA (Katayama *et al.*, 1998; Katayama y Sekimizu, 1999; Kato y Katayama, 2001; Morigen *et al.*, 2005; Su'etsugu *et al.*, 2004). La inactivación de DnaA por la hidrólisis del ATP que lleva unido es uno de los mecanismos que previene nuevos inicios, ya que mutaciones en DnaA que afectan a la unión o a la hidrólisis de ATP pueden hacer que la proteína sea constitutivamente activa, permitiendo reinicios e incluso provocando letalidad (Katayama y Kornberg, 1994; Katayama y Sekimizu, 1999; Mizushima *et al.*, 1997). Por otra parte, la actividad RIDA no depende de la iniciación por DnaA, por lo que la hidrólisis de ATP no ocurre en la iniciación sino en el avance de las horquillas de replicación (Katayama y Crooke, 1995; Kurokawa *et al.*, 1999). 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 dependiente 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).

Otro mecanismo que controla que la replicación sólo se inicie una vez por ciclo es el secuestro de los orígenes de replicación por la proteína SeqA (Lu *et al.*, 1994). Tras la iniciación de la replicación los orígenes recién replicados son inmediatamente inactivados por el secuestro de los orígenes hemimetilados en la membrana por parte de SeqA. SeqA bloquea la unión de DnaA a los denominados sitios débiles (I2, I3 y R5), pero no afecta a la unión de 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, después de un tercio del ciclo celular, finaliza el periodo de secuestro (Boeneman y Crooke, 2005; Campbell y Kleckner, 1990; Morigen *et al.*, 2005).

La regulación de la cantidad de proteína DnaA capaz de unirse a *oriC* es otro mecanismo de control; existen muchas secuencias en el cromosoma donde puede unirse DnaA y las secuencias *datA* son regiones donde esta proteína se une con mayor afinidad. Existen varias regiones *datA* que están próximas a *oriC* y que por tanto se duplican al poco tiempo de iniciarse la replicación, capturando la proteína DnaA libre y reduciendo así la concentración de DnaA capaz de unirse a *oriC* (Boye *et al.*, 2000; Morigen *et al.*, 2003). Además, el gen *dnaA* también se replica poco después de *oriC* y es secuestrado por SeqA al estar hemimetilado. De este modo se evita la expresión del gen, reduciendo así la cantidad de DnaA presente en la célula (Boye *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1994; Messer, 2002).

### 2.2. Elongación

Una vez formado el punto de replicación, la progresión de la horquilla de replicación en *E.coli* requiere la acción coordinada de cuatro actividades básicas: SSB, DNA polimerasa, DNA helicasa y DNA primasa. La proteína SSB es necesaria para mantener unicasenarias las cadenas de DNA recién abiertas (Krause y Messer, 1999); el cromosoma es replicado por la holoenzima DNA polimerasa III (Johnson y O'Donnell, 2005; Kelman y O'Donnell, 1995); la DnaB helicasa migra por delante de la polimerasa abriendo la doble hélice e interacciona con la holoenzima Pol III (Kim *et al.*, 1996); y la DnaG primasa cataliza la síntesis de los cebadores de los fragmentos de Okazaki e interacciona directamente con la DnaB (Tougu *et al.*, 1994; Tougu y Mariani, 1996a, b). Aunque los polipéptidos que componen la holoenzima polimerasa pueden variar en diferentes bacterias, la composición básica de esta maquinaria de replicación está altamente conservada.

Debido a la estructura antiparalela de la molécula de DNA, la elongación de las nuevas cadenas de DNA crea una asimetría en el punto de replicación por el hecho de que la DNA polimerasa sólo sintetiza en el sentido 5'→3'. Por tanto, una de las cadenas, la directa (*leading*), se puede sintetizar de forma continua, mientras que la complementaria, la cadena inversa (*lagging*), ha de sintetizarse de forma discontinua en fragmentos de unas 2 kb, los denominados fragmentos de Okazaki. Por tanto, la replicación parece requerir dos polimerasas distintas, una con una elevada procesividad (para sintetizar una cadena larga sin separarse del molde) y otra con una procesividad moderada para los fragmentos de Okazaki. Además, como las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis *de novo*, la DNA primasa 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, su asociación con el

## Introducción

---

punto de replicación se realiza por su unión a la helicasa DnaB unida a la cadena de DNA molde de la cadena inversa (Tougu *et al.*, 1994). A este complejo móvil, junto con otras proteínas asociadas se le denomina, *replisoma* o *replitasa*.

Como ya se ha dicho, la enzima que directamente replica el cromosoma en *E. coli* es la DNA polimerasa III. Este complejo proteico está compuesto por diez péptidos que se asocian en tres complejos fundamentales: el núcleo Pol III, la abrazadera deslizante  $\beta$  y el complejo  $\gamma$ , cargador de la abrazadera.

El *Núcleo Pol III* está compuesto por tres subunidades distintas:  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$  (McHenry and Crow, 1979; Studwell-Vaughan and O'Donnell, 1993). La subunidad  $\alpha$ , codificada por el gen *dnaE* tiene la actividad DNA polimerasa en sentido 5'→3', incorporando 8 nucleótidos/segundo (el *Núcleo Pol III* completo incorpora 20 nucleótidos por segundo) (Maki y Kornberg, 1985); la subunidad  $\epsilon$ , codificada por *dnaQ*, tiene actividad exonucleasa 3'→5' y corrige errores en la polimerización. Sin esta subunidad, la holoenzima reduce su procesividad de 50 kb a unas 1,5 kb (Studwell y O'Donnell, 1990); y la subunidad  $\theta$ , codificada por *holE*, que no tiene una función bien conocida salvo una ligera estimulación de la subunidad  $\epsilon$  (Studwell y O'Donnell, 1990). Además, el gen *holE* puede ser delecionado sin graves consecuencias para la célula (Slater *et al.*, 1994).

La *Abrazadera  $\beta$*  es necesaria para que el núcleo de la polimerasa sea una replicasa eficiente. La subunidad  $\beta$  es codificada por *dnaN* y forma una abrazadera que une el núcleo  $\alpha$  al DNA. Incluyendo la subunidad  $\beta$ , el núcleo logra replicar el DNA a una velocidad de unos 800 n/s y alcanza una procesividad de más de 50 kb. Estudios bioquímicos iniciales revelaron que la subunidad  $\beta$  se unía al DNA en forma de anillo abrazando la molécula de DNA (Kong *et al.*, 1992; Stukenberg *et al.*, 1991) y asociándose físicamente al núcleo  $\alpha$  de la polimerasa (LaDuca *et al.*, 1986; Reems *et al.*, 1995; Stukenberg *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 2000)

El *Complejo  $\gamma$* , cargador de la abrazadera de *E. coli*, es un complejo formado por cinco subunidades que se unen con una estequiometría definida,  $\gamma_3\delta_1\delta'_1\chi_1\psi_1$  y que son codificadas por los genes *dnaX* (47.5 kDa), *holA*, *holB*, *holC* y *holD* respectivamente (Jeruzalmi *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2000). El complejo  $\gamma$  proporciona la energía necesaria para unir la abrazadera  $\beta$  al DNA mediante la hidrólisis de ATP. Una vez que carga la subunidad  $\beta$ , se separa del DNA dejando a la abrazadera ensamblada, que a su vez une al núcleo  $\alpha$  con el DNA (Hingorani y O'Donnell, 1998; Stukenberg *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1999). El cargador de la abrazadera asociado con la holoenzima contiene una forma diferente del gen *dnaX*. La subunidad  $\gamma$  se produce mediante un salto ribosomal del marco de lectura del RNAm del gen *dnaX* que causa la terminación casi inmediata de la traslación y produce una proteína de 47.5 kDa (Flower y McHenry, 1986; Tsuchihashi y Kornberg, 1990). El producto completo del gen *dnaX* es la subunidad  $\tau$  (71.1 kDa), que contiene la secuencia  $\gamma$  más un dominio C-terminal de 23.6

kDa ( $\tau_C$ ). El péptido  $\tau_C$ , de 23.6 kDa, consta de dos dominios, IV y V, que unen la DnaB y el núcleo de la Pol III (a través de  $\alpha$ ) respectivamente (Gao y McHenry, 2001a, b). La región  $\tau_C$  no es necesaria para la carga de la abrazadera pero sí es esencial para la viabilidad celular (Blinkova *et al.*, 1993), debido probablemente a su capacidad para organizar el replisoma. Para la síntesis de la cadena directa y de la cadena inversa se necesitan al menos dos polimerasas, por lo que se cree que el replisoma de *E. coli* contiene dos núcleos Pol III unidos a un cargador  $\tau_2\gamma_1\delta\delta'\chi\psi$ . Este macrocomplejo se ensambla con un orden específico y es denominado Pol III\* (o Pol III estrella) (Glover y McHenry, 2000; Onrust *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2000). La abrazadera  $\beta$  se asocia con la Pol III\* de un modo dependiente de ATP para formar la Holoenzima Pol III.

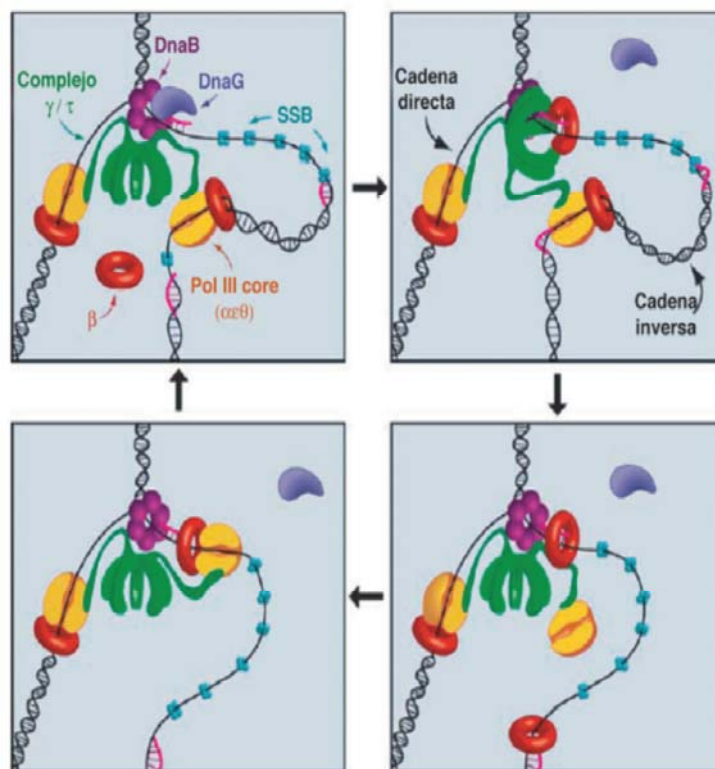
### 2.2.1. Funcionamiento del replisoma

La subunidad  $\tau$  de la holoenzima Pol III no sólo une los núcleos de las polimerasas al cargador, sino que también conecta la holoenzima a la DnaB helicasa. Esta DnaB se acopla a la cadena retardada y va abriendo la doble hélice. A medida que el replisoma avanza, la polimerasa de la cadena directa va extendiendo el DNA de una forma que hasta hace poco tiempo se consideró continua. La replicación de la cadena retardada es un proceso discontinuo, que comienza y se detiene de una forma cíclica cada aproximadamente tres segundos. Cada fragmento de Okazaki tiene que ser iniciado por la primasa, que sintetiza un RNA cebador de unos 10-12 nucleótidos (Zechner *et al.*, 1992a; Zechner *et al.*, 1992b). La acción de la primasa requiere además la interacción con DnaB (Tougu y Mariani, 1996a; Tougu y Mariani, 1996b). Así, la primasa extiende el RNA en dirección opuesta a la apertura de hélice y, presumiblemente, separada de DnaB (Wu *et al.*, 1992). La primasa permanece unida al sitio donde está el RNA cebador a través de su interacción con SSB (Stayton y Kornberg, 1983; Sun y Godson, 1996; Sun y Godson, 1998) y, aunque con el tiempo la primasa se acaba disociando, su separación es acelerada por la subunidad  $\chi$  del complejo cargador de la abrazadera, que también se une a SSB compitiendo con la primasa (Yuzhakov *et al.*, 1999). De este modo, el complejo cargador posiciona a la subunidad  $\beta$  en el cebador para anclar a la polimerasa de la cadena retardada.

Cuando la polimerasa de la cadena retardada extiende un fragmento se origina un bucle porque esta polimerasa está conectada con la de la cadena directa (a través del complejo cargador) y ambas extienden la síntesis de DNA en direcciones opuestas. El fragmento de Okazaki, de 1-3 kb, es rellenado en unos pocos segundos, y en este punto el núcleo de la polimerasa tiene que separarse rápidamente del DNA para comenzar con el siguiente fragmento. La alta procesividad de la Pol III requiere un mecanismo específico para este paso de la separación que desengancha el núcleo de la subunidad  $\beta$ , dejando a la abrazadera detrás del fragmento terminado. El paso de separación sólo

## Introducción

se da en un hueco, asegurándose así la terminación del fragmento, y requiere la acción de la subunidad  $\tau$  (Leu *et al.*, 2003; Li y Marians, 2000; O'Donnell, 1987; Stukenberg *et al.*, 1994). Así, el núcleo de la polimerasa de la cadena retardada queda libre para unirse a una nueva abrazadera  $\beta$  que ya ha sido colocada en el siguiente RNA cebador por el complejo cargador (Fig. 4). Por último, a medida que avanza la replicación de la cadena retardada, los cebadores de RNA son eliminados por la acción combinada de la RNasa HI y de la DNA polimerasa I, que degrada estos cebadores mediante su actividad exonucleasa 5'→3' y sintetiza el DNA que rellena el hueco tras la eliminación del RNA. Finalmente, la DNA ligasa une los fragmentos de DNA (Lehman, 1974; Lehman y Uyemura, 1976; Stukenberg *et al.*, 1994).



**Fig. 4.** Dinámica del replisoma de *Escherichia coli*. A medida que el replisoma avanza, el cargador de la abrazadera carga una abrazadera  $\beta$  en un cebador de RNA (en color rosa) sintetizado por la DnaG primasa (arriba derecha). Cuando la polimerasa de la cadena retardada rellena un hueco, se disocia del DNA y de la abrazadera  $\beta$  (abajo derecha) y comienza de nuevo la acción del cargador de la abrazadera  $\beta$  (abajo izquierda).

Por último, y en relación con la elongación de la replicación, hay que señalar que el cromosoma de *E. coli*, al ser circular, impide que la molécula de DNA tenga libertad de giro a medida que la DnaB helicasa va abriendo la doble hélice. Esto supondría un incremento del superenrollamiento positivo según avanzara la replicación de tal manera que no podría replicarse más de un diez por ciento del cromosoma. Por eso, es necesaria la acción de las DNA topoisomerasas I y II, que mantienen la topología adecuada de la molécula de DNA durante la replicación. La DNA topoisomerasa I, codificada por el gen *topA*, elimina superhélices negativas y relaja la estructura superenrollada habitual del cromosoma bacteriano. Por otro lado, la DNA topoisomerasa II o girasa, compuesta por dos subunidades, GyrA y GyrB, introduce superhélices negativas. La acción combinada de estas topoisomerasas permite la elongación de la replicación (Nollmann *et al.*, 2007). Se ha comprobado además que mutaciones en *topA* o *gyrAB* detienen la replicación y resultan letales, lo que indica la esencialidad de estas proteínas para la replicación (Grompone *et al.*, 2003).

### 2.2.2. Recombinación en la elongación

Contrariamente a lo que se había considerado, en la última década se ha puesto de manifiesto que la replicación del cromosoma bacteriano no es un proceso continuo. La horquilla de replicación, en su avance desde el origen de replicación hasta el término, se puede detener al encontrarse con diferentes obstáculos, como pueden ser lesiones en el DNA, estructuras secundarias en el cromosoma, proteínas unidas al DNA, etc., o por sufrir una alteración o carencia transitoria de algún componente esencial para la replicación (Maisnier-Patin *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2004). Cuando la horquilla de replicación se detiene de esta forma no programada, la replicación tiene que reanudarse en una secuencia distinta a *oriC* para conseguir la replicación completa del genoma antes de la división celular.

El descubrimiento de que la replicación podía ser iniciada de forma independiente de DnaA y en sitios que no eran una secuencia específica de origen abrió un nuevo campo de investigación (Kogoma, 1996; Kogoma, 1997), siendo el destino de las horquillas de replicación paradas objeto de extensos estudios. Se han propuesto un gran número de proteínas que actuarían directamente en horquillas bloqueadas *in vivo*. Estas proteínas participan en procesos de recombinación homóloga, en reparación del DNA y en reanudación de la replicación (Courcelle *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005; Heller y Marians, 2005; Hishida *et al.*, 2004; Jones y Nakai, 2000; Kreuzer, 2005; McGlynn y Lloyd, 2002; Sandler y Marians, 2000).

No existen unas reglas generales que dirijan la actuación de las diferentes proteínas de unión a horquillas bloqueadas; el hecho de que actúen unas proteínas u

## Introducción

---

otras en cada caso concreto o de que una misma proteína pueda desempeñar distintas funciones depende presumiblemente de la causa que provoque la parada y de las condiciones en las que cada horquilla se detiene. Estas cuestiones aún son bastante desconocidas.

### 2.2.3. Procesamiento de las horquillas paradas

La progresión de la horquilla de replicación puede ser alterada por diferentes causas: porque el replisoma se encuentre con una interrupción o hueco en la cadena molde que está copiando (*colapso*), por la presencia de impedimentos físicos o topológicos en el avance del replisoma, o por un deterioro de la procesividad del replisoma debido a una alteración de alguno de sus componentes. En todas estas situaciones se producen horquillas de replicación paradas, que deben ser reanudadas para mantener la viabilidad de la célula, y en estos mecanismos de reanudación de la horquilla de replicación las enzimas de recombinación están directamente implicadas. Cuando la parada de una horquilla de replicación conlleva la formación de un corte de DNA de doble cadena (DSB) las colas de DNA de doble cadena han de ser reincorporadas rápidamente en el cromosoma para que las nucleasas propias de la célula no las degraden, ya que esto conllevaría la degradación del cromosoma y la muerte celular (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Kuzminov, 1995). Esta reincorporación de la cola de DNA de doble cadena al cromosoma se lleva a cabo mediante un proceso de recombinación y es precisamente la formación del intermediario de recombinación el punto clave para la reanudación de la progresión de la horquilla de replicación. Por último, una vez reincorporada la cola de DNA es necesario el ensamblaje de un nuevo replisoma en este punto para que se reanude la replicación. Este montaje de un nuevo complejo de replicación es dirigido por la proteína PriA. Así, se conoce que los mutantes *priA* son defectivos para la recombinación homóloga mediada por RecBCD y RecA y, por tanto, para la reparación mediante recombinación de roturas de doble cadena de DNA. Es decir, la carga de un replisoma mediante el ensamblaje de un primosoma vía PriA es esencial para la conversión de intermediarios de recombinación en productos viables (Kogoma, 1996; Sandler *et al.*, 1996).

Como muestra la figura 5-A, para que una cola de DNA de doble cadena se reincorpore en el cromosoma es necesaria la acción de las principales proteínas de recombinación RecBCD, RecA y RuvABC (Courcelle *et al.*, 2004; Cox, 2001; McGlynn, 2004). El complejo RecBCD es la principal vía de reparación de cortes de DNA de la célula. Es una asociación multienzimática con una actividad helicasa altamente procesiva conferida por las proteínas RecD y, en menor grado, por RecB) y con una actividad exonucleasa de DNA tanto monocatenario como bicatenario (la actividad



exonucleasa es conferida por la proteína RecB). RecBCD puede por tanto degradar una cola de DNA de forma ilimitada (Kuzminov, 1995) o puede iniciar un proceso de recombinación a partir de esa cola de DNA. Para realizar esto último, RecBCD se une a la cola de DNA bicatenario y con su actividad helicasa separa las dos cadenas de DNA hasta encontrar una secuencia Chi (5'-GCTGGTGG-3'), degradando a su vez la cadena de DNA monocatenario 5' libre que se va generando. De este modo, se origina una cola de DNA monocatenario 3' libre donde el RecBCD carga a la proteína de recombinación RecA (Amundsen y Smith, 2003). RecA es una proteína que, entre otras actividades, tiene una función helicasa. Así, unida al DNA hace que este filamento DNA-RecA invada a una molécula de DNA homóloga e intacta, originando un intermediario de recombinación. Este intermediario de recombinación es resuelto por los complejos RuvAB y RuvABC. El complejo RuvAB reconoce y estabiliza el intermediario de recombinación y tiene tanto actividad helicasa como de migración de la banda, pudiendo desplazar el intermediario formado por RecA. Cuando RuvC se une a RuvAB se forma el complejo RuvABC que tiene actividad endonucleasa y que es el que resuelve el intermediario (West, 1997). En los últimos años se han encontrado evidencias de que en la resolución de este intermediario puede estar también implicada la proteína RecG, que al igual que RuvAB es una helicasa de DNA que puede catalizar la migración de la banda del intermediario de recombinación (Lloyd y Sharples, 1993). No se conoce si existe alguna endonucleasa que actúe cuando es RecG la que cataliza la migración de la banda o si también en este caso es RuvABC la encargada de resolver el intermediario de recombinación.

En el caso de que la parada de la horquilla no esté causada por un hueco en la cadena molde (Fig. 5-B), y por tanto no se dé un DSB que origine la formación del intermediario de recombinación, debe haber otros mecanismos para reanudar la progresión de estas horquillas. Estos mecanismos han de generar colas de DNA de doble cadena para, a partir de ellas y como se ha descrito anteriormente, iniciar un proceso de recombinación que concluya con la formación de un intermediario de recombinación donde PriA pueda reensamblar un replisoma. Esto puede realizarse, o bien generando un DSB directamente en la horquilla parada y a partir de él comenzar la formación del intermediario de recombinación (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Michel *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005), o bien generando un intermediario de recombinación sin tener que generar un corte en el DNA, lo que a priori supone un menor riesgo para la célula. Para llevar a cabo esto último se desencadenan una serie de eventos que pueden ser explicados por un modelo que conlleva una reversión de la horquilla de replicación parada para la reanudación de la horquilla: el *RFR* (*Reversión de la Horquilla de Replicación* o *Replication Fork Reversal*). Este modelo fue originalmente propuesto por Higgins y colaboradores (Higgins *et al.*, 1976) y ha sido extensamente demostrado por el laboratorio de Bénédicte Michel (Michel *et al.*, 2004).

## Introducción

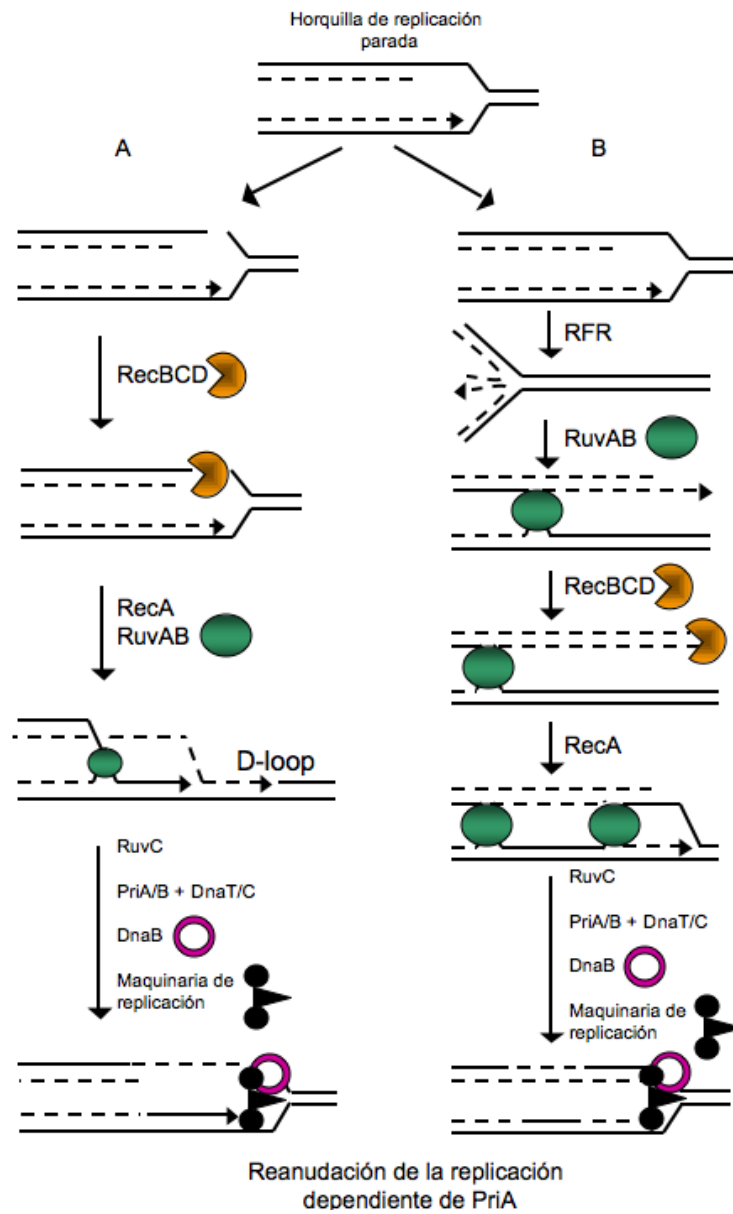
---

Según el modelo de la reversión de la horquilla de replicación, cuando la parada de la horquilla de replicación se debe a deficiencias en proteínas del replisoma esta parada va seguida de una rehibridación de las hebras líder y retardada recién sintetizadas, permitiendo a su vez que las cadenas molde hibriden entre sí, con lo que se origina un intermediario de Holliday que juega un papel crucial en la reanudación de la replicación en bacterias, ya que es un sustrato de varias enzimas de recombinación que ofrecen diferentes vías de resolución de horquillas paradas (Seigneur *et al.*, 1998). La característica de una reversión de la horquilla es la formación de una cola de doble cadena de DNA, sustrato del complejo RecBCD, y la formación de un intermediario de Holliday, sustrato principalmente del complejo RuvABC .

La *RFR* puede promover la reactivación de horquillas de replicación paradas por tres mecanismos: la reincorporación de la horquilla revertida mediante recombinación homóloga; la degradación de la cola de doble cadena por RecBCD y la carga de un primosoma sin necesidad de recombinación; o la regresión de la horquilla que sufrió la reversión mediante la actividad helicasa de RecG. Los tres mecanismos permiten que se reanude la replicación sin que se produzcan roturas en el DNA (Michel *et al.*, 2007).

Una vez reincorporada la cola de DNA de doble cadena original al cromosoma, se produce el ensamblaje de un nuevo primosoma mediado por PriA para que se inicie de nuevo la replicación.

El ensamblaje del primosoma es un proceso ordenado que requiere la acción coordinada de las proteínas PriA, PriB, PriC, DnaT y DnaC. Las proteínas primosomales PriA, PriB, PriC y DnaT se ensamblan para formar un andamio molecular que permite a DnaC cargar a la helicasa DnaB en el DNA. A continuación, a este preprimosoma se une la primasa DnaG, constituyendo así el primosoma completo encargado de sintetizar un cebador. Por último, a esta estructura se une la DNA polimerasa III, con lo que el replisoma queda formado para reanudar la replicación (Sandler y Marians, 2000).

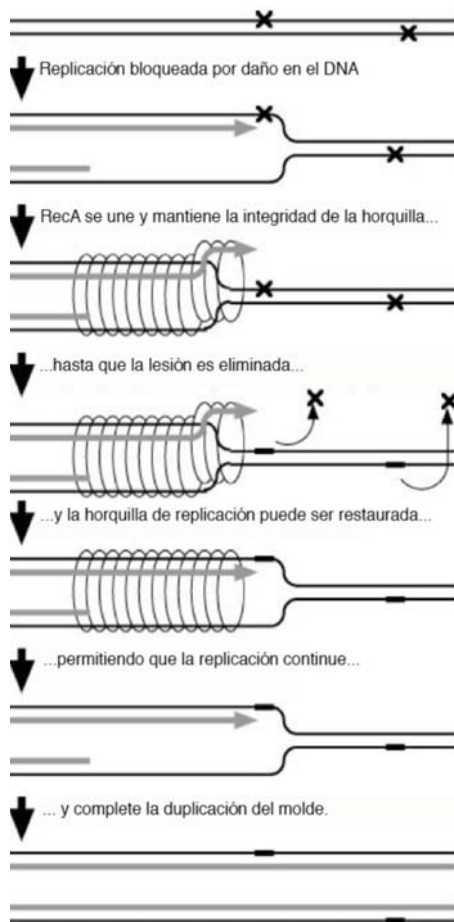


**Fig. 5.** Procesamiento de horquillas paradas con generación de DSBs (A) o sin generación de DSBs (B).

## Introducción

### 2.2.4. Estabilización de las horquillas paradas por RecA

Desde que el modelo de recombinación fue propuesto, hace cuatro décadas, se ha acumulado una gran cantidad de información sobre el complejo fenotipo y la actividad asociados a RecA. Para incorporar estas observaciones y resolver algunas discrepancias se ha propuesto que, además de su implicación en el reordenamiento de cadenas en la recombinación, RecA es requerida para el mantenimiento de la integridad de las horquillas de replicación paradas hasta que éstas puedan continuar la replicación



**Fig. 6.** Modelo general para la recuperación de la replicación promovida por RecA (Courcelle y Hanawalt, 2003).

del DNA después de que la causa que originó la parada haya sido eliminada (Courcelle *et al.*, 1997; Courcelle *et al.*, 1999; Courcelle *et al.*, 2001; Courcelle y Hanawalt, 2003) (Fig. 6). Este papel en el mantenimiento de la integridad de las horquillas paradas hasta que se produzca la reparación es consistente con la observación de que la supervivencia promovida por RecA aumenta sinérgicamente cuando la reparación por escisión es también funcional (Howard-Flanders *et al.*, 1969). Esto significa que un gran número de eventos catalizados por RecA son dependientes de la eliminación de la lesión en el DNA. Este modelo también explica mejor la inhibición de la replicación que ocurre después de la irradiación con UV en todos los tipos celulares, incluyendo la severa falta de recuperación que se da en mutantes *recA* y en mutantes en la reparación por escisión de nucleótidos (Howard-Flanders *et al.*, 1969; Khidhir *et al.*, 1985; Setlow y Carrier, 1964). Además, este modelo concuerda con las observaciones de que altos niveles de recombinación son generalmente perjudiciales en el ciclo asexual. La base para este modelo fue sugerida por los experimentos desarrollados por Horii y Suzuki. Observaron que, después de la irradiación con UV, mutantes *recA* degradan rápidamente la mayor parte de su

genoma (Horii y Suzuki, 1970). Este fenómeno no ocurre en células silvestres ni en mutantes *uvrA*, a pesar de que estos mutantes son igualmente sensibles a UV. También observaron que esta degradación se producía, sobre todo, en cultivos que estaban replicando activamente su DNA cuando se produjo el daño y que la degradación parecía iniciarse en las propias horquillas.

Una segunda línea de evidencia viene de la caracterización de la longitud de los segmentos de DNA que son escindidos y resintetizados (parches) tras el daño con UV. Al poco tiempo del daño, se detectan parches cortos (10-12pb) que correlacionan con el tamaño del parche típico de la reparación por escisión de nucleótidos. Sin embargo, a tiempos que se corresponden con la recuperación firme de la replicación se observan parches de síntesis de DNA mucho más largos. Estos últimos se localizan, sobre todo, cerca de las horquillas de replicación y su aparición es dependiente de RecA y de los genes de la reparación por escisión de nucleótidos (Cooper y Hanawalt, 1972; Cooper, 1982). Tales parches podrían representar la recuperación de la replicación inicial después de la eliminación de las lesiones por el sistema de escisión.

Recientemente se ha identificado un nuevo alelo *RecA* (*recAS25P*) que no complementa el lento crecimiento de células  $\Delta mgsA \Delta recA$  ni la letalidad de *polA12 \Delta recA*, pero que es eficiente en la reparación por recombinación, recombinación homóloga, inducción de SOS y mutagénesis inducida por SOS (Shibata *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que RecA y MgsA, cuyo ortólogo de levaduras (*MGS1*) participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica, son funcionalmente redundantes en el rescate de las horquillas de replicación paradas, y que las funciones en reparación por recombinación y recombinación homóloga de RecA están separadas de su función en el mantenimiento de la estabilidad de la horquilla.

### 2.3. Terminación

La replicación en *E. coli* es bidireccional y avanza desde un único punto de origen en un cromosoma circular, con lo que los dos puntos de replicación terminan de replicar el cromosoma bacteriano en el punto diametralmente opuesto al inicio. En esta región opuesta al inicio están las secuencias terminadoras *Ter* donde se une la proteína terminadora Tus. Los puntos de replicación pueden entrar en esta región de terminación pero no pueden salir. Los lugares *Ter* son diez secuencias de unas 20 pares de bases, localizadas desde el minuto 23 al 48 del mapa genético y agrupadas en dos regiones con 5 sitios cada una. Cada grupo tiene una determinada polaridad, es decir, detiene las horquillas de replicación que proceden en una orientación respecto a *oriC* y no supone ningún impedimento para las horquillas que avanzan con la orientación opuesta. Las horquillas de replicación iniciadas en *oriC* avanzan a un lado y otro hasta encontrarse

## Introducción

---

en las regiones *Ter*. Los 5 sitios *Ter* que afectan a cada horquilla están situados en el lado opuesto al del avance de elongación respecto al punto diametralmente opuesto a *oriC* con lo que el complejo Tus-*Ter* bloquea la replicación de una manera polar (Bussiere y Bastia, 1999; Hill, 1996). Así, la localización de los sitios *Ter* fuerza que las dos horquillas se encuentren en la región opuesta a *oriC* (Bussiere y Bastia, 1999). La inversión de regiones del dominio *Ter* tiene efectos deletéreos, lo que evidencia la importancia de su polaridad (Guijo *et al.*, 2001). Estos lugares *Ter* se han identificado también en plásmidos y en otras bacterias.

Durante muchos años, y a falta de resultados concluyentes que apuntasen en otra dirección, se propuso el modelo de barricada (*roadblock*) para la acción de Tus. Según este modelo, la unión Tus-*Ter* sería una barrera física e inespecífica contra la que chocaría el complejo de replicación deteniéndose así la síntesis de DNA. Se ha comprobado sin embargo que este modelo no era correcto porque, entre otras cosas, al cromosoma de *E. coli* están unidas distintas proteínas, algunas de ellas con alta afinidad, y la horquilla de replicación concluye la replicación del cromosoma hasta el término a pesar de encontrarse con estas uniones DNA-proteína en su avance. Posteriormente se descubrió que el complejo Tus-*Ter* detiene la replicación dependiendo de su dirección a través de una interacción entre Tus y la helicasa DnaB en la que Tus inhibe la actividad helicasa de esta proteína impidiendo que DnaB abra la doble cadena de DNA en las regiones *Ter* e interrumpiendo así la replicación (Mulugu *et al.*, 2001). Además, después se comprobó que Tus no actúa sobre cualquier tipo de helicasa, sino que es específica de las helicasas replicativas como DnaB y de la RNA polimerasa y que sin embargo es incapaz de afectar la acción de la helicasa II y Rep. Tus-*Ter* actúa por tanto como una barrera específica (Bussiere y Bastia, 1999; Mulugu *et al.*, 2001).

Una vez terminada la replicación, los dos cromosomas tienen que segregarse para que las dos células hijas que se originan tras la división posean una dotación genética completa. Las bacterias, aunque no posean un verdadero mecanismo fibrilar de microtúbulos, tienen un verdadero movimiento de reparto de los cromosomas que hace que los nucleoides se localicen en posiciones que corresponden a un cuarto y tres cuartos de la longitud de la célula.

El proceso de la segregación comprende dos fases: la separación física de los cromosomas recién replicados y la partición o movimiento de los cromosomas a extremos opuestos de la célula.

La separación de los cromosomas hermanos requiere que la célula deshaga los círculos concatenados resultantes de la replicación del término (que son desenlazados por la topoisomerasa IV) y que resuelvan los cromosomas dímeros producto de una recombinación homóloga entre los cromosomas, ya que durante toda la replicación se tienen dos copias idénticas del DNA recién sintetizado en una misma estructura, con lo que es fácil suponer un gran número de recombinaciones homólogas. Si el número final

de recombinaciones es impar el resultado final de la replicación sería un cromosoma circular dimérico. La segregación cromosómica tiene una alta eficacia (en una población exponencial aparecen menos del 0,03% de células anucleadas), por lo que antes de la segregación han de resolverse estos dímeros. Esto se consigue con una recombinación específica de sitio catalizada por las proteínas codificadas por los genes *xerC* y *xerD* (Blakely *et al.*, 1991; Blakely *et al.*, 1993; Colloms *et al.*, 1990), que llevan a cabo una recombinación en la secuencia *dif* localizada en el término de la replicación (Cornet *et al.*, 1996; Perals *et al.*, 2000; Recchia *et al.*, 1999; Steiner y Kuempel, 1998; Webb *et al.*, 1998). Tanto los mutantes carentes de proteína *XerC* como los  $\Delta dif$  son deficientes en la segregación cromosómica, y este fenotipo se puede suprimir inhibiendo la recombinación homóloga por una mutación en *recA*.

Una vez que los cromosomas están en su forma monomérica, se produce la partición o la migración de los mismos hacia las regiones un cuarto y tres cuartos de la célula. En el cromosoma bacteriano aún no se ha encontrado ninguna secuencia que pueda ser utilizada como zona centromérica ni ningún lugar de anclaje del cromosoma a alguna molécula requerida para el movimiento cromosómico. Aunque la región *oriC* se une de forma temporal a la membrana, es dudoso que esta unión pueda tener un papel esencial en la partición de los cromosomas ya que los plásmidos con *oriC* se mantienen de forma muy inestable y se pierden con facilidad en una población bacteriana en crecimiento activo. Sin embargo, trabajos recientes parecen indicar que es la propia hiperestructura de replicación la que actúa a modo de centrómero (Riola *et al.*, 2007).

### **3. Nucleósido-difosfato reductasa.**

La NDP reductasa es una enzima que juega un papel clave en la síntesis del DNA, ya que es la única enzima específica requerida directamente para la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos, los precursores directos del DNA. Esta enzima sintetiza los cuatro desoxirribonucleótidos mediante reducción directa de los correspondientes ribonucleótidos. La NDP reductasa es por ello una enzima esencial para la síntesis de DNA y, consecuentemente, para la supervivencia de todos los organismos vivos.

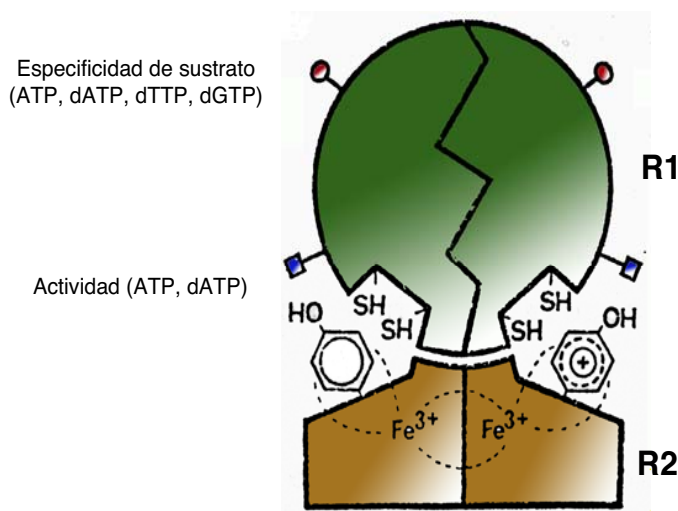
## Introducción

### 3.1. Estructura y clases

La catálisis llevada a cabo por esta enzima es un proceso químicamente complicado y requiere la participación de un radical orgánico libre, que es almacenado por la enzima hasta su utilización (Reichard y Ehrenberg, 1983). La NDP reductasa está formada por dos componentes, uno que genera el radical y otro con la actividad reductasa. El generador del radical no es el mismo para todas las NDP reductasas, mientras que el componente reductasa sí es muy similar en todas ellas.

Se han descrito tres clases principales de reductasas, clasificadas según el generador del radical (Reichard, 1993a):

- **Clase I:** son enzimas dependientes de oxígeno y están presentes en eucariontes, eubacterias y algunos virus.
- **Clase II:** no dependen del oxígeno y están confinadas a bacterias, archaeas y unos pocos eucariontes unicelulares. Tienen una estructura simple ( $\alpha$  o a veces  $\alpha_2$ ) (Panagou *et al.*, 1972; Tsai y Hogenkamp, 1980). Generan el radical a partir de adenosilcobalamina.
- **Clase III:** son enzimas sensibles a oxígeno y están presentes en organismos anaerobios. Son heterotetrámeros  $\alpha_2\beta_2$  similares a los de la clase I (Ollagnier *et al.*, 1996). El polipéptido  $\alpha$ , codificado por el gen *nrdD*, contiene un radical glicilo sensible a oxígeno (Sun y Godson, 1996). La cadena  $\beta_2$ , codificada por el gen *nrdG*, contiene un grupo hierro-azufre que, junto con S-adenosilmetionina, puede generar el radical glicilo (Ollagnier *et al.*, 1996).



**Fig. 7.** Esquema de la enzima NDP reductasa propuesto por Thelander y Reichard (Thelander y Reichard, 1979). Se muestran los sitios de regulación de la especificidad de sustrato y de actividad. El centro catalítico de la enzima se sitúa entre R1 y R2 con los grupos sulfhidrilos, los radicales tirosilos y su conexión a los átomos de hierro.



La Clase I ha sido la que más se ha estudiado ya que fue la primera que se descubrió y a este grupo pertenece la NDP reductasa de *Escherichia coli* (Fig. 7), con la que se han llevado a cabo la mayoría de los trabajos (Ekberg *et al.*, 2003; Eklund *et al.*, 2001; Fontecave *et al.*, 1992; Nordlund y Eklund, 1993). *E. coli* contiene genes que codifican tres clases de NDP reductasas, la clase Ia y la clase Ib (subdivisiones de la clase I) y la clase III. En *E. coli*, la clase Ia está formada por dos proteínas homodiméricas, R1 ( $\alpha_2$ ), codificada por el alelo *nrdA*, y R2 ( $\beta_2$ ), codificada por el alelo *nrdB* (Fontecave *et al.*, 1992). El operón de la clase Ib consta de cuatro genes, *nrdE* y *nrdF* codifican las subunidades NrdE ( $\alpha$ ) y NrdF ( $\beta$ ), mientras que *nrdH* codifica a NrdH, una proteína de alrededor de 9 KDa que actúa como donador de electrones específico, y *nrdI* codifica a NrdI, una proteína de 15 KDa, aproximadamente, cuya función permanece desconocida. La NDP Ia y la NDP Ib tienen una identidad de secuencia limitada, pero comparten muchas propiedades catalíticas (Jordan *et al.*, 1994). Ambas requieren oxígeno para la generación del radical tirosilo estabilizado por un centro de hierro, que transfiere el radical a una cisteína en el centro activo de NrdA o NrdE.

El crecimiento aeróbico de *E. coli* depende de la NDP Ia (Jordan *et al.*, 1996). La clase aeróbica Ib no es esencial para el crecimiento, se expresa pobremente en condiciones normales, y no puede realizar el papel de la clase Ia a menos que sea sobreexpresada (Jordan *et al.*, 1994). Monje-Casas y colaboradores ha sugerido que el papel fisiológico de la clase Ib es principalmente el de respuesta a estrés oxidativo, que causa daño en el DNA (Monje-Casas *et al.*, 2001).

El crecimiento de *E. coli* en condiciones anaeróbicas requiere una NDP de clase III funcional (Garriga *et al.*, 1996). Cuando *E. coli* es cambiada de condiciones aeróbicas a microaerófilas o anaeróbicas, la expresión de *nrdAB* es reprimida y se induce la de *nrdDG*. NrdAB puede permitir el crecimiento en ausencia de NrdDG cuando existen trazas de oxígeno, pero las células crecen pobremente, tienen una morfología anormal y exhiben una acusada filamentación. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas estrictas, el crecimiento depende de una NrdDG funcional (Torrents *et al.*, 2000).

### 3.2. Acción catalítica y control alostérico

En el polipéptido  $\alpha$  es donde se lleva a cabo la catálisis enzimática y donde se suceden interacciones alostéricas. Dependiendo de la configuración alostérica, uno de los cuatro ribonucleótidos se une al centro catalítico (Nordlund y Reichard, 2006; Reichard, 1993b; Reichard, 1997). Además, la reacción enzimática requiere un donador de electrones externo. Estos donadores son pequeñas proteínas (tioredoxinas y

## Introducción

---

glutaredoxinas) con actividad redox (Holmgren y Bjornstedt, 1995; Nordlund y Reichard, 2006).

La unión de uno de los sustratos al sitio activo de la enzima reducida marca el comienzo de la transferencia del radical desde el residuo de tirosina, unido a los dos átomos de hierro oxidados en R2, hasta el centro activo en R1. El radical se transfiere a R1, a una cisteína que toma el hidrógeno del carbono 3' de la ribosa del sustrato, pasando el radical a dicho sustrato. Del carbono 2' se libera el grupo OH quedándose así con el radical y protonado. Entonces aparecen otras dos cisteínas del sitio activo cuyos grupos tioles reducen el carbono 2' de la ribosa gracias al potencial redox de los dos residuos que quedan unidos por puentes disulfuro. Finalmente el átomo de hidrógeno de la primera cisteína vuelve al carbono 3' y el sustrato pasa a ser producto reducido (Chang *et al.*, 2004; Eklund *et al.*, 2001; Nordlund y Reichard, 2006). El reductor final del sistema es el NADPH, que pasa sus electrones a las cisteínas que habían quedado oxidadas y unidas por puentes disulfuro. La enzima queda de este modo preparada para la entrada de un nuevo sustrato (Eklund *et al.*, 2001; Nordlund y Reichard, 2006).

Por otro lado, la NDP reductasa presenta especificidad de sustrato. Para satisfacer los requerimientos de la síntesis de DNA se tienen que producir los cuatro desoxirribonucleótidos. Así, la enzima tiene en cada monómero de R1 dos sitios de control alostérico, uno de especificidad de sustrato y otro de actividad; la unión de un desoxirribonucleótido trifosfato concreto hace que el sitio catalítico se adapte para la reducción de un sustrato específico (Brown y Reichard, 1969). Además, la unión de dATP a un segundo sitio alostérico inhibe la actividad enzimática (Reichard, 1993a).

### 3.3. Regulación transcripcional

La fina regulación de la actividad de la NDP reductasa y el tamaño limitado del pool de nucleótidos reflejan dos hechos importantes: (i) un *pool* mal balanceado resulta en anomalías en la replicación y mutaciones (Gon *et al.*, 2006; Mathews, 2006; Stubbe, 2000; Wheeler *et al.*, 2005), y (ii) la velocidad de la horquilla de replicación depende, entre otras cosas, de la cantidad de NDP reductasa activa (Manwaring y Fuchs, 1979; Wheeler *et al.*, 2005). Así, el control de la actividad de la NDP reductasa juega un importante papel no sólo en la regulación de la cinética de la replicación sino también en el mantenimiento de la integridad del genoma.

La expresión de *nrdAB* y el ciclo de replicación están coordinados a través de un mecanismo de retroalimentación (Hanke y Fuchs, 1984). La inhibición de la replicación, tanto a nivel de la elongación como de la iniciación, supone un incremento en la síntesis de NDP reductasa. La transcripción del operón *nrdAB* coincide con el inicio de

la replicación (Sun y Fuchs, 1992; Sun et al, 1994; Jacobson y Fuchs, 1998a). Así, los factores que regulan la iniciación bajo condiciones normales y en condiciones de estrés parecen estar comunicados con los factores que regulan la expresión de *nrdAB* (Herrick y Sclavi, 2007).



**Fig. 8.** Promotor de *nrdAB*. Se muestran las regiones más características (modificado de Herrick y Sclavi, 2006)

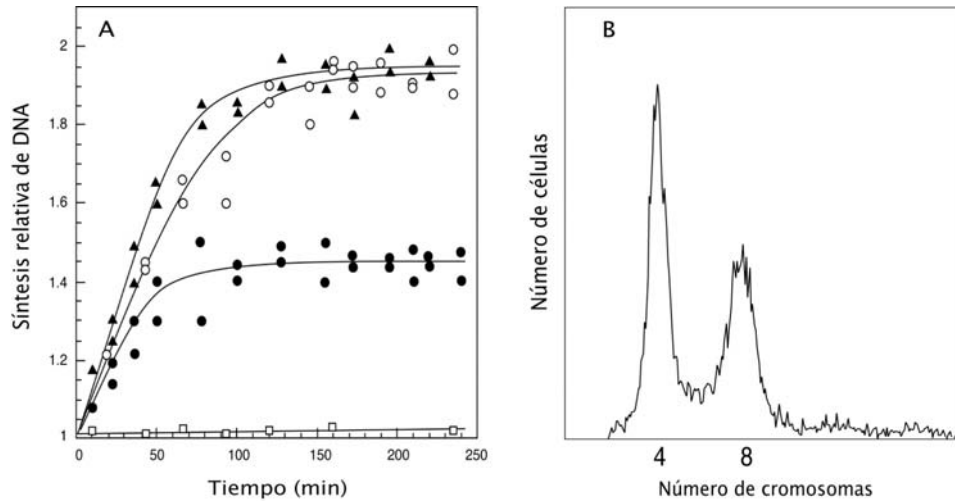
La proteína iniciadora DnaA interactúa con el promotor de *nrdAB*. Varios autores proponen que esta interacción posee un efecto positivo sobre la expresión de *nrdAB* (Augustin et al., 1994; Jacobson y Fuchs, 1998b). Sin embargo, recientemente Gon y colaboradores han propuesto un papel regulador negativo de DnaA-ATP sobre la expresión de *nrdAB* (Gon et al., 2006). Según Herrick y Sclavi, estas diferentes observaciones podrían ser reconciliadas si el modo de regulación de *nrdAB* por DnaA fuera dependiente de los niveles celulares de DnaA-ATP. En este papel dual, bajos niveles de DnaA-ATP activarían la expresión de *nrdAB* mientras niveles altos la reprimirían (Herrick y Sclavi, 2007).

Por otra parte, existen otros factores que influyen la expresión de *nrdAB* (Fig. 8). Se ha descrito que tanto FIS como LciA regulan positivamente la expresión de *nrdAB* (Augustin et al., 1994; Han et al., 1998), y se han encontrado posibles sitios de unión a IHF en las secuencias aguas arriba del promotor. Recientemente se ha identificado un nuevo regulador de la transcripción de los genes de la NDP reductasa, la proteína NrdR (Borovok et al., 2004; Rodionov y Gelfand, 2005). En *Streptomyces coelicolor* NrdR ha demostrado ser un fuerte represor de la expresión de la NDP de clase I y une a una DNA de una manera dependiente de nucleótidos (Borovok et al., 2004; Grimberg et al., 2006). Sin embargo, Torrents y colaboradores han demostrado que, aunque NrdR se une a los promotores de los genes de las tres NDP reductasas presentes en *E. coli*, la represión que ejerce sobre *nrdAB* es mucho menor que la que ejerce sobre *nrdHIEF* (Torrents et al. 2007), lo que parece indicar que este factor está más implicado en la regulación de la expresión de la NDP reductasa de clase IIb que en el control de la transcripción de *nrdAB* a lo largo del ciclo.

### 3.4. La mutación *nrdA101*

La mutación en la NDP reductasa mejor conocida en *E. coli* es la mutación *nrdA101*, que codifica una subunidad R1 termosensible. Estudios realizados en nuestro laboratorio establecieron los parámetros del ciclo celular de una estirpe con el alelo *nrdA101* y de su estirpe isogénica *nrdA<sup>+</sup>* creciendo a 30°C (Guzmán *et al.*, 2002). En ellos se muestra que el mutante *nrdA101* tiene un periodo C de 154 minutos a 30°C, siendo éste de 74 minutos para la estirpe silvestre. Estos resultados indican que el mutante *nrdA101* tiene un tiempo de elongación de la replicación al menos dos veces mayor que el silvestre, incluso a la temperatura permisiva. Esto no sólo es debido a la menor actividad de la enzima codificada por el alelo *nrdA101*, sino también a un aumento de las paradas de la replicación incluso a 30°C (Guarino *et al.*, 2007a). Esta deficiencia causa en el mutante un mayor solapamiento de ciclos de replicación que en la estirpe silvestre. En la figura 9 se detalla el análisis de la síntesis de DNA de esta estirpe *nrdA101*.

Cuando el cultivo es incubado a 42°C, la acumulación de radiactividad es del 45%. Esta síntesis de DNA a la temperatura restrictiva es el resultado de la inhibición de la NDP reductasa por la temperatura tras un periodo de tiempo en el que la enzima mutada sigue siendo activa. La inactivación de la enzima con hidroxiiurea, que inhibe específicamente el centro activo de la NDP reductasa, demuestra que el pool de nucleótidos que tiene la célula no es suficiente para mantener esta síntesis residual a 42°C, puesto que la síntesis de DNA se detiene instantáneamente. El hecho de que la síntesis de DNA continúe tras el cambio a 42°C hasta permitir una acumulación del 45%, refleja un periodo de termorresistencia de la enzima de 40-50 minutos con una actividad normal a 42°C. Dado que la mutación *nrdA101* codifica un producto que es destruido *in vitro* en menos de 2 minutos, este resultado sugiere que la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* podría estar protegida de la inactivación térmica por la hiperestructura de replicación durante este periodo de tiempo (Guzmán *et al.*, 2002).



**Fig. 9.** A. Síntesis de DNA de JS1018 (*nrdA101*) creciendo en medio mínimo suplementado con casaminoácidos a 30°C. A tiempo cero, distintas alícuotas del cultivo se trataron con rifampicina (○), con hidroxíurea (□) o con un cambio a 42°C con (▲) o sin rifampicina (●). B. Citometría de flujo de JS1018 tras cuatro horas de incubación a 42°C en presencia de rifampicina y cefalexina.

Se podría pensar que la parada de las horquillas de replicación en el mutante *nrdA101* se debe a una simple inactivación de la NDP reductasa a pesar del periodo de termorresistencia observado. Sin embargo, la incubación del mutante *nrdA101* a 42°C junto con la adición de rifampicina (que inhibe síntesis de RNA y las nuevas iniciaciones de la replicación), permite que todas las horquillas de replicación sean funcionales hasta acabar la replicación del cromosoma completo tanto a 30°C como a 42°C (Fig. 9). En ausencia de síntesis de RNA todas las horquillas de replicación activas en el momento del cambio de temperatura continúan la replicación hasta llegar al término originando cromosomas totalmente replicados (Guzmán et al., 2002).

Estos resultados son la base para establecer el modelo que sugiere una protección de la NDP reductasa por la hiperestructura de replicación, que estaría formada por el replisoma y el complejo de biosíntesis de nucleótidos propuesto por Mathews y colaboradores (Guzmán et al., 2002).

### 4. Hiperestructura de replicación

Actualmente, se está dedicando un gran esfuerzo en el estudio de las conexiones entre los constituyentes de las células, como revela la aparición de términos como transcriptoma, proteoma, metaboloma e, incluso, interactoma. A lo largo de las últimas décadas se ha revelado la existencia de un nivel estructural importante en bacterias. Este avance en nuestro conocimiento ha generado la propuesta de que existe un nivel de organización intermedio entre las proteínas y la célula en sí. Éste es el nivel de las hiperestructuras (Norris *et al.*, 1999). Una hiperestructura es más que lo que normalmente se conoce como un “ensamblaje supramolecular” o una “maquinaria molecular” o incluso un “módulo” (Alberts, 1998; Hartwell *et al.*, 1999). En esta nueva hipótesis, las hiperestructuras son ensamblajes espacialmente extendidos de moléculas y macromoléculas que dirigen moléculas señalizadoras, que interactúan unas con otras y que determinan el fenotipo de la célula (Norris *et al.*, 2007a; Norris *et al.*, 2007b).

El inicio de la replicación es un proceso que requiere la interacción de varias proteínas entre sí y con *oriC*. El resultado es la formación de una hiperestructura de iniciación que contiene diferentes tipos de proteínas y la región cromosómica de *oriC*. Además, la participación de la membrana en la iniciación de la replicación es una cuestión antigua (Firshein, 1989) y se ha especulado que esta hiperestructura de iniciación puede contener cardiolipinas, ya que la transformación de DnaA-ADP a DnaA-ATP *in vitro* requiere fosfolípidos ácidos en una bicapa fluida (Boeneman y Crooke, 2005; Castuma *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005).

Posteriormente, la hiperestructura de iniciación se convierte en una hiperestructura de replicación completa que contiene el complejo de polimerización del DNA con la subunidad  $\beta$  cargadora de la polimerasa, primasas, helicasas y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla.

Las replications que están en marcha requieren el suministro de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) en una cantidad estimada de unos 3.000 nucleótidos por segundo, pero, a pesar de esta elevada tasa, en la célula sólo existen nucleótidos como para permitir medio minuto de síntesis de DNA. Conjuntamente, la polimerasa de *E. coli* tiene valores de  $K_m$  bastante altos, con lo que se necesita tener unos niveles de dNTPs muy altos en los sitios de replicación para poder funcionar a su máxima velocidad (Mathews, 1976; Mathews y Sinha, 1982). En otras palabras, los dNTPs no pueden llegar al lugar donde van a ser utilizados a la velocidad a la que se necesitan simplemente por un proceso de difusión (Ji y Mathews, 1991). Por tanto, no es sorprendente que haya sugerido, tanto en eucariontes como en procariontes, la presencia de la NDP reductasa en la hiperestructura de replicación (Guzmán *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 1988). En 1993 se descubrió que la NDP reductasa del virus T4 interactúa, a través de la subunidad R2, con la proteína DNAP34, codificada por el

gen p34 de T4 y que es una proteína de unión a DNA de cadena sencilla (equivalente a SSB de *E. coli*) que se localizaba en los lugares donde se estaba llevando a cabo la replicación. El bloqueo de esta proteína inhibe la síntesis de DNA, sugiriendo que DNAP34 participaba en la replicación (Chase y Williams, 1986; Davis y Mathews, 1993). Así, se demostró la asociación de hasta diez proteínas implicadas en la síntesis de dNTPs (Wheeler et al., 1992; Wheeler et al., 1996), y por la masa molecular de los complejos aislados se dedujo que cada complejo contendría no más de dos copias de cada enzima y que era posible la existencia de varios complejos de síntesis de dNTPs por cada punto de replicación para mantener concentraciones suficientes de dNTPs para mantener la replicación (Wheeler et al., 1996). Estudios recientes también con T4 han identificado interacciones de varias proteínas del complejo de síntesis de nucleótidos con el DNA, siendo estas interacciones dependientes de la presencia de una proteína gp32 intacta (Kim et al., 2005b). Una de las proteínas a las que hace referencia este trabajo es la NDP reductasa.

Estudios realizados por nuestro grupo, utilizando un mutante de *E. coli* que produce una NDP reductasa termolábil, demostraron que *in vivo* esta enzima debe estar protegida de la inactivación térmica por su inclusión en alguna estructura de orden superior y que su alteración repercute en una merma de la procesividad del complejo de replicación (Guarino et al., 2007a; Guzmán et al., 2002; Guzmán et al., 2003).

Dingman propuso originalmente que, en una replicación bidireccional, las dos horquillas de replicación permanecen juntas en un complejo relativamente estático mientras que el DNA va pasando a través de ese complejo (Dingman, 1974); un cuarto de siglo después, se encontraron evidencias que apoyaban esta propuesta, y este complejo se denominó "factoría de replicación" (Lemon y Grossman, 1998). Ahora parece que la relación exacta espacial y funcional de las dos horquillas entre sí es incierta y que las interacciones que sostienen a las horquillas dentro de la factoría/hiperestructura son más dinámicas que estáticas (Breier et al., 2005; Migocki et al., 2004). La imagen de una hiperestructura dinámica que depende de su funcionamiento está de acuerdo con el desensamblaje que sucede en la hiperestructura en distintas situaciones, como pueden ser cuando la horquilla de replicación se encuentra con distintas barreras que provocan la parada de la replicación antes de que la horquilla llegue al término (como es el caso de daño en el DNA o de proteínas que bloquean la replicación y fuerzan una reanudación mediante el reensamblaje de la maquinaria de replicación con ayuda de enzimas de recombinación) (Courcelle et al., 2004; McGlynn, 2004), cuando el aporte de nucleótidos es limitado y cuando el gen de la timidilato sintasa está mutado (Molina y Skarstad, 2004).

Por otra parte, el DNA recién replicado permanece hemimetilado de forma temporal. SeqA, una proteína oligomérica, se une preferentemente a sitios GATC hemimetilados (de los que hay 11 en la región del origen de replicación) para secuestrar

## Introducción

---

éstas y otras regiones (como por ejemplo el gen *dnaA*) y prevenir múltiples reinicios. Existen 19.130 secuencias GATC en el cromosoma de *E. coli* que flanquean genes implicados en la replicación, en la reparación y en la estructura del DNA, así como en *oriC*. Estos genes incluyen *dnaA*, *dnaC*, *dnaE*, *gyrA*, *topA*, *hepA*, *lhr*, *parE*, *mukB*, *recB*, *recD* y *uvrA*, así como los genes implicados en la síntesis de precursores del DNA, purinas y pirimidinas, *nrdA*, *purA*, *purF*, *purL*, *pyrD* y *pyrI* (Norris *et al.*, 2000). Este hecho ha generado la idea de la existencia de una hiperestructura de secuestro/replicación basada en SeqA que englobaría no sólo enzimas responsables de la síntesis de DNA, sino también enzimas encargadas de sintetizar y suministrar los precursores del DNA, enzimas responsables de la reparación y de recombinación, los genes que codifican la mayoría de estas enzimas y regiones específicas de membrana (Norris *et al.*, 2000). En este modelo de replicación, la dinámica de la hiperestructura de secuestro definiría el periodo durante el que *oriC* está protegido de nuevos inicios.

La diferenciación entre hiperestructura de replicación e hiperestructura de secuestro probablemente corresponde al momento en el que *oriC* vuelve a estar disponible para la iniciación. Una posible explicación para esto es la producción continua de nuevas secuencias metiladas y hemimetiladas GATC controladas por SeqA, que debilitarían la hiperestructura de secuestro gigante; en el caso de cultivos de *E. coli* sincronizados para la replicación cromosómica, hay evidencias de que los foci de SeqA cambian en su composición cuando la replicación tiene lugar (Yamazoe *et al.*, 2005). Otra posibilidad complementaria estaría relacionada con la existencia de una maquinaria de segregación que podría ayudar a separar los orígenes y la hiperestructura de secuestro (Riola *et al.*, 2007).



*Objetivos*



El alelo mutante *nrdA101* codifica una NDP reductasa termosensible que le permite una síntesis residual de DNA a 42°C *in vivo* de un 45% (Guzmán *et al.*, 2002). Éste fenotipo es inesperado puesto que *in vitro* se inactiva en tan solo 2 minutos (Fuchs *et al.*, 1972) y la inactivación química de la NDP reductasa por adición de hidroxurea detiene instantáneamente la síntesis de DNA (Guzmán *et al.*, 2002). Una condición de excepcional termorresistencia de la replicación en el mutante *nrdA101* es la que lleva a cabo al ser incubado a 42°C en presencia de rifampicina, antibiótico que inactiva específicamente a la RNA polimerasa inhibiendo la síntesis de RNA, y consecuentemente la iniciación de nuevas rondas de replicación. Esta condición permite al mutante *nrdA101* finalizar todas las replicaciones en marcha, dando lugar a cromosomas completos (Guzmán *et al.*, 2002).

Trabajos previos de este laboratorio han demostrado que un mutante *nrdA101* muestra una disminución de la procesividad de la replicación y han puesto de manifiesto la implicación de la maquinaria de recombinación en la resolución de los eventos que pueden dificultar el avance de las horquillas de replicación a temperatura permisiva (Guarino *et al.*, 2007a)

Los objetivos principales de este trabajo han sido:

- Analizar la posible implicación de las enzimas de recombinación en la replicación cromosómica de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva en presencia de rifampicina.
- Esclarecer la causa de que un mutante *nrdA101* posea la capacidad de llevar a cabo la replicación de cromosomas completos a temperatura restrictiva en presencia de rifampicina.

## *Objetivos*

---

*Materials*



## 1. Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas usadas en este trabajo son derivadas de *Escherichia coli* K-12 y se recogen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Estirpes de *E. coli* K-12 empleadas en este trabajo.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Origen</b>
MG1655dnaC2	<i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Dr. Morigen
JC12390	<i>F thr-1 leuB6 Δ(gtp-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 rfbD1 mgl-51 kdgK51 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 dnaA508 tnaA::Tn10</i>	Dr. Steven Sandler
JRW27	<i>thr leu thi dnaA46 tnaA::Tn10</i>	Dr. J. R. Walker
SMG275	<i>dnaAT174P yidX::miniTn10 Δ(ara-leu)7697 araD139 ΔlacX74 galE galK rpsL phoR Δ(phoA)Pvull ΔmalF3 thi</i>	Dra. Kirsten Skarstard
SS1750	<i>metE46 trp-3 his-4 thi-1 galK2 lacY1 ó lacZ4 mtl-1 ara-9 tsx-3 ton-1 rps-8 ó rps-9 supE44 λ: dnaA5 tnaA::Tn10</i>	Dr. Steven Sandler
JS1018	<i>nrdA101 thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl su</i>	Este laboratorio
JS627	JS1018 <i>Δ(recA-sr)::Tn10</i>	Este laboratorio
JS628	JS1018 <i>recB268::Tn10</i>	Este laboratorio
JS704	JS1018 <i>ΔruvABC::Cm</i>	Este laboratorio
JS705	JS1018 <i>ΔruvABC::Cm recB268::Tn10</i>	Este laboratorio
JS767	JS1018 <i>recG263(::Km)</i>	Este laboratorio
JS875	JS1018 <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA46 tnaA::Tn10</i> de JRW27 a JS1018
JS877	JS875 / pDnaA116	Transformación de JS875 con pDnaA116

## Materialles

---

JS881	JS627 / pRecA	Transformación de JS627 con pRecA
JS882	JS627 / pRecAS25P	Transformación de JS627 con pRecAS25P
JS912	JS1018 <i>dnaAT174P yidX::miniTn10</i>	Transducción de <i>dnaAT174P yidX::miniTn10</i> de SMG275 a JS1018
JS944	JS1018 <i>dnaA5 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA5 tnaA::Tn10</i> de SS1750 a JS1018
JS945	JS1018 <i>dnaA508 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA508 tnaA::Tn10</i> de JC12390 a JS1018
JS948	JS1018 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a JS1018
JK607	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5</i>	Este laboratorio
JK625	JK607 $\Delta(\text{recA-srl})::Tn10$	Este laboratorio
JK626	JK607 <i>recB268::Tn10</i>	Este laboratorio
JK706	JK607 $\Delta\text{ruvABC}::Cm$	Este laboratorio
JK707	JK706 <i>recB268::Tn10</i>	Este laboratorio
JK876	JK607 <i>dnaA46 tna::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA46 tna::Tn10</i> de JRW27 a JK607
JK878	JK876 / pDnaA116	Transformación de JK876 con pDnaA116
JK913	JK607 <i>dnaAT174P yidX::miniTn10</i>	Transducción de <i>dnaAT174P yidX::miniTn10</i> de SMG275 a JK607
JK915	JK607 <i>dnaA5 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA5 tnaA::Tn10</i> de SS1750 a JK607
JK916	JK607 <i>dnaA508 tnaA::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaA508 tnaA::Tn10</i> de JC12390 a JK607

Para facilitar la lectura de este trabajo, al nombrar las distintas estirpes se especificarán en cursiva los genes en los que cada estirpe presenta mutaciones relevantes. Los genes nombrados en cada caso presentan las mutaciones señaladas en la tabla 1.



## **2. Fagos**

El fago P1vir fue obtenido de este laboratorio. Como es incapaz de lisogenizar a la bacteria huésped se emplea frecuentemente para realizar transducción generalizada. Permite la construcción de estirpes y cartografiar genes que se encuentren a menos de 2 minutos en el cromosoma.

## **3. Plásmidos**

### **3.1. *pDnaA116***

El plásmido pDnaA116 empleado en este trabajo fue enviado por la Dra. J. Zyskind y es un derivado de pLex5BA (Krause *et al.*, 1997) que lleva clonado el gen *dnaA* bajo el control del promotor Bujard ( $P_{A1-03/04}$ ) (Bujard *et al.*, 1983). La adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) permite la expresión de los genes clonados a continuación de este promotor. El IPTG se preparó en agua estéril a una concentración 50 mM y se utilizó a una concentración final 500  $\mu$ M.

### **3.2. *pRecA* y *pRecAS25P***

Los plásmidos pRecA y pRecAS25P (Shibata *et al.*, 2005) fueron enviados por el Dr. Takashi Hishida y son derivados de pT7-7 (Tabor y Richardson, 1985) que llevan clonado el gen *recA* y su alelo mutante *recAS25P*, respectivamente bajo el control del promotor del fago T7.

## **4. Productos químicos**

Todos los productos químicos utilizados, salvo aquellos en los que se indica su procedencia, fueron suministrados por la compañía Sigma Chemical. Las sales y los azúcares, que se obtuvieron de Panreac.

## *Materiales*

---

### **4.1. Antibióticos**

**Ampicilina (Ap).** Preparada a 100 mg/ml en agua y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a 100  $\mu\text{g/ml}$ .

**Cefalexina (Cfx).** Preparada a 10 mg/ml en agua en el momento de su uso. Se utilizó a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

**Cloranfenicol (Cm).** Preparado a 5 mg/ml en etanol:agua (1:1) y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a 5  $\mu\text{g/ml}$  en placa y a 200  $\mu\text{g/ml}$  en medio líquido.

**Hidroxiurea (Hu).** Preparada 1 M en el medio de crecimiento. Se utilizó a 100 mM.

**Kanamicina (Km).** Preparada a 25 mg/ml en agua y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a 25  $\mu\text{g/ml}$ .

**Rifampicina (Rif).** Preparada a 25 mg/ml en metanol en el momento de su uso. Se utilizó a 150  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tetraciclina (Tc).** Preparada a 10 mg/ml en etanol:agua (1:1) y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### **4.2. Productos radiactivos**

**Timidina-(metil- $^3\text{H}$ ) ( $^3\text{H-TdR}$ ).** Suministrada con una actividad específica de 20 Ci/mmol y a una concentración de 1 mCi/ml en una solución de etanol:agua (7:3). Se utilizó a una concentración de 1  $\mu\text{Ci/ml}$  para experimentos de seguimiento de la síntesis de DNA y a 5  $\mu\text{Ci/ml}$  para marcar el DNA cuando se querían medir roturas del cromosoma. Fue suministrada por ICN Radiochemicals.

**Desoxiadenosina trifosfato-( $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ) ( $^{33}\text{P-dATP}$ ).** Suministrada con una actividad específica de 2973 Ci/mmol y a una concentración de 10 mCi/ml en una solución acuosa. Se utilizó a una concentración de 0,3 mCi/ml para el marcaje de las sondas utilizadas en Southern blot. Fue suministrada por Hartmann Analytic.

### 4.3. Soluciones y tampones

#### 4.3.1. Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico

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

**Solución EDTA-Tritón-Lisozima.** EDTA 100 mM (pH 8,0), Tritón 0,1% (v/v) y Lisozima 2 mg/ml (añadida inmediatamente antes de usar) en agua destilada.

**Solución PEG-NaCl.** PEG 8.000 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 HTE.** Tris HCl 50 mM (pH 8,0) y EDTA 20 mM (pH 8,0) en agua destilada.

**Tampón TE.** Tris HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (pH 8,0) en agua destilada.

**Tampón TES.** Tris HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 5 mM (pH 8,0) y NaCl 50 mM en agua destilada.

#### 4.3.2. Electroforesis de DNA

**Solución BBF (X6).** Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y sacarosa 40% (p/v) en agua destilada. Conservada a 4°C.

**Solución bromuro de etidio.** Bromuro de etidio a 5 mg/ml en TES. Se almacenó en oscuridad a 4°C.

**Tampón Tris-Acetato (TAE).** Tris HCl 4 mM y EDTA 1 mM en agua destilada ajustando el pH a 8,0.

## *Materiales*

---

### **4.3.3. Electroforesis de proteínas**

**Gel de empaquetamiento.** 1,4 ml de agua destilada, 0,33 ml de la mezcla de acrilamida 30%, 0,25 ml de Tris 1 M (pH 6,8), 0,02 ml de SDS 10%, 0,02 ml de APS 10%, 2  $\mu$ l de TEMED (BioRad).

**Gel de separación.** 2,7 ml de agua destilada, 1 ml de la mezcla de acrilamida 30%, 1,3 ml de Tris 1,5 M (pH 8,8), 0,05 ml de SDS 10%, 0,05 ml de APS 10%, 4  $\mu$ l de TEMED.

**Mezcla de acrilamida 30%.** 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bis-acrilamida y agua destilada hasta 100 ml.

**Tampón de migración 10X.** 12 g de Tris, 57,6 g de glicina, 4 g de SDS y agua destilada hasta 400 ml.

**Tampón de carga.** 1 ml de Tris 1 M (pH 6,8), 1,6 ml de SDS 10%, 5 mg de azul de bromofenol, 1,2 ml de glicerol, 0,4 ml de agua destilada, 0,2 ml de 2-mercaptoetanol.

### **4.3.4. Electroforesis en campo pulsante**

**Líquido de centelleo.** Se preparó mezclando 7,5 g de PPO y 0,15 g de POPOP con un litro de tolueno. Se mantuvo en agitación durante dos horas como mínimo, en frío y oscuridad. Finalmente se añadieron 500 ml de tritón 100X y se mantuvo la agitación al menos 12 horas. Se conservó en frío y oscuridad hasta su uso.

**Solución de lisis.** 1 mg/ml de Proteinasa K y SDS al 1% en TEE.

**Solución de sarcosyl-lisozima.** 0,5 mg/ml de sarcosyl y 5 mg/ml de lisozima en TEE.

**TEE.** Se preparó mezclando 1 ml de Tris Cl 1 M (pH 9), 20 ml de EDTA 0,5 M (pH 8), 10 ml de EGTA 0,1 M (pH 7,5) y 77 ml de agua destilada esterilizadas por separado y mezcladas en el momento de su utilización.

### **4.3.5. Southern blot**

**Solución de desnaturalización.** NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M en agua destilada.

**Solución de neutralización.** Tris HCl 1 M y NaCl 1,5 M en agua destilada y ajustando el pH a 7,4.

**Solución prehibridación-hibridación.** SSCX5, N-lauroil-sarcosina al 0,1%, SDS al 0,02%, agente bloqueante al 1%, DNA sonificado de esperma de salmón.

**Tampón SSCX10.** NaCl 150 mM y Na<sub>3</sub>Citrato 15 mM en agua destilada y ajustando el pH a 7,0.

### 4.3.6. Western blot

**Solución de bloqueo-hibridación.** Tampón PBS-Tween y leche en polvo al 10%.

**Solución de tinción de proteínas en la membrana.** Rojo Ponceau 0,5% (p/v) en ácido acético al 1%.

**Tampón de transferencia 1X.** 100 ml de tampón de transferencia 10X, 200 ml de metanol y 700 ml de agua destilada.

**Tampón de transferencia 10X.** 30 g de Tris, 142,5 g de glicina y agua destilada hasta un litro.

**Tampón PBS-Tween.** NaCl 140 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM y Tween 0,2%.

### 4.3.7. Medida de la síntesis de DNA *in vivo*

**Mezcla de Centelleo.** Se disolvieron 4 g de PPO y 100 mg de POPOP, en este orden, en 1.000 ml de tolueno en oscuridad y a 4°C, condiciones en las que se almacenó.

### 4.3.8. Manipulación *in vivo* de bacterias y fagos

**Tampón M9 (TM9).** Se preparó mezclando 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 0,1 M y 880 ml de agua destilada, esterilizadas por separado y mezcladas en el momento de su utilización.

## *Materiales*

---

La solución salina M9 se preparó disolviendo 60 g de  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$ , 30 g de  $\text{H}_2\text{KPO}_4$ , 5 g de NaCl y 10 gr de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en este orden, en un volumen final de agua destilada de 1.000 ml. Se ajustó su pH a 7,2 y se esterilizó.

**Tampón MC.** Se preparó mezclando  $\text{MgSO}_4$  100 mM y  $\text{CaCl}_2$  5 mM en agua estéril.

### **4.3.9. Citometría de flujo**

**Solución de fijación de bacterias.** Se empleó etanol al 74%. 400  $\mu\text{l}$  de muestra se fijaron con 7 ml de etanol.

**Solución de tinción.** Tris HCl 10mM (pH 7,4),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Bromuro de etidio 40  $\mu\text{g/ml}$  y Mitramicina 200  $\mu\text{g/ml}$ . La solución se pasó a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

**Tampón de tinción.** Tris HCl 10 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Se esterilizó pasando el tampón por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### **4.3.10. Microscopía óptica**

**DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).** Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en agua destilada estéril. Se usó añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de la solución por cada ml de la solución de soporte.

**Solución para la fijación de bacterias.** La fijación de bacterias se realizó en etanol. El etanol se diluyó en agua destilada hasta una concentración final del 74%.

**Solución de soporte.** La solución que sirvió de soporte de las bacterias en el portaobjetos constaba de agarosa 1% y NaCl 0,9% en agua destilada. La solución se pasó por un filtro de 0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se mezcló con DAPI cuando la observación microscópica requirió la visualización del nucleóide.

## 5. Medios de crecimiento

### 5.1. Medios de crecimiento para bacterias

**Medio Mínimo M9.** Se preparó añadiendo 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, 10 ml de  $\text{MgSO}_4$  0,1M, 10 ml de una solución de los aminoácidos requeridos por la estirpe a 2 mg/ml (histidina y arginina para JS1018 y derivadas), 10 ml de una solución de tiamina a 0,2 mg/ml y 2,5 ml de timidina a 2 mg/ml (a menos que se indique una concentración final distinta) a 847,5 ml de agua destilada que contenían 4 g de glucosa. Todas las soluciones se esterilizan previamente por separado. Este medio se enriqueció con una solución de caseína hidrolizada (casaminoácidos) hasta una concentración del 0,1% (p/v) final. Los resultados presentados en esta memoria, a menos que se indique otra cosa, se obtuvieron con cultivos crecidos en medio mínimo con glucosa como fuente de energía suplementado con casaaminoácidos al una concentración del 0,2%.

Este medio se utilizó para el crecimiento de las estirpes bacterianas tanto en líquido como en placa. Para solidificar le medio se añadió 20 g de agar (Panreac) a 860 ml de agua destilada que contenían 4 g de glucosa antes de esterilizar, para luego añadir los demás componentes del medio previamente esterilizados.

**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 1.000 ml de agua destilada, el pH de la solución se ajustó entre 7,2 y 7,4 y se autoclavó. En algunas ocasiones este medio era suplementado con timidina 5 µg/ml y con glucosa 0,1% (en este caso se le llamó LBTG).

**Medio sólido rico Nutrient-Broth con timidina (NAT).** Se disolvieron 8 g de caldo nutritivo Nutrient-Broth y 20 g de agar en 1.000 ml de agua destilada y se esterilizó en el autoclave. Posteriormente se añadieron 5 µg/ml de TdR estéril.

### 5.2. Medios de crecimiento para el fago P1

**Agar de cobertera.** 6 g de agar se añadieron a 1.000 ml de LB y una vez estéril se adicionó  $\text{CaCl}_2$  y glucosa hasta una concentración final de 2,5 mM y 0,1% respectivamente.

## *Materiales*

---

**LA10.** Se preparó añadiendo 10 g de agar a 1.000 ml de LB. Después de su esterilización se añadió  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 5 mM y glucosa 0,1% final. Se utilizó para aumentar el título de las suspensiones del fago y para titular éstas.

### **6. Enzimas**

**DNA Polimerasa Taq.** Suministrada a una concentración de 5 U/ml, junto a una solución de  $\text{MgCl}_2$  25 mM y su tampón de dilución concentrado 10 veces. Se recibió de Promega.

**Lisozima.** Se utilizó en soluciones recién preparadas a 2 mg/ml, que se mantuvieron a 0°C hasta su uso. Se obtuvo de Sigma Chemical Co.

**Pronasa.** Se preparó a 20 mg/ml en Tris HCl 10 mM (pH 7,5), y NaCl 10 mM. Se incubó durante 60 minutos a 37°C para eliminar por autodigestión la posible contaminación con DNAsas y RNAsas. La solución se conservó a -20°C. Suministrada por Sigma Chemical Co.

**Proteinasa K.** Se preparó a 1 mg/ml de en TEE. Fue suministrada por Sigma Chemical Co.

**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. Suministrada por Sigma Chemical Co.

**Enzimas de restricción.** Se utilizaron HindIII y EcoRI, ambas suministradas por New England Biolabs a una concentración de 20 u/ $\mu\text{l}$ , con el tampón NEBuffer 2.

**Fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I.** Suministrado por Boehringer Mannheim a una concentración de 2 u/ $\mu\text{l}$ .

### **7. Anticuerpos**

**Anti-NrdA.** Suministrado por la Dra. JoAnne Stubbe. Es una IgG policlonal procedente de conejo. Se usó con una dilución 1/3.000 y se conservó a -20°C.



***Anti-β-Galactosidasa.*** Suministrada por Acris Antibodies. Es una IgG policlonal procedente de conejo. Se usó a una dilución 1/3.000 y se conservó a -20°C.

***Anti-IgG de conejo.*** Suministrada por Pierce. Es una Ig policlonal procedente de cabra conjugada con la enzima peroxidasa. Se usó también con una dilución 1/3.000.

## ***8. Oligonucleótidos***

Los oligonucleótidos usados como cebadores para las reacciones de PCR previas a la secuenciación del alelo *dnaA46* fueron suministrados por el Dr. James R. Walker (Universidad de Texas). Se conservaron a -20°C.

5'-ATAACCCTGGCGGTGCCTAT-3'	dnaA46 1
5'- GGGATTTCAAACGATCCTCA-3'	dnaA46 2

Los cebadores utilizados para amplificar fragmentos que fueron usados como sondas en el análisis de frecuencia de marcadores fueron suministrados por Genosys. Se conservaron a -20°C.



*Métodos*



## **1. Crecimiento de estirpes**

Al inocular una colonia bacteriana en un medio líquido apto para su crecimiento no todas las células comienzan a estar fisiológicamente activas a la vez. Para lograr que las células de un cultivo alcanzaran la fase de crecimiento óptimo para desarrollar los experimentos, se inocularon 2 ml de medio con una colonia de la estirpe con la que se iba a trabajar. El cultivo se creció durante una noche en un baño de agitación orbital a la temperatura y en el medio apropiado, 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 incubándolos con agitación a la temperatura deseada.

El crecimiento en masa de un cultivo líquido para calcular el tiempo de generación se determinó por aumento de la absorbencia en un espectrofotómetro Spectronic 20 Génesis. Cuando las células se cultivaron en medio mínimo con casaaminoácidos se determinó la absorbencia a 550 nm mientras que cuando se empleó medio rico la medición se hizo a 600 nm. De este modo se corrige la absorción del propio medio a longitudes de onda inferiores. Para realizar mediciones se utilizaron tubos de 1 cm de paso. El volumen utilizado para realizar la medida se devolvió al cultivo de donde se tomó. La representación en una escala semilogarítmica de las densidades ópticas obtenidas en las distintas mediciones frente al tiempo de cada medición permite obtener el tiempo de generación,  $\tau$ , de ese cultivo. Este valor viene dado por el tiempo que tarda en duplicarse la densidad óptica, que es equivalente al tiempo que tarda en duplicarse la masa del cultivo.

El crecimiento en medio sólido fue requerido en distintas situaciones experimentales, para la selección de nuevas estirpes, obtención de clones y durante la comprobación y conservación de las estirpes en uso. Las estirpes se sembraron mediante extensión, por agotamiento o haciendo uso de un palillo estéril sobre el medio sólido en placas Petri adecuado para cada fin y se incubaron en estufas a la temperatura requerida, en posición invertida.

### **1.1. Cambios en las condiciones de crecimiento**

Todos los cambios de las condiciones de crecimiento se realizaron con todo el material que se iba a utilizar precalentado a la temperatura de incubación para que el cultivo no sufriera cambios bruscos de temperatura.

El tratamiento con rifampicina, cloranfenicol y/o cefalexina se realizó añadiendo el antibiótico al cultivo creciendo exponencialmente cuando este alcanzaba

## *Métodos*

---

una densidad óptica de 0,1 unidades de absorbencia. Se utilizó una concentración final de rifampicina de 150 µg/ml, de 200 µg/ml para el cloranfenicol y de 50 µg/ml para la cefalexina.

La eliminación de aminoácidos o de timidina se realizó filtrando los cultivos con filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro, lavando el filtro con el mismo medio mínimo pero sin aminoácidos o timidina, y resuspendiendo las células en medio sin aminoácidos o timidina.

### **2. 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 dos semanas y para permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas y purificadas, las estirpes se conservaron en placas Petri con el medio sólido adecuado a 4°C. 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 aislaron las colonias con las que se trabajó. Las estirpes fueron traspasadas a placas con medio fresco cada dos semanas para impedir que las células alcanzaran un estado estacionario avanzado, con el consiguiente cambio fisiológico, alteración de la viabilidad y tasa de mutación.

### **3. Medida de la cantidad de DNA sintetizado**

#### **3.1. Marcaje del DNA *in vivo***

La progresión de la síntesis de DNA se determinó mediante la cuantificación de <sup>3</sup>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 transformada 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 mediante la timidina fosforilasa (tpp) el nucleósido pasa a timina (T). Esta vía de degradación puede ser usada para la síntesis de TMP usando mutantes en el gen *thyA*. Estos mutantes requieren por tanto para su crecimiento timina o timidina, que suministradas radiactivas marcan específicamente el DNA. La adición de la base o del nucleósido a una estirpe silvestre hace que la mayor parte sea degradada. Hay varios fenotipos *thy<sup>-</sup>* que por mutaciones simples o dobles en genes que codifican las enzimas usadas en esta ruta requieren diferentes concentraciones de timina o timidina para su crecimiento (Ahmad *et al.*, 1998). El problema con mutantes *thy<sup>-</sup>* radica en determinar con exactitud la concentración de timina o timidina óptima para que un defecto de esta concentración no limite la velocidad de replicación o su exceso perjudique al crecimiento (Molina *et al.*, 1998; Pritchard y Zaritsky, 1970). La concentración óptima de timidina requerida para el crecimiento de las estirpes utilizadas en este trabajo fue de 5 µg/ml.

Para llevar a cabo el marcaje de un cultivo creciendo en medio líquido, se diluyó un cultivo nocturno en el mismo medio de crecimiento al que se había añadido previamente 5 µg/ml de TdR y 1 µCi/ml de <sup>3</sup>H-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 cinco generaciones.

### **3.2. Medida de la síntesis de DNA**

Para cuantificar la incorporación de <sup>3</sup>H-TdR en el DNA se tomaron alícuotas del cultivo 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 previamente humedecido en agua destilada. Los tubos se lavaron con TCA al 5%, se filtró este volumen y finalmente los filtros se lavaron dos veces con agua destilada. Estos filtros se secaron a 80°C y posteriormente se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de la mezcla de centelleo. La medida de la cantidad de <sup>3</sup>H-TdR incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

### 3.2.1. Medida de la síntesis de DNA 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. De este modo puede hallarse el tiempo de duplicación de la cantidad de DNA a partir de la acumulación de  $^3\text{H-TdR}$ , que en un cultivo con crecimiento equilibrado debe coincidir con el tiempo de generación,  $\tau$ .

### 3.2.2. Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los orígenes de replicación

La inhibición del inicio de nuevos ciclos de replicación se llevó a cabo por adición de rifampicina (150  $\mu\text{g/ml}$ ), cloranfenicol (200  $\mu\text{g/ml}$ ), mediante la eliminación de aminoácidos o por cambio a temperatura restrictiva (en los mutantes de iniciación) de cultivos que habían alcanzado 0,1 unidades de absorbencia. En el momento del comienzo del tratamiento se tomaron varias muestras de 200  $\mu\text{l}$  del cultivo que se precipitaron en TCA. Se continuó con la toma de alícuotas y su precipitación a diferentes tiempos hasta cuatro horas después del inicio del tratamiento.

Como cada cromosoma replicándose dará lugar a un número de cromosomas completos igual al número de orígenes iniciales, esto es  $2^n$ , y la síntesis residual de DNA,  $\Delta G$ , es la diferencia entre la cantidad final e inicial de DNA relativa a la inicial se tiene que (Churchward *et al.*, 1983):

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

Por otro lado la cantidad media de DNA por cromosoma es:

$$G = \int_0^1 2^{n(1-x)} dx = \frac{2^n - 1}{n \ln 2}$$

donde  $x$  es la distancia relativa al origen.

Por tanto (Sueoka y Yoshikawa, 1965):

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



Esto muestra que la acumulación de DNA tras la inhibición del inicio de replicación depende exclusivamente de  $n$ . La cantidad de DNA acumulado por el cultivo tras el inicio del tratamiento inhibitor se determinó por las desintegraciones por minuto (dpm) en las que se estabiliza la acumulación relativas a las dpm en el momento del inicio de la inhibición. A partir de este valor se determinó  $n$ , o número de ciclos de replicación solapados por cromosoma, empleando el programa de ordenador *Replicon* (Jiménez-Sánchez y Guzmán, 1988).

Una vez conocido  $n$  junto a los datos de la velocidad de crecimiento, se halló el tiempo de elongación de la replicación  $C$  a partir de la expresión  $n = C/\tau$ .

### 3.2.3. Medida de la degradación de DNA

Para la cuantificación de la degradación del DNA se utilizó una variante de la medida de la síntesis. Los cultivos fueron diluidos en presencia  $^3\text{H-TdR}$  a la misma concentración que para cuantificar la síntesis, pero, en el momento de iniciar el tratamiento deseado, alícuotas del cultivo fueron filtradas utilizando filtros Millipore de  $0,45\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro, se lavaron con el mismo medio pero sin  $^3\text{H-TdR}$  y se resuspendieron en un volumen igual al de la alícuota extraída de medio, también sin  $^3\text{H-TdR}$  y con rifampicina. En ese momento comenzó la toma, procesado y medición de las muestras, que se realizó exactamente igual que para la cuantificación de la síntesis. Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a los de las muestras extraídas en el momento de inicio del tratamiento. De esta forma, si la radiactividad incorporada en el cromosoma en el momento de su eliminación del medio disminuye a lo largo del tratamiento, esto significaría que se está perdiendo como consecuencia de una degradación cromosómica.

## 4. Aislamiento de DNA

### 4.1. Aislamiento de DNA cromosómico

Para aislar el DNA cromosómico ha sido usado un procedimiento que resulta muy satisfactorio con *E. coli* y con varios otros tipos de bacterias Gram negativas (Zyskind, 1989): se obtuvo un cultivo de células bastante denso, a partir del que se aisló el cromosoma. Para ello, se centrifugó 1,2 ml de cultivo a 7.000 g durante 1 minuto en un tubo de microcentrífuga estéril y el sedimento se resuspendió en 310  $\mu\text{l}$  de HTE. A la

## *Métodos*

---

suspensión celular se adicionaron 350 µl de N-lauroil-sarcosina al 2% en HTE y se mezcló bien mediante la inversión del tubo. Posteriormente se añadieron 5 µl de RNasaA preparada a 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 17,5 µl de Pronasa y se dejó actuar de 30 a 90 minutos a 50°C hasta que la lisis fue completa. A continuación se agitó fuertemente el lisado durante 2 minutos para fragmentar el DNA.

### **4.2. Aislamiento de DNA plasmídico**

Para aislar el DNA plasmídico se obtuvo un cultivo denso a partir de una colonia de la estirpe portadora del plásmido en medio rico LB con timidina y con el antibiótico apropiado a 30°C o a 37°C. Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo en tubos eppendorf a 7.000 g durante 1 minuto y se eliminó el medio por aspiración dejando seco el sedimento bacteriano. Las células se resuspendieron en 300 µl de una solución de Tris-sacarosa (apartado 4.3.1. de *Materiales*) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 300 µl de una solución de EDTA-Triton-Lisozima (apartado 4.3.1. de *Materiales*), se invirtió el tubo suavemente varias veces y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, para pasar otros 10 minutos a 70°C. El lisado obtenido se centrifugó a 7.000 g 30 minutos. El sedimento con restos celulares se eliminó con un palillo de dientes estéril y se procedió a la concentración del DNA de la solución.

## **5. Purificación y concentración de DNA**

### **5.1. Purificación de DNA mediante extracciones con fenol/cloroformo**

Tras el tratamiento de lisados celulares con enzimas proteolíticas, la eliminación de las proteínas de una solución de ácidos nucleicos 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. A la solución de ácidos nucleicos se añadió un volumen igual de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; los componentes se mezclaron por agitación mecánica fuerte durante un minuto hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0°C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por

centrifugación a 7.000 g durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase (un mínimo de dos veces). 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 los ácidos nucleicos en solución.

## **5.2. Concentración de DNA mediante precipitación**

Para concentrar soluciones de DNA se procedió normalmente a su precipitación con etanol o isopropanol. Para ello, a la solución de DNA se añadió acetato sódico (pH 5,2) a una concentración final 0,3 M, se mezcló y se añadió un volumen de isopropanol igual al de la solución o el doble de su volumen de etanol y de nuevo se mezcló bien la solución. Se mantuvo a -80°C de 30 a 60 minutos para facilitar la precipitación y el DNA se recuperó centrifugando a 13.000 g durante 30 minutos a 4°C y eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% y de nuevo se centrifugó en las mismas condiciones para recuperar el DNA. Se eliminó el sobrenadante y del sedimento se eliminaron los restos de etanol secándolo al vacío (en un Concentrador Centrivap de LABCONCO, modelo 78100-01). El DNA precipitado y seco se resuspendió en el volumen deseado de TE (apartado 4.3.1 de *Materiales*).

En el caso del aislamiento de DNA plasmídico, previamente a la purificación con fenol: cloroformo y precipitación con etanol se procedió a la concentración del DNA plasmídico mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). A la solución de DNA se añadió un volumen igual de una solución de PEG-NaCl (apartado 4.3.1 de *Materiales*) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras los cuales se centrifugó a 13.000 g por 3 minutos, eliminando el sobrenadante en su totalidad. Seguidamente el sedimento se disolvió en el volumen deseado de TE con RNasa II-A a 40 µg/ml y se incubó 10 minutos a 37°C. La solución final de DNA se conservó a 4°C. Este método es más rápido que la precipitación con etanol o isopropanol, pero si se requiere una extrema pureza del DNA y se ha usado previamente este método de concentración durante el protocolo de aislamiento, es aconsejable eliminar el PEG mediante la extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol o isopropanol.

### **5.3. Obtención de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Para la extracción y purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el Kit GeneClean II (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los rendimientos obtenidos rondaron el 20%.

## **6. Electroforesis de DNA**

La separación e identificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue de 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 Tris–acetato 1X (TAE) (apartado 4.3.2 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 cargadas en el gel se mezclaron previamente con solución BBFX1 (apartado 4.3.2 de *Materiales*). Esta solución confiere color e incrementa la densidad de la muestra facilitándose la entrada en los pocillos del gel. A la vez, debido a que el colorante de esta solución *azul de bromofenol* migra hacia el ánodo en un campo eléctrico y aproximadamente al mismo nivel que un fragmento de DNA lineal de doble cadena de 300 pares de bases, nos permite inferir el recorrido de las muestras durante la electroforesis. Por último, las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

## **7. Medida de la concentración de DNA mediante densitometría de geles**

La cuantificación de la concentración de DNA se realizó estimando la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre los pares de bases del DNA y al ser iluminado con luz ultravioleta emite una fluorescencia anaranjada en el visible cuya intensidad es proporcional a la cantidad de DNA. Para ello se procedió a la digitalización de la imagen de geles iluminados en un sistema de documentación de geles GDS5000 de UVP y se realizó la densitometría

de las bandas de DNA por ordenador utilizando el programa *Quantity One* de la firma Photodyne.

## **8. Electroforesis en campo pulsante**

La electroforesis en campo pulsante es una técnica que permite resolver fragmentos de DNA de distintos tamaños. La electroforesis convencional no permite la resolución de fragmentos de DNA mayores a 20.000 pares de bases. Pero alternando 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 a través de los poros de un gel de agarosa.

Esta técnica se empleó para cuantificar DNA lineal en distintas estirpes. Debido al diseño de los experimentos realizados y a las estirpes empleadas, la cantidad de DNA lineal se corresponde con la cantidad de roturas cromosómicas de las distintas estirpes. Así, antes del tratamiento de los cultivos con las distintas soluciones de lisis se inmovilizaron las células a tratar en bloques de agarosa para evitar que la manipulación provocase roturas en el DNA. De este modo, se consigue que las roturas cromosómicas que presenten las distintas estirpes se deban fundamentalmente a sus características fisiológicas y no a la manipulación de las células antes de someterlas al campo eléctrico.

Todos los experimentos llevados a cabo para determinar las roturas cromosómicas de distintas estirpes y en diferentes condiciones se realizaron en medio mínimo M9 con casaaminoácidos (apartado 5.1 de *Materiales*) suplementado con 5 µg/ml de TdR. Para marcar específicamente el DNA y poder cuantificar las roturas cromosómicas se añadió al medio de cultivo 5 µCi/ml de <sup>3</sup>H-TdR.

### **8.1. Preparación de bloques de DNA**

Cultivos nocturnos de las células a analizar se diluyeron en medio fresco que contenían 5 µg/ml de TdR y 5 µCi/ml de <sup>3</sup>H-TdR. Cuando el cultivo alcanzó 0,1 unidades de densidad óptica para los análisis en crecimiento exponencial o tras aplicar el tratamiento deseado una vez alcanzada esta densidad, 1 ml de células se centrifugó a 3.500 rpm y se lavó con 1,5 ml de tampón TM9 (apartado 4.3.8 de *Materiales*). El sedimento se resuspendió en 100 µl de TEE (apartado 4.3.4 de *Materiales*) y se mantuvo 10 minutos a 37°C. Estos 100 µl de células se mezclaron con 100 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en TEE, previamente fundida y mantenida a 56°C, y de la mezcla

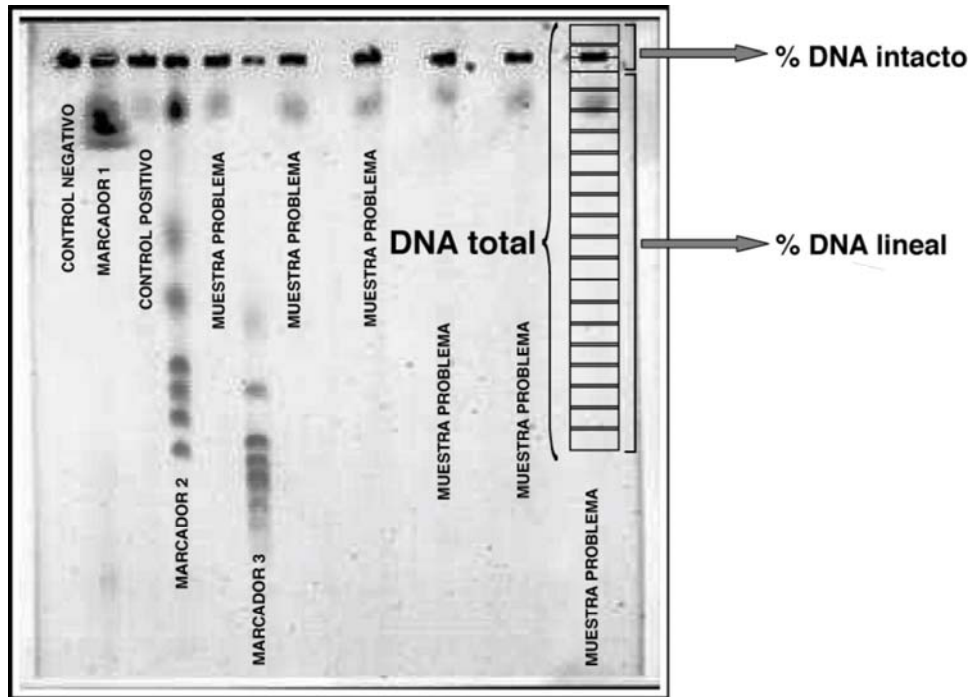
se prepararon dos bloques vertiendo la suspensión en moldes adecuados. Tras solidificar, los bloques fueron desmoldados en 2 ml de una solución con 5 mg/ml de lisozima y sarcosyl al 0,05% en TEE (apartado 4.3.4 de *Materiales*) e incubados con agitación suave a 37°C durante dos horas. A continuación se retiró la solución de sarcosyl-lisozima, se añadió la solución de lisis (apartado 4.3.4 de *Materiales*) y se incubaron los bloques de células a 56°C con agitación suave toda la noche.

### **8.2. Electroforesis y procesamiento del gel**

Cada bloque de DNA se cargó en un pocillo de un gel de agarosa al 1% en TAE y todos los pocillos se sellaron con agarosa al 1%. La electroforesis empleada fue suministrada por BioRad, modelo *CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis System*, y las condiciones de migración fueron: 500 segundos de tiempo inicial, 500 segundos de tiempo final, 3 voltios/cm y un ángulo comprendido de 106°. La migración se mantuvo durante 48 horas. 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 horas de migración.

Una vez finalizada la migración, se tiñó el gel con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en TAE para comprobar que el desplazamiento del DNA había sido correcto. A continuación cada calle del gel se cortó en fragmentos de 3 mm de anchura y se fundieron los fragmentos con 800 µl de HCl 0,1 N a 100°C. El volumen correspondiente a cada porción del gel se colocó en un vial con 10 ml de líquido de centelleo para geles (apartado 4.3.4 de *Materiales*) y se midió la cantidad de radiactividad con un contador de centelleo Beckman LS 3801.

Los valores de radiactividad de los tres primeros fragmentos de cada calle que corresponden al pocillo del gel, al bloque de células y a los 3 mm de gel superiores e inferiores al pocillo, hacen referencia a la cantidad de DNA no fragmentado (Fig. 10). La suma de los valores de radiactividad del resto de los fragmentos se corresponde a la cantidad de DNA lineal. Ambas sumas se hacen relativas a la cantidad de DNA total (radiactividad total medida en toda la calle) para determinar el porcentaje de rotura o de DNA lineal en cada condición experimental.



**Fig. 10.** Procesamiento del gel de campo pulsante. Cada calle del gel se corta en porciones de 3 mm de anchura. Estas porciones son fundidas en viales individuales y la radiactividad presente en cada vial es cuantificada con un contador de centelleo. El valor de radiactividad de las tres primeras porciones junto con el valor de radiactividad del bloque de células del pocillo, frente al valor total de radiactividad de toda la calle, se corresponde a porcentaje de DNA intacto que permanece en el pocillo. La cantidad de radiactividad del resto de porciones frente a la radiactividad total es el porcentaje de DNA lineal, también llamado porcentaje de roturas.

Para comparar valores de DNA lineal de distintas estirpes o en distintas condiciones se aplicó a los datos obtenidos la prueba estadística t-Student, considerándose que dos muestras eran diferentes si el valor de  $p$  obtenido era inferior a 0,05.

### 9. Electroporación

La eficiencia en la introducción del DNA plasmídico 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 (Dower *et al.*, 1988).

A partir de una dilución aproximada de 1:100 de un cultivo nocturno en LBTG (LB suplementado con timidina y glucosa como se detalla en el apartado 5.1 de *Materiales*) 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 a 0°C durante 20 minutos y a continuación se recogieron las células centrifugando a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de agua milliQ a 0°C que del cultivo tomado inicialmente y volvieron a centrifugarse 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 en glicerol al 10% en agua milliQ a 0°C. Las células volvieron a recogerse por centrifugación y se resuspendieron en un volumen final 1/3 del anterior de la misma solución (la concentración celular debería ser de  $1-3 \times 10^{10}$  células/ml).

Una vez conseguidas las células electro-competentes, en tubos de polipropileno de 1,5 ml en hielo, se mezclaron 40  $\mu$ l de la suspensión celular con entre 1 y 2  $\mu$ l de DNA (no más de 50 ng) disuelto en TE y se mantuvieron en hielo durante 1 minuto.

La mezcla de células y DNA se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación de 0,2 cm de Bio-Rad a 0°C, que se colocó en la cámara de electroporación, sometiéndose la suspensión celular a un pulso constante de 4 a 5 milisegundos con una fuerza de 12,5 KV/cm, usando el electroporador de Bio-Rad a 25  $\mu$ F, 2,5 KV y 200  $\Omega$ . Posteriormente, se sacó la cubeta de la cámara y se añadió inmediatamente 1 ml de LBTG, se resuspendieron las células con la ayuda de una micropipeta y se transfirieron a un tubo de cristal estéril para su incubación a 30°C durante 2 horas, con suave agitación, para permitir 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 e incubándolas 48 horas a 30°C.



## **10. Transducción**

Debido a que el fenotipo asociado a cada construcción cromosómica puede variar según el fondo genético en que se exprese, se decidió realizar todos los análisis en la misma estirpe. Como en algunos casos las construcciones a analizar se encontraban en otras estirpes, era necesaria su transferencia. El método empleado en la mayoría de los casos para lograrlo fue la transducción generalizada, que consiste en la transferencia de material genético no vírico de una célula a otra dentro de una cápsula vírica y el bacteriófago elegido fue P1vir (Miller, 1992).

### **10.1. Multiplicación de fagos**

De un cultivo con una densidad óptica de 0,8 de la estirpe donadora en medio rico LB con glucosa al 0,1% y 5 µg/ml de TdR (LBTG) que contenía CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y MgSO<sub>4</sub> 100 mM se tomaron alícuotas de 0,1 ml del cultivo y se infectaron con 10 µl de una suspensión de fagos (10<sup>9</sup> 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 y se vertieron en una placa de medio rico LA10 (apartado 5.2 de *Materiales*) con glucosa al 0,1%, 5 µg/ml de TdR y CaCl<sub>2</sub> 5mM. Después se incubaron de 20 a 24 horas a la temperatura de crecimiento de la estirpe donadora, se recogió el agar de cobertera, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g, se recuperó el sobrenadante y se conservó a 4°C con unas gotas de cloroformo.

Para el recuento del número de fagos se realizó una dilución seriada de una alícuota de 100 µl en LBTG hasta obtener una suspensión de 1.000 a 2.000 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 a la temperatura de crecimiento de la bacteria en LBTG, al que se le añadía CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y MgSO<sub>4</sub> 100 mM antes de la infección con el fago. Finalmente y tras 15 minutos de incubación a 37°C, la mezcla se sembró con agar de cobertera en placas de LA10 con glucosa al 0,1%, 5 µg/ml de TdR y CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Una vez incubadas de 20 a 24 horas a la temperatura apropiada se procedió al conteo de las calvas.

### **10.2. Transducción**

Se obtuvo un cultivo estacionario fresco (densidad óptica de 0,8) de la estirpe receptora en medio rico LBTG al que se le añadió CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y MgSO<sub>4</sub> 1 mM antes de la infección con el fago. Alícuotas de 900 µl de esta suspensión se infectaron con los

## Métodos

---

fagos obtenidos a partir de la estirpe donadora con una multiplicidad de infección de 0,1. Transcurridos 30 minutos de preadsorción a la temperatura de crecimiento de la estirpe receptora, las infecciones se interrumpieron por la adición de 5 ml de LBTG con citrato sódico 5 mM. Tras incubar las bacterias una hora y media con agitación y a la temperatura apropiada, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 µl de MgCl<sub>2</sub> 0,01 M y se sembraron en placas selectivas de NAT, a las que se le habían añadido los antibióticos requeridos en cada caso, y se incubaron a la temperatura adecuada durante al menos 24 horas para seleccionar los transductantes que contenían la construcción deseada.

### **10.3. Comprobación de los transductantes**

Los transductantes obtenidos se verificaron en los siguientes puntos:

#### **10.3.1. Comprobación de los requerimientos de aminoácidos y de la resistencia a antibióticos**

Para su crecimiento, JS1018 y JK607 requieren timidina, histidina, arginina y vitamina B1. La comprobación de estos requerimientos en los transductantes derivados de JS1018 y de JK607 se llevó a cabo tomando con un palillo células de una colonia y haciendo cruces en series de placas de medio mínimo carentes de un aminoácido para el que JS1018 y JK607 son auxótrofas. Además, se comprobó la capacidad de formar colonias a 42°C de las estirpes derivadas de JS1018 y de JK607 haciendo cruces en placas de medio rico e incubándolas a dicha temperatura.

A pesar de que las transducciones se sembraron en placas selectivas con el antibiótico marcador de la mutación que se quería transducir, una vez obtenidos los transductantes se hicieron cruces con un palillo estéril con células de una colonia aislada en placas de medio rico con los distintos antibióticos a los que las estirpes eran resistentes para asegurar su crecimiento en presencia de las distintas drogas.

Además de las comprobaciones anteriores, los transductantes derivados de JS1018 en los que se había introducido mutaciones que confieren termosensibilidad requirieron posteriores verificaciones. Las mutaciones en *dnaA* y *dnaC* fueron seleccionadas por la resistencia a tetraciclina conferida por Tn10, que se encontraba insertado cerca de uno u otro gen en cada caso. Sin embargo, durante el proceso de transducción era posible que se produjera un suceso de recombinación entre los genes de interés y el transposón en un porcentaje de transductantes. En JK607 esto no supuso ningún problema, ya que se podía identificar fácilmente a los cotransductantes, es decir

a los resistentes a tetraciclina que también habían incorporado la mutación de interés, por su incapacidad de crecer a 42°C. Pero en el caso de JS1018, que ya es termosensible por sí mismo, este sistema no sirve para identificar a los cotransductantes. Para ello, se escogieron diez colonias de entre los resistentes a tetraciclina, se obtuvieron fagos transductantes a partir de ellas y con estos fagos se realizó la transducción sobre JK607. Nuevamente, se comprobó la termosensibilidad de las colonias resistentes a tetraciclina obtenidas. Si un fago es capaz de transmitir el carácter termosensible a la bacteria transducida, significa que la bacteria que fue infectada para la obtención de los fagos posee un gen que confiere termosensibilidad cerca del marcador seleccionado. Por lo tanto, las colonias de los transductantes derivados de JS1018 que produjeron fagos capaces de volver termosensible a JK607 eran los verdaderos cotransductantes, es decir, poseían la mutación en *dnaA* o *dnaC*.

En el caso de la estirpe JS875 (*nrdA101 dnaA46*), la escasez de colonias resistentes a tetraciclina y el bajo porcentaje de cotransducción conseguidos en JS1018 apuntaba a la posibilidad de que la combinación de las mutaciones *nrdA101* y *dnaA46* fuese deletérea. Se comprobó que la nueva estirpe poseía el alelo *dnaA46* secuenciando la zona del gen *dnaA* donde debía encontrarse la mutación 46, y se verificó que la mutación *nrdA101* no había sufrido una reversión transformando a las estirpes mutantes *dnaA46* obtenidas con el plásmido pdnaA116, que posee el gen *dnaA* clonado bajo el control de un promotor inducible por IPTG (apartado 3.1 de *Materiales*). Como control, también se transformó a la nueva estirpe JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*). Las colonias transformantes derivadas de JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*) recuperaron la capacidad de crecer a 42°C en placas de medio rico suplementado con IPTG 10 µM, es decir, el aporte plasmídico de DnaA silvestre revierte la termosensibilidad inducida por la mutación cromosómica *dnaA46*. Por el contrario, los transformantes derivados de JS875 (*nrdA101 dnaA46*) no crecieron a 42°C con IPTG 10 µM. El hecho de que, tras suprimir el efecto de *dnaA46*, la bacteria conservara su termosensibilidad únicamente podía ser debido a la mutación *nrdA101*. Quedó así descartada la hipótesis de una reversión de *nrdA101*.

### 10.3.2. Comprobación de la correcta incorporación de timidina radiactiva

Una vez comprobados los requerimientos para el crecimiento, se determinó la síntesis de DNA mediante la cuantificación de <sup>3</sup>H-TdR incorporada en el DNA a diferentes tiempos en cultivos creciendo exponencialmente.

### **11. Análisis de viabilidad**

Cultivos nocturnos crecidos en MM9 con casaminoácidos al 0,2% de las células a las que se quería analizar la viabilidad se diluyeron en medio fresco. Cuando el cultivo alcanzó 0,1 unidades de densidad óptica se le aplicó el tratamiento deseado. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento y éstas fueron diluidas de manera seriada en tampón TM9 para ser sembradas en placas de NAT, que se incubaron a 30°C durante 48 horas. Las diluciones se hicieron de tal manera que se obtuviera un número de colonias por placa que pudiese ser contado (alrededor de 400 colonias por placa). Las colonias que crecieron fueron contadas y estos valores se hicieron relativos a los obtenidos en el momento del inicio del tratamiento.

### **12. Citometría de flujo**

#### **12.1. Fundamento de la citometría de flujo**

La citometría de flujo permite medir la fluorescencia y la dispersión de luz de células individuales en gran número. Así, utilizando un fluorocromo que se una con gran afinidad a un determinado constituyente celular puede cuantificarse éste. Por otro lado la dispersión de luz permite obtener información relativa al tamaño y la forma de las células (Boye *et al.*, 1983; Steen, 1980; Steen y Boye, 1981).

En el citómetro de flujo las células son transportadas por un flujo laminar de agua a través de un flujo de luz de longitud de onda próxima al espectro de absorción del 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 (Sahapiro, 1995).

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un citómetro suministrado por BioRad, Modelo HS Enhanced Brite. Este instrumento se caracteriza por emplear lámparas de Xe o Xe/Hg, de modo que utilizando bloques de filtros intercambiables puede modularse la longitud de onda de excitación, así como la que se desea registrar en los tubos fotomultiplicadores.

## **12.2. Toma y análisis de las muestras**

### **12.2.1. Toma y fijado de las muestras**

En cultivos bacterianos los parámetros del ciclo sufren modificaciones cuando se alcanza el tramo final de la fase exponencial. Por eso para minimizar la variabilidad entre distintos experimentos, se recogieron siempre las muestras a 0,1 unidades de densidad óptica o cuatro horas después de comenzar el tratamiento deseado una vez alcanzada esta densidad.

Si al comienzo del tratamiento se inhibe el inicio de la replicación (por adición de rifampicina, por ejemplo) y la división celular (por adición de cefalexina), las bacterias completan las replications que tienen en marcha en el momento del comienzo del tratamiento y no se dividen. De este modo, si para teñir las muestras se usa un fluorocromo que se une al DNA, al final del tratamiento se podrán observar por citometría picos correspondientes a células con cromosomas íntegramente replicados. El número de cromosomas replicados por célula dependerá de los ciclos de replicación que estén iniciados en el momento del cambio. Así, las células que ya hubieran iniciado una nueva ronda de replicación en el momento de la adición de rifampicina acabarán con el doble de cromosomas que aquellas que todavía no hubieran iniciado cuando se añadió el antibiótico.

En este trabajo, a menos que se especifique lo contrario, todos los cultivos de los que se han obtenido muestras para ser analizadas por citometría de flujo han sido incubados en presencia de cefalexina durante el tratamiento pertinente.

Para fijar las muestras se añadieron alícuotas de 0,4 ml de cultivo a 7 ml de etanol al 74%. Las células fijadas se almacenaron, hasta 4 meses a 4°C, hasta su posterior análisis.

### **12.2.2. Tinción**

Para la tinción de las células fijadas se empleó una combinación de mitramicina y bromuro de etidio. (apartado 4.3.9 de *Materiales*). La mitramicina se une al DNA de modo específico mientras que el bromuro de etidio se une indistintamente al DNA y al RNA. Sin embargo, la tinción con mitramicina no permite obtener una señal detectable por el citómetro de flujo. Debido al solapamiento de los espectros de emisión de la mitramicina y de absorción del bromuro de etidio y a que a la longitud de onda de excitación empleada la absorción del bromuro de etidio es prácticamente nula, puede cuantificarse exclusivamente la cantidad de DNA por célula siendo despreciable la

## Métodos

---

fluorescencia correspondiente al bromuro de etidio unido al RNA, ya que la emisión del bromuro de etidio se debe a la excitación de éste por la emisión de la mitramicina.

Se tomó un volumen de 1,5 ml del cultivo fijado y, tras precipitar por centrifugación, se lavaron las células con 1 ml de una solución de Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM y de  $MgCl_2$  10 mM. Posteriormente se resuspendió el sedimento en 75  $\mu$ l del tampón Tris- $MgCl_2$  y acto seguido se añadió igual volumen de la solución de tinción y se mantuvo un mínimo de una hora a 4°C en oscuridad.

Dado que el tamaño medio de una célula de *Escherichia coli* es de sólo 2  $\mu$ m, tanto las soluciones de tinción como el agua empleada para la obtención del flujo laminar se filtraron usando membranas con poros de 0,22  $\mu$ m de diámetro (Millipore Millex G-V). De este modo se consigue aumentar la relación señal/ruido detectada por los fotomultiplicadores.

### 12.2.3. Análisis de las muestras

Para calibrar el instrumento se utilizaron esferas fluorescentes de 2  $\mu$ m de diámetro suministradas por BioRad, que sirvieron para disponer los objetivos y el embudo 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 (siendo el intervalo de intensidad de 8 bits; es decir, la intensidad máxima corresponde al canal 256).

Finalmente se corrieron las muestras teñidas ajustando el flujo de modo que se computaran entre 500 y 1.000 células por segundo. Se examinó un mínimo de 10.000 células.

## 13. Microscopía óptica de contraste de fase y fluorescencia

La microscopía óptica permitió, mediante el contraste de fase, observar las bacterias gracias a la opacidad que ofrecen al ser iluminadas con luz visible. La fluorescencia facilitó el estudio del nucleóide bacteriano gracias a la emisión del DAPI, unido específicamente a los ácidos nucleicos, al irradiar con luz ultravioleta.

### **13.1. Instrumentación**

Se empleó un microscopio Nikon, modelo Eclipse E600, que incluye una lámpara de alta presión de mercurio Nikon, modelo HB-10104AF, que proporcionó la luz ultravioleta. Las imágenes fueron capturadas por una cámara digital Hamamatsu, modelo C4742-95-10NR y enviadas a un ordenador donde se trataron. Se empleó el programa IpLab (Scanalytics) para la captura de las imágenes, y el programa Photoshop (Adobe) para su tratamiento. Todas las fotografías presentadas en este trabajo están expuestas a una misma escala de amplificación, de modo que pueden compararse los tamaños entre ellas.

### **13.2. Tratamiento de las muestras**

El estado laxo en el que se encuentra el DNA en la bacteria en condiciones normales puede hacer que distintos cromosomas aparezcan visualmente fusionados formando un único nucleoide, lo que dificulta el estudio de la segregación cromosómica. Este problema se solventó mediante la adición de cloranfenicol a los cultivos en los últimos 15 minutos del tratamiento, antes de la recogida de muestras. La adición de cloranfenicol provoca la compactación del DNA permitiendo la discriminación visual entre cromosomas cercanos.

#### **13.2.1. Fijado de las muestras**

Al igual que en el caso de la citometría de flujo, las bacterias se fijaron en etanol. Se añadieron 400 µl de cultivo a 8 ml de etanol al 74% y se conservaron a 4°C. En estas condiciones, las muestras fijadas pueden permanecer en buen estado hasta cuatro meses.

#### **13.2.2. Preparación de las muestras para su visualización**

El soporte sobre el que se depositó la muestra se compuso de una mezcla de agar 1% en NaCl. Se licuó por calor y se filtró a través de filtros Millipore con un diámetro de poro de 0,8 µm. Posteriormente se vertió 1 ml de la mezcla sobre cada portaobjetos. Cuando fue necesario visualizar los nucleoides se añadieron a la mezcla anterior 10 µl del colorante DAPI preparado a 50 µg/ml. La mezcla depositada sobre el portaobjetos se

## Métodos

---

dejó solidificar durante 5 minutos con un cubreobjetos sobre ella para allanar la superficie y se secó a 42°C durante 8 minutos aproximadamente.

### **14. Amplificación de segmentos de DNA mediante PCR**

El método denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para amplificar fragmentos de DNA que luego fueron utilizados para su secuenciación o que se emplearon como sondas para Southern blot.

En todos los casos se empleó la DNA polimerasa Taq a una concentración de 2U/100 ml. Se observó una gran variabilidad en el rendimiento de la reacción debida a la distinta fuerza iónica de las soluciones de DNA y a la distinta temperatura de fusión de cada cebador, de modo que para determinar las condiciones óptimas se probaron distintas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (0,5, 1 y 1,5 mM) seleccionándose aquélla que permitía mayor amplificación de la secuencia. La concentración final de los demás reactivos fue: tampón Taq 1X, dNTPs 50 µM, DNA molde 1 ng/ml, cebador-1 0,25 µM, cebador-2 0,25 µM, Taq polimerasa 2U/100 µl.

Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95°C 1 minuto, hibridación a 55°C 1 minuto y polimerización a 72°C 2 minutos. Este ciclo se repitió 35 veces. Para optimizar el rendimiento de la reacción las muestras fueron incubadas a 95°C durante 2 minutos antes de comenzar los ciclos de amplificación. De este modo se asegura una completa desnaturalización del DNA molde. Asimismo y para garantizar la compleción de las polimerizaciones en marcha, se incubó durante 10 minutos a 72°C tras la conclusión de los ciclos desnaturalización-hibridación-polimerización. La temperatura fue establecida empleando un termociclador Eppendorf (Modelo Mastercycler Gradient). Tras la reacción se comprobó la correcta amplificación de la secuencia mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **15. Secuenciación**

Para su secuenciación se aisló el DNA de cultivos crecidos en medio rico hasta fase estacionaria y se precipitó con etanol. El segmento objeto de estudio fue amplificado mediante PCR usando los cebadores descritos en el apartado 8 de *Materiales*. Tras la reacción, la mezcla de PCR se corrió en electroforesis de agarosa y el fragmento correspondiente fue extraído como se detalla en el apartado 5.3 de *Métodos*. El DNA se resuspendió en agua miliQ hasta alcanzar una concentración mínima de 100



ng/ml. Posteriormente los segmentos amplificados fueron enviados al servicio de secuenciación del Core Facility Center de la Universidad de Austin en Austin.

## **16. Southern Blot**

El Southern Blot es una técnica que permite la identificación de secuencias específicas de DNA mediante el uso de electroforesis y de hibridación utilizando sondas específicas (Southern, 1975). Para analizar una muestra de DNA cromosómico ésta debe ser previamente fragmentada. Los fragmentos obtenidos se separan de mayor a menor tamaño mediante una electroforesis de agarosa. Una vez terminada la electroforesis, el DNA se desnaturaliza y los fragmentos de DNA monocatenario se traspasan a una membrana de nylon. A continuación, la membrana se incuba con una sonda marcada, específica para la secuencia que se desea identificar. Esta sonda es una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla que reconocerá a la secuencia de DNA inmovilizada en la membrana a través del reconocimiento de secuencias complementarias de ácidos nucleicos.

### **16.1. Aislamiento del DNA cromosómico de las estirpes a analizar**

Por cada muestra se recogieron 150 ml de cultivo tras llevarse a cabo el tratamiento deseado. En el momento de la recogida, se añadieron a la muestra 15 ml de azida sódica 1 M fría, se agitó fuertemente la mezcla y se mantuvo 30 minutos en hielo. De esta forma, las replications en marcha se detienen instantáneamente. Después se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y a 10.000 g. El sedimento de células se lavó dos veces con 15 ml de HTE y se guardó seco a -70°C. Posteriormente se procedió al aislamiento y purificación del DNA cromosómico como se detalla en los apartados 5.1 y 5.2 de *Métodos*. La cantidad de DNA aislada se cuantificó tras una separación por electroforesis, mediante densitometría de geles.

### **16.2. Fragmentación del DNA**

Para fragmentar el DNA se emplearon las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y las reacciones de digestión se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor. Generalmente se prepararon manteniendo las soluciones a 0°C y el DNA en el máximo estado de pureza posible. Las reacciones se realizaron en 50 µl de volumen

## *Métodos*

---

final empleando agua miliQ, en las que las concentraciones finales de los distintos componentes de la reacción fueron las siguientes: 2-3 µg de DNA cromosómico, tampón de reacción de HindIII y EcoRI (B de Boehringer) 1X y 20 U de cada una de las enzimas. Las reacciones se incubaron toda la noche a 37°C.

### **16.3. Separación de los fragmentos de DNA**

Una vez digerido el DNA, los fragmentos generados por las enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

### **16.4. Desnaturalización del DNA**

Tras verificar que la electroforesis previa había permitido la correcta separación de los fragmentos de DNA se procedió a la depurinación sumergiendo el gel en 250 ml de una solución de ClH 250 mM durante 15 minutos en agitación suave. Tras lavar con agua destilada, se desnaturalizó el DNA con una solución de NaOH 0.5 N y ClNa 1.5 M durante 15 minutos en agitación suave. Este paso se repitió dos veces lavando con agua destilada cada vez. Finalmente se neutralizó el gel incubando dos veces con Tris 1 M ClNa 1.5 M durante 15 minutos.

### **16.5. Transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nylon**

Mientras se desnaturalizaba el DNA, se cortó la membrana 1 cm más larga que el gel en ambas dimensiones y dos láminas de papel Whatman 3MM, una del mismo tamaño que la membrana y otra más larga. Se sumergió la membrana en agua destilada hasta comprobar que se humedecía por completo y asegurar que no presentaba restos de grasa en su superficie, ni estaba deteriorada, y posteriormente en tampón de transferencia SSCX10 (apartado 4.3.5 de *Materiales*) durante 5 minutos. En este mismo tampón se introdujo el papel filtro 3MM y se procedió a montar todos los elementos según se muestra en la figura 11. La lámina de papel 3MM más larga se colocó encima del soporte, de manera que los dos bordes del papel estuvieran sumergidos en el tampón SSCX10. A continuación se colocó el gel de forma invertida y, sobre éste, la membrana. Encima de la membrana se colocó el papel 3MM más pequeño y finalmente una pila de papeles absorbentes del mismo tamaño. Sobre el conjunto se situó una lámina de vidrio y un peso de unos 500 gramos. En todo momento se evitó que

quedaran atrapadas burbujas de aire entre el gel, la membrana y las hojas de papel Whatman.



**Fig. 11.** Esquema de la disposición de elementos durante la transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nylon.

El DNA se mantuvo transfiriendo de cuatro a ocho horas, durante las que se reemplazaron periódicamente los papeles absorbentes húmedos. A continuación se retiró la membrana y se lavó con SSCX6 durante 5 minutos para eliminar los restos de agarosa que pudieran haberse adherido a la membrana. Acto seguido se secó la membrana y se verificó que la transferencia había sido completada tiñendo de nuevo el gel con una solución de tampón TAE con bromuro de etidio a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  durante 45 minutos y examinándolo mediante iluminación con ultravioleta.

Para fijar el DNA a las membranas de transferencia se empleó una lámpara de luz ultravioleta (254 nm) suministrada por Amersham (Modelo RPN2500). La intensidad de energía empleada fue 120  $\text{mJ/s cm}^2$  y el tiempo de exposición 12 segundos.

### 16.6. Marcaje de las sondas

En este trabajo el DNA se ha marcado con radioisótopos. Los radioisótopos empleados fueron  $^3\text{H}$ , cuyo uso se limitó al marcaje *in vivo* según lo descrito en el apartado 3 de *Métodos*, y  $^{33}\text{P}$  utilizado como  $^{33}\text{P}\text{-}\alpha\text{-dATP}$ .

## Métodos

---

Las sondas fueron construidas por PCR usando como cebadores diseñados para amplificar regiones de los genes detallados en la tabla 2.

Tanto después de la obtención de las sondas por PCR como después de su marcaje con  $^{33}\text{P}$ , éstas fueron purificadas para eliminar los nucleótidos no incorporados mediante precipitación con 0,1 volúmenes de LiCl 4 M y 3 volúmenes de etanol en frío, para una mejor recuperación se añadió 1  $\mu\text{l}$  de glicógeno a 20 mg/ml, que favorece la precipitación, se mezcló bien y se incubó a  $-70^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Pasado este tiempo se centrifugó la reacción a 13.000 g durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , luego se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y eliminado el sobrenadante se secó el sedimento y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de tampón TE, guardándose a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Previamente al marcaje de las sondas se cuantificó su concentración por densitometría de geles.

El marcaje de las sondas se realizó mediante la extensión de cebadores unidos al azar o *random primer*. Si bien este método no permite una amplificación masiva de los fragmentos usados como cebadores, permite minimizar la variación en el rendimiento de la reacción de unos experimentos a otros.

Los cebadores utilizados son oligómeros de 6 nucleótidos aleatorios que hibridan eficientemente con DNA de cadena sencilla para cebar la síntesis de DNA que es llevada a cabo por el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I.

El DNA molde fue desnaturalizado calentándolo en agua a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y, tras este tiempo, rápidamente se pasó a  $0^\circ\text{C}$  para evitar su renaturalización. Durante el protocolo seguido hasta el inicio de la reacción se trabajó a  $0^\circ\text{C}$ .

Se mezclaron, en este orden, 0,5  $\mu\text{g}$  de la sonda desnaturalizada en un volumen de 50  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla de hexanucleótidos 10X (en tampón de reacción 10X), 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla de desoxinucleótidos 1 mM, 3  $\mu\text{l}$  de  $^{33}\text{P}$ - $\alpha$ -ATP 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , y agua milliQ para ajustar el volumen a 95  $\mu\text{l}$ . La reacción comenzó al añadir 5  $\mu\text{l}$  (10 unidades) del fragmento Klenow a la mezcla. La solución se mezcló suavemente y se incubó durante 14 a 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ . La reacción se detuvo mediante la adición de 10  $\mu\text{l}$  de EDTA 200 mM.

La cantidad de marcaje asimilado por las sondas se determinó depositando 1  $\mu\text{l}$  de la suspensión en un filtro de nitrocelulosa. Éste se secó y se le añadió líquido de centelleo para cuantificar la radiactividad en el contador de centelleo.

### **16.7. Hibridación de las sondas al DNA fijado a las membranas**

Se utilizaron membranas de nylon, Hybond N+ de Amersham, de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### 16.7.1. Prehibridación

En este paso previo a la hibridación, las membranas se introdujeron en tubos de vidrio que contenían 20 ml de solución de prehibridación (apartado 4.3.5 de *Materiales*) por cada 100 cm<sup>2</sup> de superficie de membrana y se incubaron en un horno de hibridación, Amersham RPN2510, a 65°C durante un tiempo no inferior a 1 hora y con agitación moderada. Este tratamiento permite bloquear los sitios de unión no específica del DNA a la membrana y de este modo se consigue disminuir el ruido de fondo.

### 16.7.2. Hibridación

Tras la prehibridación se diluyeron las sondas en la solución de hibridación precalentada (idéntica a la de prehibridación). Previamente, cada sonda se había tratado a 100°C durante 10 minutos por separado y se pasó posteriormente a 0°C para mantenerla en estado desnaturalizado. Posteriormente las sondas fueron añadidas a la solución de hibridación y ésta se mantuvo a 65°C durante los momentos anteriores a su uso. En el momento de comenzar la hibridación la solución se calentó hasta los 90°C durante 10 minutos y después se pasó a 55°C en el momento en que iba a ser añadida a las membranas, tras eliminar la solución de prehibridación.

La membrana se incubó en la solución de hibridación que contenía las sondas marcadas, a 55°C durante 14 a 16 horas con agitación suave. Una vez concluido el proceso de hibridación, la solución de hibridación se conservó a -20°C para ser reutilizada.

### 16.7.3. Lavado de las membranas

Las membranas se extrajeron de los tubos de hibridación y se sometieron a un proceso de aclarado. Con esto se consigue eliminar la sonda no unida que provocaría un alto fondo. Las membranas se lavaron dos veces durante 5 minutos en 100 ml de una solución de SSC 2X y SDS al 0,1% a temperatura ambiente y a continuación otras dos veces durante 15 minutos en el mismo volumen de SSC 0,1X y SDS al 0,1% a la misma temperatura de hibridación (55°C). Las soluciones de lavado se precalentaron a la temperatura a la que iban a ser usadas y para cada una de ellas las membranas se pasaron a un recipiente limpio.

### 16.8. Detección

Una vez lavadas las membranas se montaron en una película de plástico transparente y se expusieron durante 3 horas a una pantalla impresionable por  $^{33}\text{P}$  ( $^{33}\text{P}$ -Phosphorscreen de BioRad) en oscuridad. La impresión producida en la pantalla fue registrada por un escáner modelo Molecular Imager FX de BioRad y analizada por el software Quantity One, también de BioRad.

### 17. Análisis de frecuencia de marcadores

Cuando la replicación es bidireccional y su velocidad constante la probabilidad de que un gen se encuentre duplicado aumenta con la cercanía al origen. Así, la frecuencia de un gen en una población celular creciendo exponencialmente quedaría definida como una función exponencial:  $f(x) = 2^{n(1-x)}$ , donde  $x$  representa la distancia al origen de replicación y  $n$  el número de puntos de replicación. Sin embargo cuando la replicación es unidireccional dos genes equidistantes con el origen tendrán distinta frecuencia (Sueoka y Yoshikawa, 1965).

Si se determina la frecuencia con respecto al término de distintos genes localizados en distintas regiones del cromosoma y se establece la relación entre frecuencia y posición, puede hallarse el tipo de replicación que presenta una estirpe determinada. La frecuencia de cada marcador se determinó mediante Southern blot (apartado 16 de *Métodos*), cuantificando la intensidad de cada banda y normalizándola con la correspondiente al término.

Se eligieron marcadores situados en distintas regiones del cromosoma de modo que cada uno hibridase con un fragmento de distinto tamaño (Tabla 2). Como cada marcador se cuantificó mediante la hibridación de una sonda distinta y además cada una de ellas hibridaba con un fragmento de distinto tamaño, no podía compararse directamente la señal correspondiente a las distintas sondas. Por eso se normalizó el valor correspondiente a cada una en cada muestra con su homólogo de un cultivo tratado con rifampicina durante 4 horas.

**Tabla 2.** Sondas empleadas durante el análisis de la frecuencia de marcadores.

<b>Cebadores</b>	<b>Región amplificada</b>	<b>Posición de la sonda (min)</b>
ddpX 1 y 2	<i>ddpX</i>	34
xseA 1 y 2	<i>xseA</i>	57
trpS 1 y 2	<i>trpS</i>	76
mioC 1 y 2	<i>mioC</i>	84
cpdB 1 y 2	<i>cpdB</i>	96
nagA 1 y 2	<i>nagA</i>	15
pyrC 1 y 2	<i>pyrC</i>	24

## 18. Western blot

El Western blot (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979) es a proteínas lo que el Southern blot a DNA. En el Western blot las proteínas separadas electroforéticamente son transferidas del gel a una membrana e hibridadas con un anticuerpo, usualmente sin marcar, que reconoce específicamente un epítipo antigénico en la proteína unida a la membrana. Este anticuerpo es detectado por la unión de algún reactivo inmunológico secundario, como una anti-inmunoglobulina, marcado. Esta técnica es muy útil en la detección y cuantificación de proteínas específicas no marcadas en una mezcla compleja de proteínas. Además, como la separación en electroforesis de las proteínas es llevada a cabo, casi siempre, en condiciones desnaturalizantes, se eliminan los problemas de solubilización, agregación y coprecipitación de la proteína diana con otras proteínas adventicias.

### 18.1. Obtención de extractos celulares

Para la obtención de los extractos proteicos se centrifugaron 20 ml de cultivos de las estirpes deseadas tras haberse aplicado el tratamiento oportuno, y el sedimento de células fue resuspendido en una solución de lisozima en PBS (0,4 mg/ml) cuyo volumen varió dependiendo del tamaño del sedimento. Esta suspensión se mantuvo 30 minutos en hielo y después fue sonicada 4 veces durante 30 segundos cada vez, también en hielo. Se añadió Tritón 100 hasta una concentración final de 1% y se

## Métodos

---

mezcló vigorosamente. El lisado se aclaró centrifugando a 4°C durante 30 minutos a 12.000 g y recogiendo el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante se hirvió durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

Los extractos proteicos fueron cuantificados mediante colorimetría usando el sistema BCA Protein Assay de Pierce. Se añadieron alícuotas de 5 µl de cada extracto celular a 95 µl de agua miliQ y se mezclaron con 1 ml de una solución compuesta por los reactivos A y B del Kit en una proporción 50:1, respectivamente. Tras media hora de incubación a 37°C se midió la absorbencia de cada muestra a 562 nm. Para determinar la concentración de proteína total de cada extracto, los datos de absorbencia obtenidos fueron extrapolados a una recta patrón elaborada siguiendo el mismo proceso, pero con muestras procedentes de una solución de albúmina de suero bovino de concentración conocida.

### **18.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido como SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamina y SDS) descrito por Laemmli y colaboradores (Laemmli, 1970). Se usó el sistema vertical Mini Protean II (BioRad). El gel consta de dos partes: una superior o gel de empaquetamiento de 1 cm de longitud y a continuación una inferior o gel de separación de 5 cm de longitud. El gel de empaquetamiento permite que las proteínas migren a mayor velocidad y, cuando éstas llegan al límite con el gel de separación, la muestra sufre una condensación o empaquetamiento de todas las proteínas en una sola banda. Una vez dentro del gel de separación, las proteínas se separarán formando bandas en función de su masa molecular. Este tipo de electroforesis se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes debido a la presencia de SDS.

Las muestras fueron descongeladas en hielo y llevadas al mismo volumen con agua miliQ. Seguidamente se añadió el tampón de carga a las muestras hasta una concentración 1X y se hirvieron durante 5 minutos. Finalmente, tras un minuto de centrifugación a 10.000 g, se cargaron en el gel. Como patrón de peso molecular se usó un marcador comercial (Prestained SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range de BioRad).

El gel se montó en la cubeta de electroforesis y se añadió tampón de migración 1X en la cámara interna hasta cubrir los pocillos y en la cámara externa hasta superar el límite inferior del gel. El tiempo de carrera fue de 50 minutos, aplicando un campo eléctrico de 150 V.



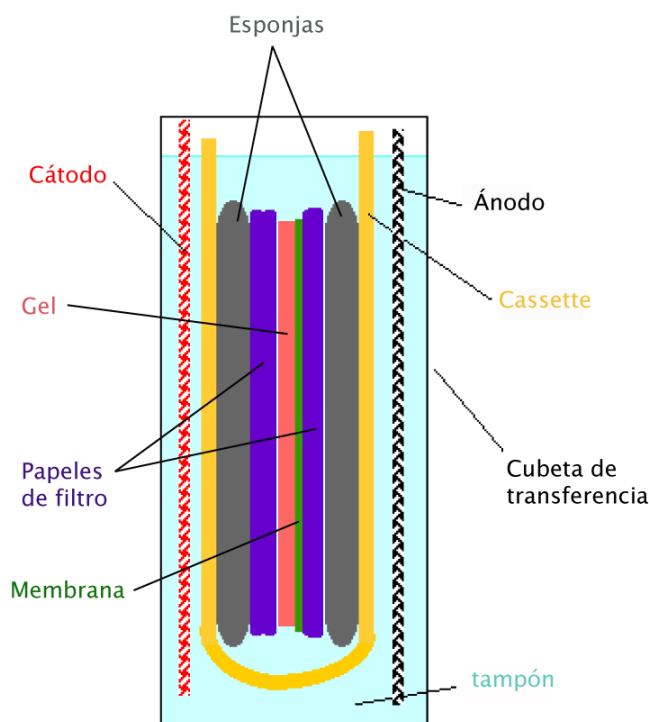
### 18.3. Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Después de completarse la electroforesis se extrajo el gel, se le retiró la porción superior correspondiente al gel de empaquetamiento y el resto se montó sobre tres papeles Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel, previamente humedecido en tampón de transferencia 1X.

Encima del gel se colocó la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL de Amersham), cortada del mismo tamaño que el gel, que había permanecido sumergida en tampón de transferencia durante 15 minutos. Después se colocaron otros tres papeles de filtro humedecidos y se eliminaron las posibles burbujas que pudieran haber quedado atrapadas. Finalmente, todo el conjunto se situó entre dos esponjillas empapadas en tampón de transferencia y se colocó en el cassette de transferencia.

Se utilizó el sistema de transferencia húmeda (Trans-Blot cell de BioRad). La transferencia se realizó a 4°C durante 12 horas ajustando la intensidad de corriente a 84 mA.

Una vez terminada la transferencia se lavó la membrana con agua destilada y se tiñó con Rojo Ponceau durante 5 minutos para observar si la transferencia había sido correcta. Después se destiñó la membrana lavando brevemente con PBS-Tween al 0,2%.



**Fig. 12.** Esquema de la disposición de elementos durante la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa.

### **18.4. Inmunodetección de las proteínas**

Después de comprobar que la transferencia había sido correcta se bloqueó la membrana con leche en polvo al 10% en PBS-Tween 0,2% durante una hora a temperatura ambiente con agitación moderada, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo con la membrana.

A continuación se eliminó la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario diluido 3.000 veces en leche en polvo al 10% en PBS-Tween 0,2% y se incubó toda la noche a 4°C en agitación suave. Después llevaron acabo 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tween 0,2% y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 3.000 veces en leche en polvo al 10% en PBS-Tween 0,2% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada. Tras esta incubación se lavó otras 5 veces con PBS-Tween 0,2% durante 5 minutos cada vez y se pasó al revelado de la membrana.

Como el anticuerpo secundario usado llevaba acoplada la enzima peroxidasa, se usó un método de revelado basado en la quimioluminiscencia producida por la reacción de esta enzima en presencia de luminol. Concretamente, se usó el Kit SuperSignal West Pico de Pierce Biotechnology según las instrucciones de uso del proveedor.

La detección se realizó impresionando con la membrana una pantalla sensible a quimioluminiscencia (Imager Screen Chemi de BioRad) durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente la pantalla fue escaneada por un escáner modelo Molecular Imager FX de BioRad y analizada por el software Quantity One de BioRad.

# *Resultados*



## Capítulo 1

### ***Requerimientos de enzimas de recombinación en la replicación de una estirpe *nrdA101* en presencia de rifampicina***

#### ***Resumen:***

En este capítulo se determinó el requerimiento de las enzimas de recombinación RecA, RecB, RuvABC y RecG para la replicación cromosómica que lleva a cabo un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva en presencia de rifampicina. Se encontró que la capacidad de completar las rondas de replicación en este contexto es totalmente dependiente de RecA. Se observó una extensiva degradación cromosómica en el doble mutante *nrdA101 recA* en estas condiciones que no es complementada por la clonación del alelo *recA525P*.

Estos resultados sugieren que RecA está implicada en la estabilización de las horquillas de replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva en ausencia de síntesis de RNA y/o proteínas.

## *Resultados*

---

Conocida la implicación de la maquinaria de recombinación en el avance de las horquillas de replicación hasta la región del término observada en el mutante *nrdA101* a temperatura permisiva (Guarino et al., 2007a), el primer punto afrontado en este trabajo fue el requerimiento de las enzimas de recombinación en la replicación termorresistente que realiza un mutante *nrdA101* a 42°C en presencia de rifampicina.

Para llevar a cabo esta parte del estudio se construyeron estirpes deficientes en procesos de recombinación introduciendo en la estirpe *nrdA101* y su parental *nrdA*<sup>+</sup> mutaciones en los genes *recA*, *recB*, *ruvABC* y *recG* por transducción generalizada con el fago P1.

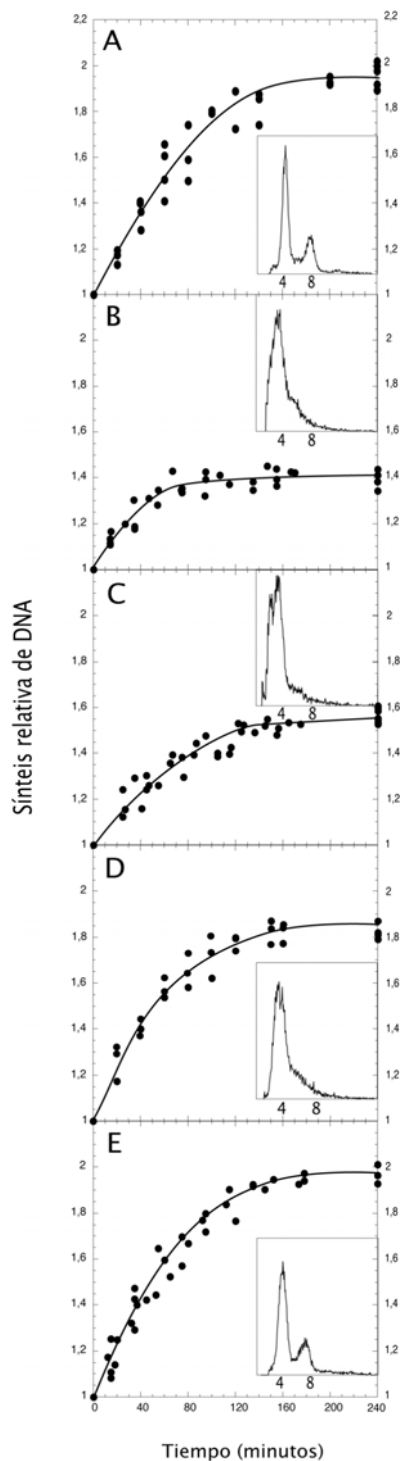
### **1.1. Requerimientos a temperatura permisiva en presencia de rifampicina**

En primer lugar se analizó la síntesis de DNA, mediante acumulación de <sup>3</sup>H-TdR y citometría de flujo, en cultivos de mutantes *nrdA101* deficientes en recombinación tras adición de rifampicina a temperatura permisiva (Fig. 13).

La síntesis relativa de DNA tras la adición de rifampicina ( $\Delta G$ , ver apartado 3.2.2 de *Métodos*) en el mutante *nrdA101 recA* y en el *nrdA101 recB* fue de 45% y 55% respectivamente. Dado que el mutante simple *nrdA101* acumula un 90% de su DNA en estas condiciones, estos resultados sugieren que las horquillas de replicación se detienen prematuramente en los dobles mutantes. Sin embargo, las estirpes *nrdA101 recG* y *nrdA101 ruvABC* no parecen tener graves problemas en su replicación si comparamos los valores de  $\Delta G$  obtenidos en estos dobles mutantes con respecto al mutante simple *nrdA101*.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo de cada estirpe incubada a 30°C tras adición de rifampicina (Fig. 13, paneles pequeños) muestran que en ninguno de los dos casos aparecen picos correspondientes a poblaciones de células con cromosomas completamente replicados, indicando que la disminución en el valor de  $\Delta G$  se debe a replications inacabadas y que tanto RecA como RecB son parcialmente requeridas en una estirpe *nrdA101* para finalizar correctamente las replications a temperatura permisiva. En ausencia de RecG (Fig. 13-D) el pico que corresponde a la población de células con ocho cromosomas desaparece, lo que sugiere que la segunda ronda de replicación está encontrando dificultades para completar los cromosomas correctamente. La figura 13-E muestra picos correspondientes a poblaciones de células con 4 y 8 cromosomas, lo que indica que la ausencia de RuvABC no impide que se completen las rondas de replicación en marcha.

## Resultados



En resumen, los datos obtenidos tras el análisis de los requerimientos de la maquinaria de recombinación en un mutante *nrdA101* a 30°C revelan que se dan procesos llevados a cabo por RecA, RecB y en menor medida RecG necesarios para que las replications lleguen a término cuando la iniciación está inhibida por la acción de la rifampicina.

**Fig. 13.** Síntesis relativa de DNA y citometrías de flujo (paneles pequeños) de estirpes derivadas de JS1018 deficientes en recombinación tras la adición de rifampicina a 30°C. JS1018 (*nrdA101*) (A), JS627 (*nrdA101 recA*) (B), JS628 (*nrdA101 recB*) (C), JS767 (*nrdA101 recG*) (D) y JS704 (*nrdA101 ruvABC*).



## **1.2. La proteína RecA es absolutamente requerida para la replicación del DNA en una estirpe *nrdA101* a 42°C en ausencia de síntesis de proteínas**

Para dilucidar si la maquinaria de recombinación es necesaria en la síntesis de DNA de un mutante *nrdA101* a 42°C bajo inhibición de la transcripción se procedió al estudio de la replicación a 42°C en presencia de rifampicina en las estirpes *nrdA101* deficientes en recombinación.

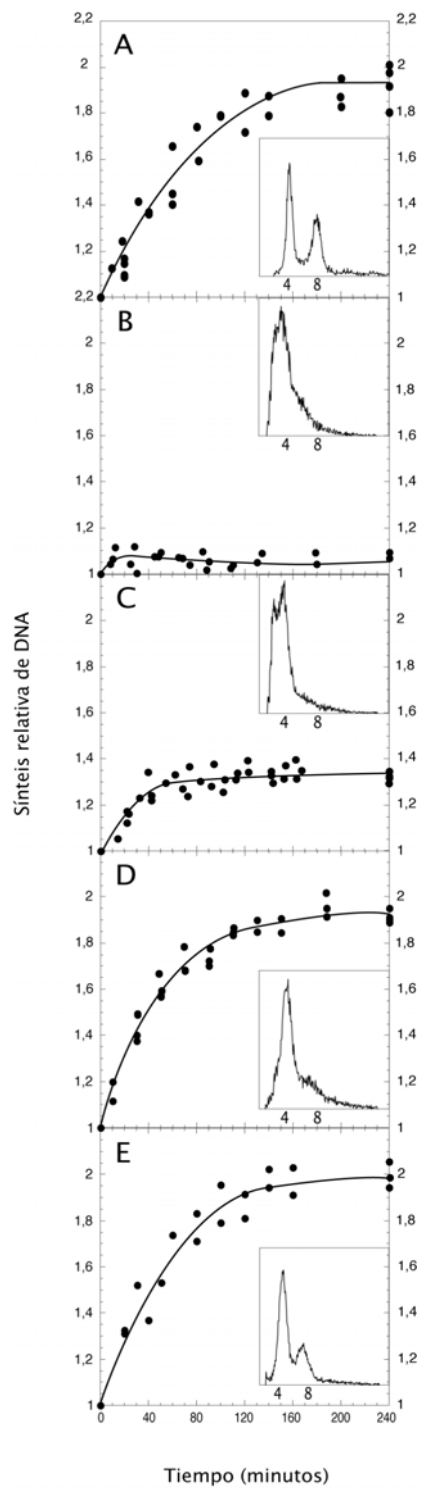
En estas condiciones, se determinó la síntesis de DNA y la citometría de flujo del mismo modo en que se realizó a 30°C. Los resultados obtenidos muestran que las estirpes *nrdA101 recG* y *nrdA101 ruvABC* tienen un comportamiento semejante al que muestran a 30°C con rifampicina (Fig. 14-D y E). Esto indica que RecG y/o RuvABC no son requeridas para completar la replicación cromosómica tras la adición de rifampicina a 42°C. En el doble mutante *nrdA101 recG* la segunda ronda de replicación parece tener alguna dificultad en alcanzar el término, como fue observado a temperatura permisiva.

El mutante *nrdA101 recB* presenta una síntesis relativa de un 35% y está muy lejos de completar las rondas de replicación (Fig. 14-C). Esto sugiere que RecB posee alguna función en el avance de las horquillas de replicación de un mutante *nrdA101* en estas condiciones.

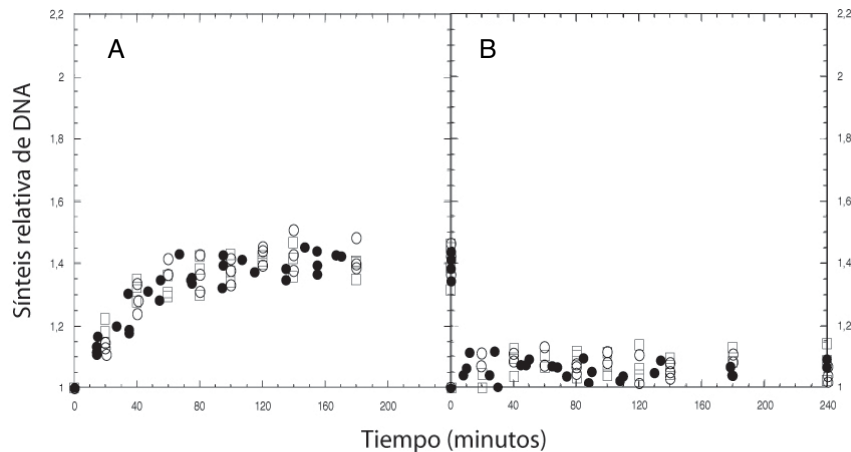
El efecto más radical sobre la replicación de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva bajo inhibición de síntesis de RNA se produce cuando RecA está ausente (Fig. 14-B). En estas condiciones la acumulación de DNA se detiene instantáneamente. Los resultados de citometría de flujo muestran que, como era esperable, no hay finalización de ninguna de la rondas de replicación ya iniciadas. Esto significa que RecA juega un papel absolutamente requerido en la progresión de la horquilla de replicación a 42°C en presencia de rifampicina y que esta función no es tan necesaria a 30°C, temperatura en la que consigue una acumulación de DNA del 45%.

Para verificar que este efecto no estaba causado específicamente por la inhibición de la síntesis de RNA tras la adición de rifampicina se determinó la síntesis de DNA del doble mutante *nrdA101 recA* a 30°C y 42°C, mediante adición de cloranfenicol o eliminación de aminoácidos. La figura 15 muestra que la adición de cloranfenicol y la carencia de aminoácidos a 42°C provocan en esta estirpe una acumulación de DNA semejante a la obtenida con rifampicina, es decir, prácticamente nula. De estos datos se deduce que la dependencia de RecA en la replicación de un mutante *nrdA101* a 42°C en presencia de rifampicina no se debe al efecto de la inhibición de la síntesis de RNA exclusivamente, sino que se produce tras la inhibición de la síntesis de RNA y/o proteínas en condiciones restrictivas.

## Resultados



**Fig. 14.** Síntesis relativa de DNA y citometrías de flujo (paneles pequeños) en estirpes derivadas de JS1018 deficientes en recombinación tras la adición de rifampicina a 42°C. JS1018 (*nrdA101*) (A), JS627 (*nrdA101 recA*) (B), JS628 (*nrdA101 recB*) (C), JS767 (*nrdA101 recG*) (D) y JS704 (*nrdA101 ruvABC*) (E).



**Fig. 15.** Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS627 (*nrdA101 recA*) tras adición de rifampicina (●), cloranfenicol (○) o eliminación de los aminoácidos requeridos (□) a 30°C (A) o 42°C (B) a tiempo cero.

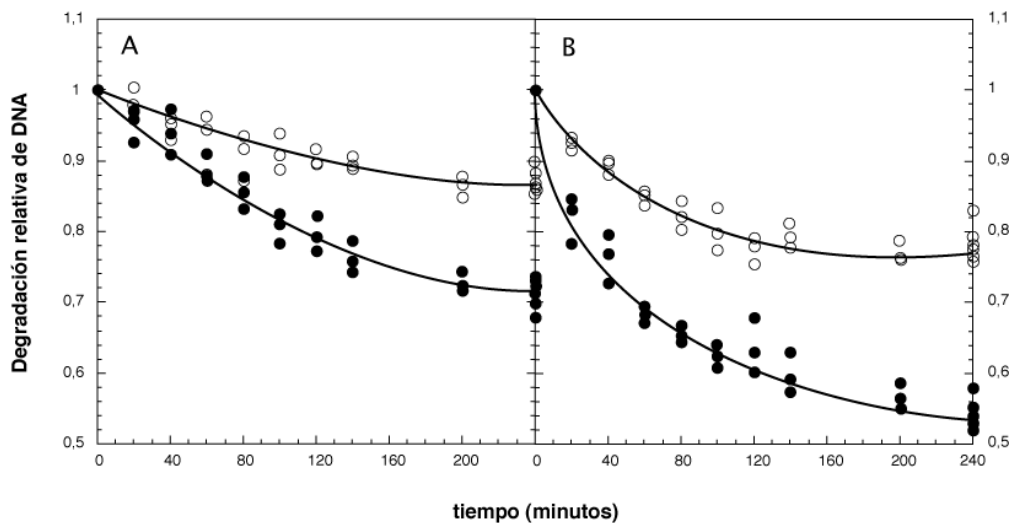
### 1.3. Degradación cromosómica en el doble mutante *nrdA101 recA*

Tras observar el grave efecto que produce la carencia de RecA en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva en ausencia de síntesis de proteínas se examinó la posibilidad de que este efecto estuviera relacionado con la degradación del DNA, ya que desde hace tiempo se conoce que la inhibición de la síntesis de proteínas en mutantes *recA* provoca degradación cromosómica (Skarstad y Boye, 1988; Skarstad y Boye 1993).

La cuantificación de la degradación del DNA se llevó a cabo en cultivos creciendo en medio mínimo tras la adición de rifampicina, como se detalla en el apartado 3.2.3 de *Métodos*. Como puede observarse en la figura 16, tanto el mutante simple *recA* como el doble mutante *nrdA101 recA* muestran degradación a 30°C y 42°C. Los resultados indican además que la incubación a 42°C favorece este proceso en mutantes *recA* nulos, ya que la disminución de la radiactividad incorporada en el DNA es más acusada a esta temperatura en ambas estirpes. Sin embargo, el doble mutante *nrdA101 recA* muestra una degradación sensiblemente mayor que el mutante sencillo *recA* a temperatura permisiva y, en mayor grado, a la restrictiva. El resultado neto entre la replicación y la rápida degradación cromosómica que se produce en estas

## Resultados

condiciones en la estirpe JS627 podría explicar la aparente parada de la replicación que se aprecia al medir la acumulación de DNA. Estos resultados sugieren que probablemente en el doble mutante *nrdA101 recA* no se esté produciendo una parada brusca de la replicación a 42°C tras adición de rifampicina sino una extensiva degradación cromosómica compensada con cierto grado de replicación.



**Fig. 16.** Degradación cromosómica en JK625 (*nrdA*<sup>+</sup> *recA*) (A) y JS627 (*nrdA101 recA*) (B) tras adición de rifampicina a 30°C (○) o a 42°C (●) en el tiempo cero.

### 1.4. *Papel de RecA en la estabilización de las horquillas de replicación en una estirpe nrdA101 a 42°C en ausencia de síntesis de RNA y/o de proteínas*

RecA realiza multitud de funciones relacionadas con el metabolismo del DNA. Esta enzima es clave no sólo en procesos de reparación del DNA por recombinación homóloga y en la recuperación de horquillas paradas por vía de recombinación homóloga; en los últimos años se ha puesto de manifiesto que la proteína RecA juega también un importante papel en el mantenimiento de la integridad de las horquillas paradas (Courcelle y Hanawalt, 2003).

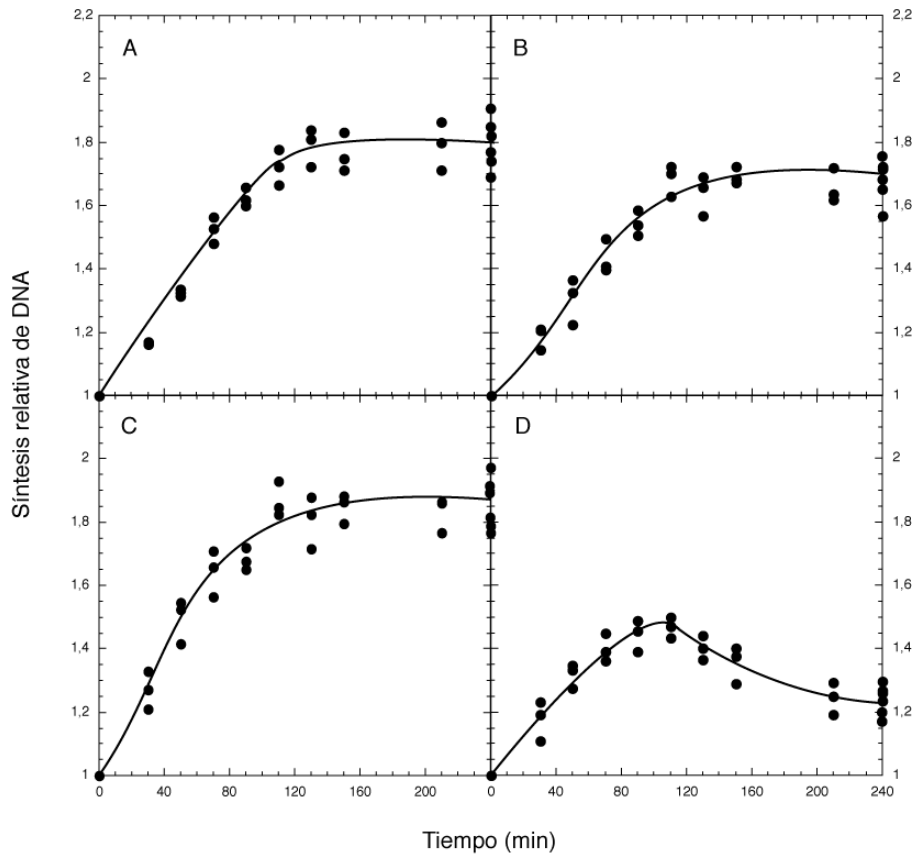
Tras observar la abundante degradación del DNA que se produce en el doble mutante *nrdA101 recA* a temperatura restrictiva se planteó la hipótesis de que RecA

podía tener una función como estabilizador de las horquillas de replicación paradas en un mutante *nrdA101*. Para verificar esta posibilidad se transformó a JS627 con el plásmido pRecAS25P o con pRecA. pRecAS25P y pRecA son derivados de pT7-7 (Tabor y Richardson, 1985) que portan el alelo mutante *recAS25P* y el gen silvestre *recA* respectivamente. *recAS25P* es un alelo mutante identificado recientemente que codifica una proteína RecA activa en recombinación homóloga, reparación del DNA, inducción de SOS y mutagénesis asociada a SOS, pero que no complementa el lento crecimiento de un doble mutante  $\Delta mgsA \Delta recA$ , la letalidad de un *polA12 \Delta recA* ni la sensibilidad a la inhibición de la Girasa B por coumermicina de un  $\Delta recA$  (Shibata *et al.*, 2005). En base a estos resultados Shibata y colaboradores propusieron en 2005 que la función de RecA en el mantenimiento de la integridad de las horquillas de replicación paradas es independiente de su papel en recombinación homóloga y reparación por recombinación y que la proteína codificada por el alelo *recAS25P* es deficiente en dicha función.

Una vez obtenidos los transformantes se analizó su síntesis de DNA en medio mínimo tras adición de rifampicina a 30°C y a 42°C. Como se muestra en la figura 17, el doble mutante portador de pRecA consigue una acumulación relativa de DNA de alrededor de un 80% a 30°C y un 70% a 42°C en presencia de rifampicina. Atendiendo a que la síntesis de DNA del doble mutante *nrdA101 recA* tras la adición de rifampicina a 30°C y a 42°C es de un 40% y prácticamente nula, respectivamente, puede afirmarse que la expresión de RecA silvestre desde pRecA complementa la mutación de *recA* en el cromosoma. Sin embargo, aunque el alelo *recAS25P* complementa la carencia de RecA a 30°C (Fig. 17-C), esto no ocurre a 42°C (Fig. 17-D). En este caso se produce acumulación de DNA durante un tiempo y después se observa degradación cromosómica.

La diferencia existente entre el comportamiento de la estirpe *nrdA101 recA / pRecAS25P* a 30°C y 42°C revela que, a la temperatura restrictiva, un mutante *nrdA101* requiere una función de RecA que está ausente en RecAS25P.

## Resultados



**Fig. 17.** Síntesis relativa de DNA de las estirpes JS881 (*nrdA101 recA* / pRecA) (A y B) y JS882 (*nrdA101 recA* / pRecAS25P) (C y D) tras adición de rifampicina a 30°C (A y C) y a 42°C (B y D).

## Capítulo 2

### ***La inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas no es necesaria para que un mutante *nrdA101* complete las rondas de replicación a temperatura restrictiva***

#### **Resumen:**

En este capítulo se comprobó que la inhibición de la síntesis de proteínas permite la replicación íntegra de los cromosomas en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva como ocurre con la inhibición de la síntesis de RNA (por adición de rifampicina).

Dado que estos procesos son requeridos para el inicio de la replicación, se abordó la hipótesis de que la inhibición del inicio fuera la condición requerida para que un mutante *nrdA101* complete la replicación a temperatura restrictiva.

Los resultados obtenidos revelan que la inactivación de DnaA permite completar las rondas de replicación a 42°C en una estirpe *nrdA101* en ausencia de rifampicina, lo que demuestra que la inhibición de la síntesis de RNA no es necesaria para la replicación íntegra de los cromosomas a temperatura restrictiva en este mutante.

## *Resultados*

---

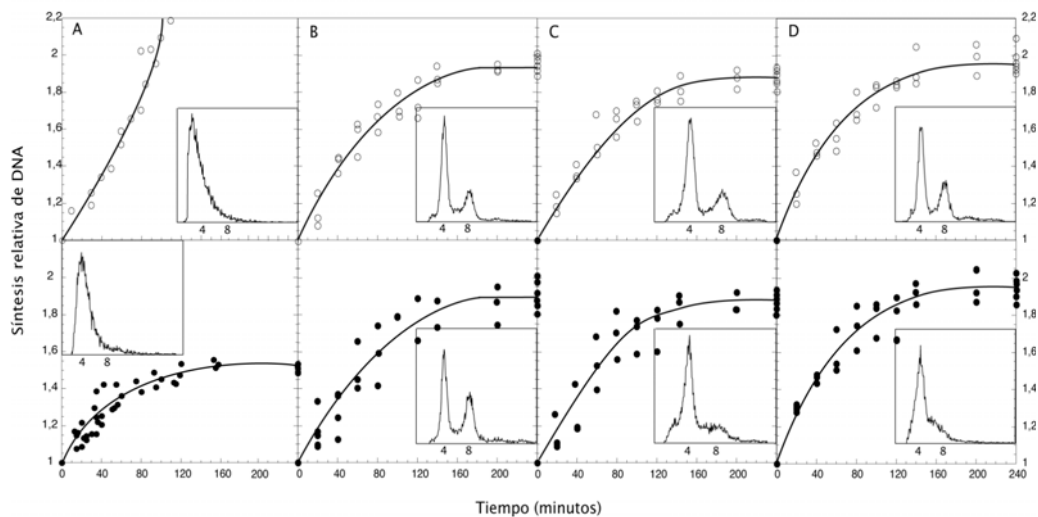


### 2.1. La inhibición de la síntesis de proteínas permite a un mutante *nrdA101* completar las rondas de replicación a temperatura restrictiva

El segundo punto abordado en este trabajo fue determinar las causas que permiten a un mutante *nrdA101* replicar íntegramente su cromosoma a temperatura restrictiva en presencia de rifampicina.

En primer lugar se examinó si la inhibición de la síntesis de RNA provocada específicamente por la adición de rifampicina es la condición exclusiva que permite la replicación completa de los cromosomas en un mutante *nrdA101* a 42°C. Para ello se midió la síntesis de DNA de la estirpe JS1018 a 42°C bajo dos tratamientos diferentes que inhiben directamente la síntesis de proteínas: la adición de cloranfenicol o la eliminación de los aminoácidos requeridos por la estirpe para su crecimiento.

En la figura 18 se muestra la acumulación residual de DNA y la citometría de flujo de un mutante *nrdA101* obtenidas tras la adición de cloranfenicol o en ausencia de aminoácidos a 30°C y 42°C. Se aprecia que la acumulación de DNA en ambos tratamientos es similar a la que se observa en presencia de rifampicina. Esto sugiere que la termorresistencia de la replicación en esta estirpe no depende exclusivamente de la adición de rifampicina ya que otros tratamientos que causan la inhibición de la síntesis de proteínas conducen al mismo resultado.



**Fig. 18.** Síntesis de DNA y citometría de flujo (paneles pequeños) de JS1018 (*nrdA101*) a 30°C (paneles superiores) y tras cambio a 42°C a tiempo cero (paneles inferiores) tras la inhibición de la síntesis de proteínas. A, sin ningún tratamiento adicional; B, tras adición de rifampicina a tiempo cero; C, tras adición de cloranfenicol a tiempo cero; y D, tras eliminación de aminoácidos a tiempo cero.

## Resultados

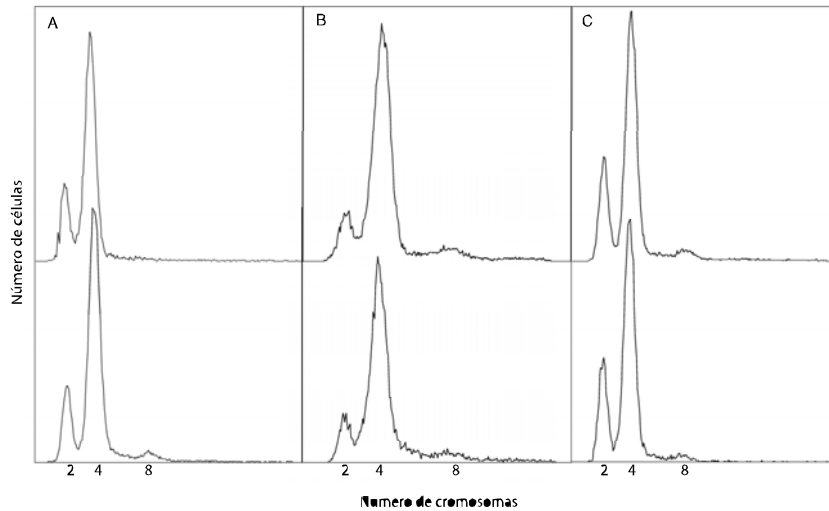
---

El análisis por citometría de flujo de las muestras extraídas tras 4 horas de tratamiento revela que en la estirpe JS1018 (*nrdA101*) la mayoría de las células se agrupa en picos que se corresponden a una cantidad de DNA equivalente a cromosomas completamente replicados tanto a 30°C como a 42°C. No obstante, en las citometrías de flujo de los tratamientos con cloranfenicol y, sobre todo, carencia de aminoácidos (Fig. 18-C y D) puede apreciarse que, aunque el pico de células con 4 cromosomas está bien definido a 42°C, la proporción de células con 8 cromosomas disminuye con respecto al tratamiento con rifampicina, indicando que algunas de las horquillas de replicación no consiguen alcanzar el término.

Para comprobar que las diferencias entre los tratamientos a 42°C en la estirpe JS1018 (*nrdA101*) están causadas por el efecto que sobre la replicación tiene la presencia de una NDP reductasa alterada y no por el fondo genético de esta estirpe, se realizó la citometría de flujo de su estirpe isogénica JK607 (*nrdA*<sup>+</sup>) en presencia de rifampicina, cloranfenicol o carencia de aminoácidos a 30°C y 42°C (Fig. 19). En este caso, el contenido en DNA por célula es similar en las tres condiciones y no se aprecian variaciones en el número de cromosomas por célula entre 30°C y 42°C.

Esto sugiere que las condiciones creadas en la célula por la adición de cloranfenicol o eliminación de aminoácidos afectan de algún modo a la replicación de un mutante *nrdA101* impidiendo que una proporción de células acabe con todos los cromosomas completamente replicados. El hecho de que el número de cromosomas por célula obtenidos tras los tratamientos sea menor en la estirpe JK607 (2 ó 4 cromosomas en lugar de 4 u 8) se debe a que ésta posee una velocidad de replicación mayor que JS1018 y por tanto un menor solapamiento de ciclos de replicación en crecimiento exponencial a 30°C.

Estos resultados indican que la inhibición de la síntesis de RNA no es la condición exclusiva que permite el avance de las horquillas de replicación hasta el término ya que la inhibición de síntesis de proteínas también permite que la mayoría de las rondas de replicación concluyan proporcionando cromosomas completamente replicados.



**Fig. 19.** Citometría de flujo de JK607 (*nrdA*<sup>+</sup>) tras cuatro horas de incubación en presencia de rifampicina (A), de cloranfenicol (B), y tras carencia de aminoácidos (C) a 30°C (paneles superiores) y 42°C (paneles inferiores).

## 2.2. Inhibición del inicio de la replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva

En el apartado anterior se vio que una estirpe *nrdA101* tiene capacidad para replicar cromosomas completos bajo inhibición de la transcripción y/o traducción. Dado que el inicio de la replicación en *E. coli* requiere tanto la síntesis de proteínas como la de RNA, nos planteamos si la capacidad del mutante *nrdA101* de replicar íntegramente los cromosomas a temperatura restrictiva podría ser consecuencia de la inhibición de nuevas rondas de replicación.

La aproximación experimental escogida fue la construcción del doble mutante *nrdA101 dnaA46* y el estudio de su replicación a 42°C. La proteína DnaA es uno de los principales factores requeridos para el inicio de la replicación. El alelo *dnaA46* es una de las mutaciones del gen *dnaA* mejor descritas en *E. coli*. Se trata de una sustitución de alanina a valina en la posición 184, junto al sitio de unión de ATP en el motivo Walker A (Hansen *et al.*, 1992), lo que provoca que la proteína DnaA46 sea defectiva en la unión de ADP o ATP a cualquier temperatura (Carr y Kaguni, 1996; Hansen *et al.*, 1992; Hwang y Kaguni, 1988; Katayama y Kornberg, 1994). El cambio de aminoácido en la posición 184 está considerado como letal, ya que todos los mutantes A184V portan una

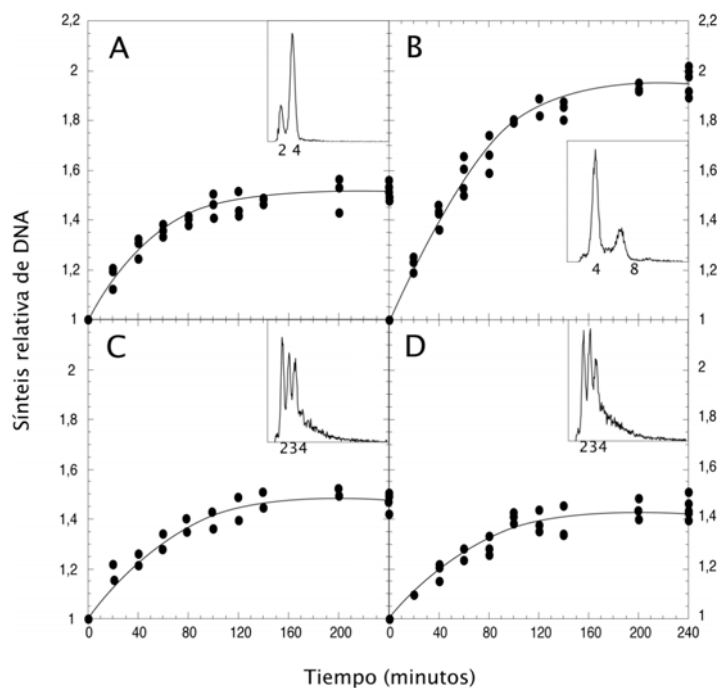
## Resultados

mutación secundaria dentro de *dnaA*. Se piensa que estas mutaciones secundarias podrían aliviar la letalidad causada por el cambio A184V en solitario, pero dejan una proteína DnaA alterada termolábil (Hansen *et al.*, 1992). En DnaA46 la mutación secundaria supone el cambio H252Y. Un mutante *dnaA46* es incapaz de iniciar la replicación a 42°C. El alelo *dnaA46*, por tanto, ofrece unas condiciones idóneas para el análisis de la replicación a temperatura restrictiva ya que inhibe la iniciación sin afectar a la transcripción ni a la traducción.

### 2.2.1. Determinación de los parámetros de ciclo celular de los mutantes *dnaA46* a 30°C

Tras la construcción de las nuevas estirpes *nrdA101 dnaA46* y *nrdA<sup>+</sup> dnaA46*, y después de realizar las comprobaciones descritas en *Métodos* (apartado 10.3), se determinaron los parámetros de ciclo celular de las estirpes obtenidas. El tiempo de generación ( $\tau$ ) se calculó a partir de la cuantificación del tiempo de duplicación de la masa y el periodo C a partir del  $\Delta G$  a temperatura permisiva (Fig. 20), como se describe en el apartado 3.2.2 de *Métodos*.

El  $\Delta G$  de los mutantes *dnaA46* se cuantificó midiendo la síntesis de DNA tras la adición de rifampicina en cultivos creciendo a 30°C en medio mínimo suplementado con casaaminoácidos.



**Fig. 20.** Síntesis de DNA y citometrías de flujo (paneles pequeños) de JK607 (*nrdA<sup>+</sup>*) (A), JS1018 (*nrdA101*) (B), JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*) (C) y JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (D) tras cuatro horas de incubación a 30°C en presencia de rifampicina.

Se aprecia un descenso a un 45% en la síntesis residual de DNA en presencia de rifampicina en la estirpe mutante *nrdA101 dnaA46* con respecto al mutante simple *nrdA101*, no observándose este descenso en el mutante *nrdA<sup>+</sup> dnaA46* con respecto a su parental *nrdA<sup>+</sup> dnaA<sup>+</sup>* (Fig. 20). Esta disminución en el valor del  $\Delta G$  implica un drástico acortamiento del periodo C, que pasa de 158 minutos en JS1018 (*nrdA101*) a 92 minutos en JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (Tabla 3).

Las citometrías de flujo realizadas en las muestras procedentes del doble mutante *nrdA101 dnaA46* y del mutante simple *dnaA46* tras cuatro horas de incubación a temperatura permisiva en presencia de rifampicina y cefalexina reflejan que en ambos casos las células se agrupan en picos correspondientes a 2, 3 y 4 cromosomas (Fig. 20, paneles pequeños). La existencia de una población de células con 3 cromosomas indica que se están produciendo replications asincrónicas, es decir, inicios de replicación que no se producen en todos los orígenes disponibles en la célula en un mismo ciclo o que se producen en momentos diferentes dentro del mismo ciclo. En otras palabras, el alelo mutante *dnaA46* confiere a JS1018 (*nrdA101*) y a su parental JK607 (*nrdA<sup>+</sup>*) una replicación asincrónica. Este efecto del alelo *dnaA46* ha sido descrito anteriormente por otros autores (Boye *et al.*, 1988; Skarstad *et al.*, 1988).

**Tabla 3.** Parámetros de ciclo celular a 30°C de JK607, JS1018, JK876 y JS875.

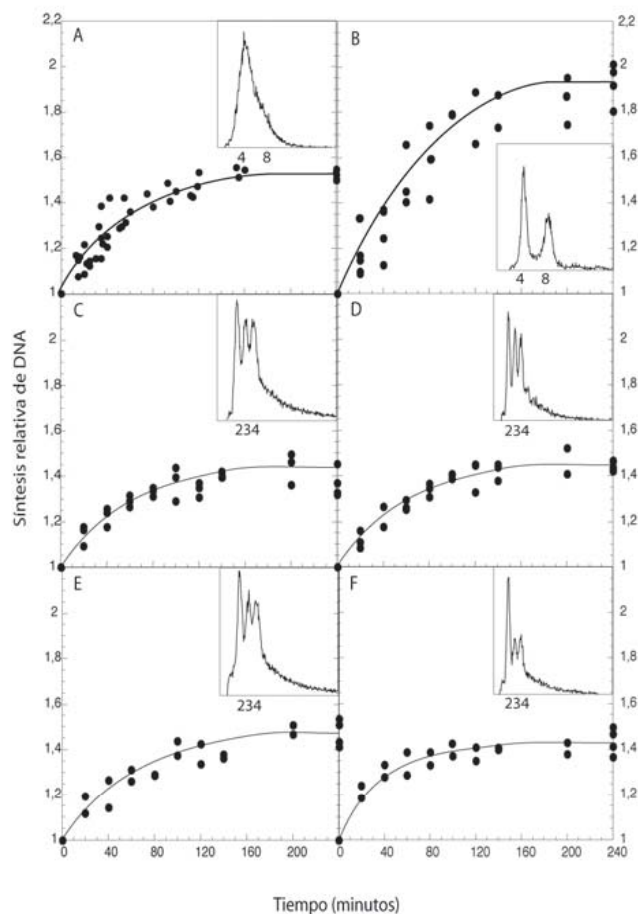
<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo relevante</i>	$\tau$ (min)	$\Delta G$ (%)	<i>n</i>	<i>C</i> (min)
JK607	<i>nrdA<sup>+</sup></i>	75	52	1,31	98
JS1018	<i>nrdA101</i>	75	90	2,10	158
JK876	<i>nrdA<sup>+</sup> dnaA46</i>	80	47	1,19	95
JS875	<i>nrdA101 dnaA46</i>	80	45	1,15	92

## Resultados

### 2.2.2. Efecto del alelo *dnaA46* sobre la replicación cromosómica de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva

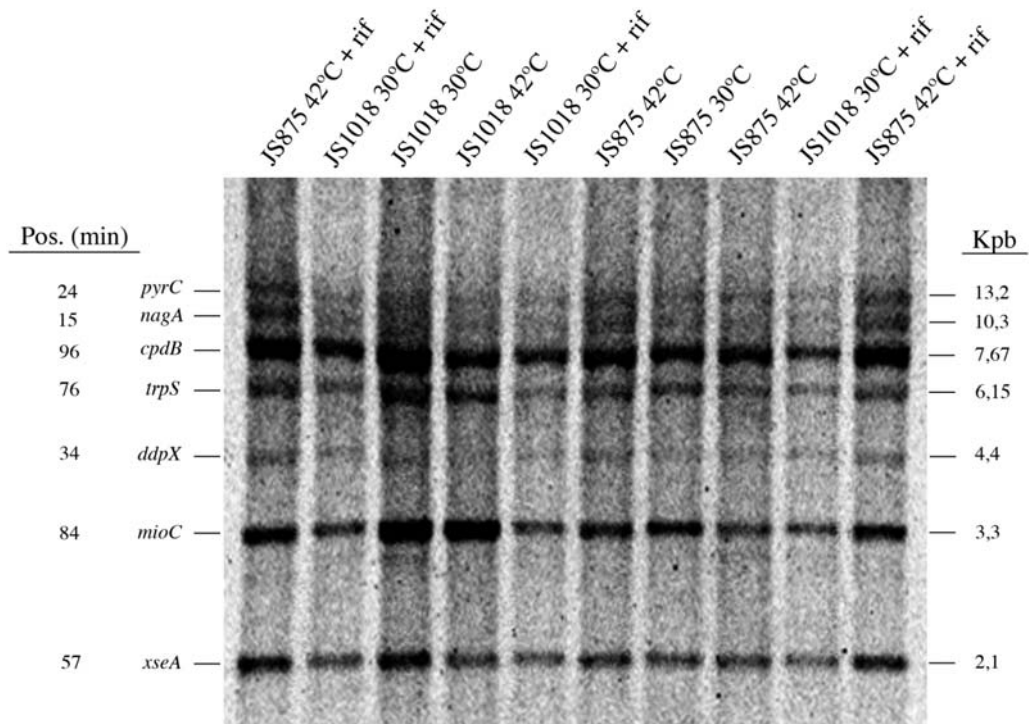
El principal objetivo de la construcción del doble mutante *nrdA101 dnaA46* fue analizar la síntesis de DNA en condiciones en las que se inhibieran las nuevas rondas de replicación en un mutante *nrdA101* a 42°C sin alterar la síntesis de proteínas ni RNA, dos procesos requeridos para el inicio de nuevas rondas de replicación en *E. coli*.

Cultivos de las estirpes *nrdA101*, *nrdA101 dnaA46* y *nrdA<sup>+</sup> dnaA46* se crecieron exponencialmente a 30°C y a tiempo cero se incubaron a 42°C en presencia o ausencia de rifampicina y se midió la síntesis de DNA y el contenido en DNA por célula (Fig. 21). Como se observa, a diferencia del mutante simple *nrdA101*, el doble mutante *nrdA101 dnaA46* alcanza un incremento a 42°C similar al que consigue a 42°C en presencia de rifampicina.



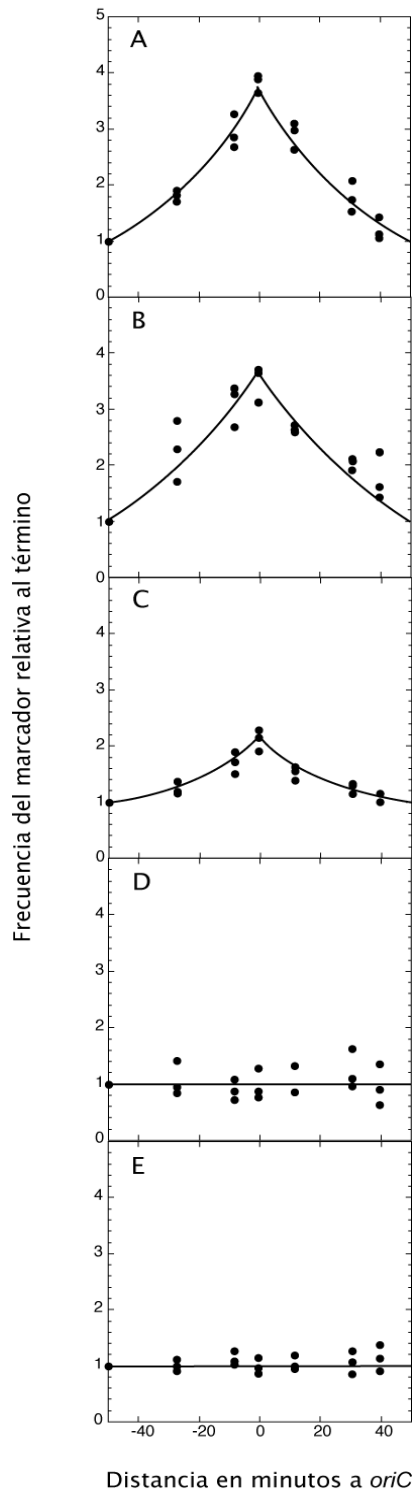
**Fig. 21.** Síntesis de DNA y citometrías de flujo (paneles pequeños) de JS1018 (*nrdA101*) (A y B), JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (C y D) y JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*) (E y F) tras cuatro horas de incubación a 42°C (gráficas de la izquierda) o a 42°C tras la adición de rifampicina (gráficas de la derecha) a tiempo cero.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo en la estirpe JS875 (*nrdA101 dnaA46*) muestran un perfil muy diferente del obtenido con la estirpe JS1018 (*nrdA101*). En JS1018 a 42°C, en ausencia de rifampicina, se observa una población de células con una distribución similar a la observada en cultivos exponenciales, que es el resultado de una parada de la replicación de forma estocástica (Guzmán *et al.*, 2002). Sin embargo, en la estirpe JS875 se observan picos correspondientes a poblaciones discretas de células con 2, 3 ó 4 cromosomas completamente replicados a 42°C. No obstante, en las citometrías de las estirpes portadoras del alelo *dnaA46* se aprecia una cola atribuible a células con gran cantidad de DNA que no corresponde a cromosomas completos tanto a 30°C como a 42°C.



**Fig. 22.** Determinación de la frecuencia de marcadores por Southern blot de JS1018 y JS875. La autorradiografía muestra el DNA de las estirpes JS1018 y JS875 en crecimiento exponencial a 30°C, tras 4 horas de incubación a 30°C en presencia de rifampicina, tras 4 horas de incubación a 42°C y tras 4 horas de incubación a 42°C en presencia de rifampicina. El DNA cromosómico fue digerido con EcoRI y HindIII e hibridado con las sondas indicadas. Se muestra la posición de cada sonda en el mapa genético.

## Resultados



Para comprobar si los mutantes *dnaA46* conseguían completar las rondas de replicación se llevó a cabo un análisis de frecuencia de marcadores. Se aisló el DNA cromosómico procedente de la estirpe *nrdA101 dnaA46* en las condiciones utilizadas para la citometría de flujo. Después de digerir el DNA con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, se realizó un Southern blot utilizando sondas que hibridan con distintas regiones del cromosoma según se describe en el apartado 16 de *Métodos* (Fig. 22).

**Fig. 23.** Frecuencia de marcadores de JS1018 y JS875. (A) JS1018 (*nrdA101*) creciendo exponencialmente a 30°C; (B) JS1018 tras cuatro horas de incubación a 42°C; (C) JS875 (*nrdA101 dnaA46*) creciendo exponencialmente a 30°C; (D) JS875 tras cuatro horas de incubación a 42°C en presencia de rifampicina; (E) JS875 tras cuatro horas de incubación a 42°C.



En la figura 23 se muestra la intensidad relativa de cada banda con respecto a la intensidad de la banda correspondiente al término, indicándose la posición de cada marcador en el cromosoma. Puede apreciarse como en el doble mutante *nrdA101 dnaA46*, después de cuatro horas de incubación a 42°C (Fig. 23-E), la frecuencia de todos los marcadores es similar a la del término, al igual que ocurre en el caso de que el cambio a 42°C sea acompañado con la adición de rifampicina. Esto indica que las replications que estaban iniciadas en el momento del cambio a temperatura restrictiva han sido completadas. En JS1018, como ha sido descrito por nuestro grupo (Guzmán *et al.*, 2002), el perfil de la frecuencia de marcadores es semejante en crecimiento exponencial (Fig. 23-A) y tras incubación a 42°C (Fig. 23-B), indicando que las horquillas de replicación se detienen de manera estocástica a lo largo del cromosoma. La diferencia que existe en la frecuencia del origen con respecto al término entre JS1018 y JS875 en crecimiento exponencial (Fig. 23-A y C) se debe al mayor solapamiento de ciclos de replicación ( $n$ ) que se da en el mutante simple *nrdA101* con respecto al doble mutante *nrdA101 dnaA46* (Tabla 3).

Estos resultados indican que la inhibición de síntesis de RNA y/o proteínas no es requerida para la finalización de las rondas de replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva. La inactivación de DnaA por la incubación a 42°C de una estirpe *nrdA101 dnaA46* permite que todas las replications que estaban en marcha en el momento del cambio de temperatura sean completadas.

### **2.2.3. Efecto de la mutación *dnaA46* sobre la morfología de una estirpe *nrdA101* a 42°C**

La incubación de una estirpe *nrdA101* a 42°C conlleva, además de las consecuencias en la replicación, graves alteraciones morfológicas. A temperatura restrictiva JS1018 presenta un fenotipo de filamentación muy acusado, así como defectos en la segregación cromosómica, como ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Riola *et al.*, 2007).

Después de comprobar que *dnaA46* permite finalizar la replicación cromosómica a un mutante *nrdA101* a 42°C, se abordó el estudio sobre la división celular y la segregación cromosómica en el doble mutante JS875.

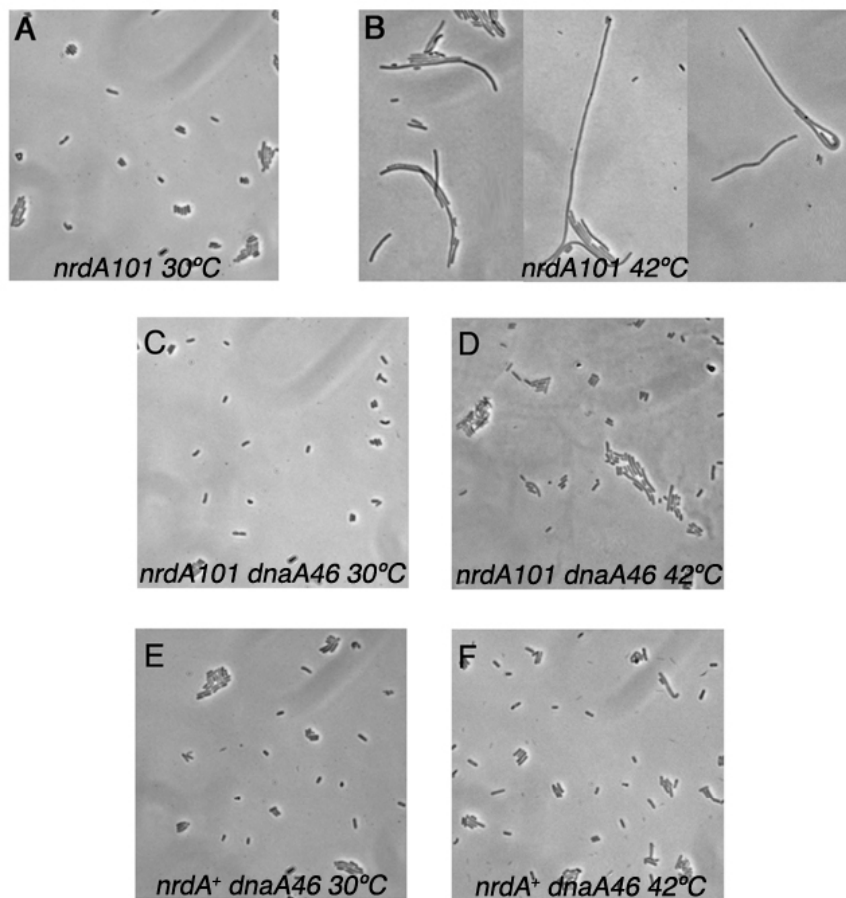
Para evaluar el posible efecto de *dnaA46* sobre la división celular se observaron, mediante microscopía de contraste de fase, muestras procedentes de cultivos incubados a 42°C durante cuatro horas.

En el panel B de la figura 24 se aprecia la filamentación de la estirpe JS1018 tras cuatro horas de incubación a 42°C. Sin embargo, esto no ocurre en el doble mutante *nrdA101 dnaA46* cuyas células incubadas a 42°C durante 4 horas poseen un tamaño

## Resultados

---

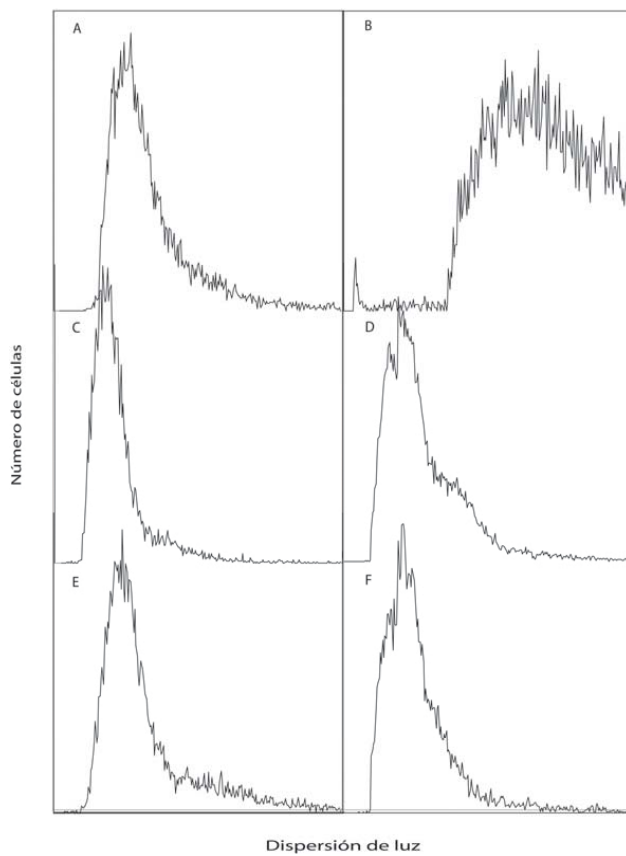
similar al que muestran cuando crecen a temperatura permisiva. Los resultados observados en la estirpe *nrdA*<sup>+</sup> *dnaA46* indican que la inactivación de la proteína DnaA tras la incubación de un mutante *dnaA46* a 42°C no causa filamentación en una estirpe silvestre para *nrdA*.



**Fig. 24.** Microfotografías de contraste de fase de JS1018 (*nrdA101*) (A y B), JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (C y D) y JK876 (*nrdA*<sup>+</sup> *dnaA46*) (E y F) tras cuatro horas de incubación a 30°C (izquierda) o 42°C (derecha).

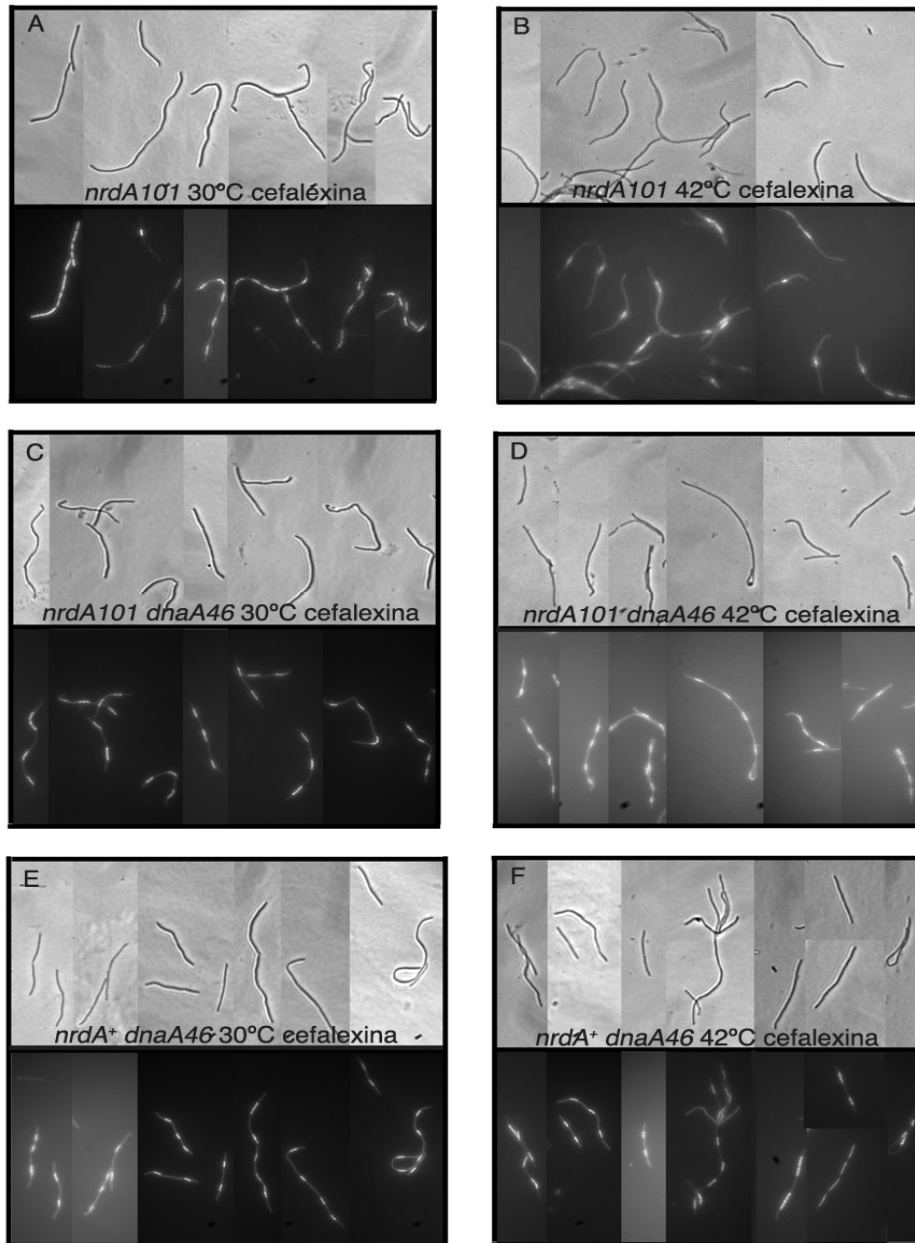
La supresión de la filamentación observada en el doble mutante *nrdA101 dnaA46* tras la incubación a 42°C fue corroborada mediante citometría de flujo. Se tomaron alícuotas de los mismos cultivos que se utilizaron para microscopía y se determinó el tamaño celular de la población tratada atendiendo a la dispersión del haz de luz producida por la muestra. Los resultados proporcionados por la citometría confirmaron lo observado por microscopía. Como se muestra en la figura 25, en el mutante *nrdA101* a 42°C el tamaño celular de la población es muy variable y notablemente mayor al del doble mutante *nrdA101 dnaA46*, cuyo tamaño es semejante al del mutante *nrdA<sup>+</sup> dnaA46*. Puede apreciarse cómo el doble mutante JS875 ofrece un rango de tamaños algo más variable a 42°C que a 30°C. En cualquier caso, este hecho es independiente de la mutación *nrdA101* y debe ser consecuencia de la inactivación de DnaA, ya que JK876 posee el mismo fenotipo.

Estos datos señalan que *dnaA46* suprime los defectos en división de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva.



**Fig. 25.** Citometrías de flujo de JS1018 (*nrdA101*) (A y B), JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (C y D) y JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*) (E y F) tras cuatro horas de incubación a 30°C (izquierda) o 42°C (derecha).

## Resultados

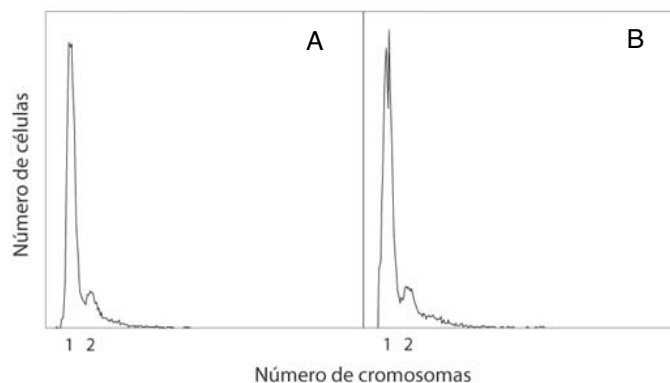


**Fig. 26.** Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS1018 (*nrdA101*) (A y B), JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (C y D) y JK876 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA46*) (E y F) teñidas con DAPI en presencia de cefalexina a 30°C (derecha) y 42°C (izquierda).

Para analizar la segregación cromosómica en condiciones restrictivas se incubaron los cultivos a 30°C y 42°C en presencia de cefalexina durante cuatro horas. De este modo, al impedir la división y forzar la elongación celular, fue posible observar la distribución de los nucleoides a lo largo de la célula mediante tinción con DAPI de las células fijadas.

En concordancia con los resultados previos de nuestro laboratorio (Riola *et al.*, 2007), JS1018 muestra graves defectos en segregación a 42°C (Fig. 26). En la mayoría de las células es imposible apreciar nucleoides discretos y el DNA se encuentra a menudo distribuido de forma asimétrica dentro de las células. Estos defectos son suprimidos en el doble mutante *nrdA101 dnaA46*, en el que no se observan diferencias en cuanto a segregación entre 30°C y 42°C. Se aprecian nucleoides discretos distribuidos regularmente a lo largo de la célula. Además, no se encuentran diferencias con su estirpe isogénica *nrdA*<sup>+</sup>, demostrando que la inactivación de DnaA restaura la capacidad de segregación de JS1018 a 42°C.

Para confirmar que la segregación cromosómica se estaba llevando a cabo correctamente se examinó el contenido en DNA por célula mediante citometría de flujo de los mutantes *dnaA46* tras cuatro horas a temperatura restrictiva sin adición de cefalexina. En la figura 27 se observa que tanto en la estirpe *nrdA*<sup>+</sup> *dna46* como en la *nrdA101 dnaA46* casi todas las células poseen una cantidad de DNA equivalente a un cromosoma íntegramente replicado, aunque también aparece una pequeña proporción de células con dos cromosomas. El perfil de estas gráficas es reflejo de que en estas estirpes se está produciendo una segregación cromosómica apropiada que les permite a las células dividirse hasta terminar con un cromosoma cada una. El pequeño pico de dos cromosomas probablemente esté originado por las células con mayor número de puntos de replicación activos en el momento del cambio a temperatura restrictiva. Es posible que cuatro horas no sea suficiente tiempo como para que estas células consigan dividirse hasta quedar con un solo cromosoma.



**Fig. 27.** Citometrías de flujo de JK876 (*nrdA*<sup>+</sup> *dnaA46*) (A) y JS875 (*nrdA101 dnaA46*) (B) después de cuatro horas a 42°C sin adición de cefalexina.

## Resultados

### 2.2.4. La inhibición de la iniciación por inactivación de DnaA permite la replicación íntegra de los cromosomas en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva

Los datos ofrecidos hasta ahora por el doble mutante JS875 apoyan la hipótesis de que la inhibición de la iniciación propicia las condiciones necesarias para que se completen a temperatura restrictiva las rondas de replicación iniciadas en el momento del cambio en un mutante *nrdA101*. Si esto fuera cierto, otras mutaciones en *dnaA* que también inhiban el inicio a 42°C deberían producir un efecto similar en JS1018.

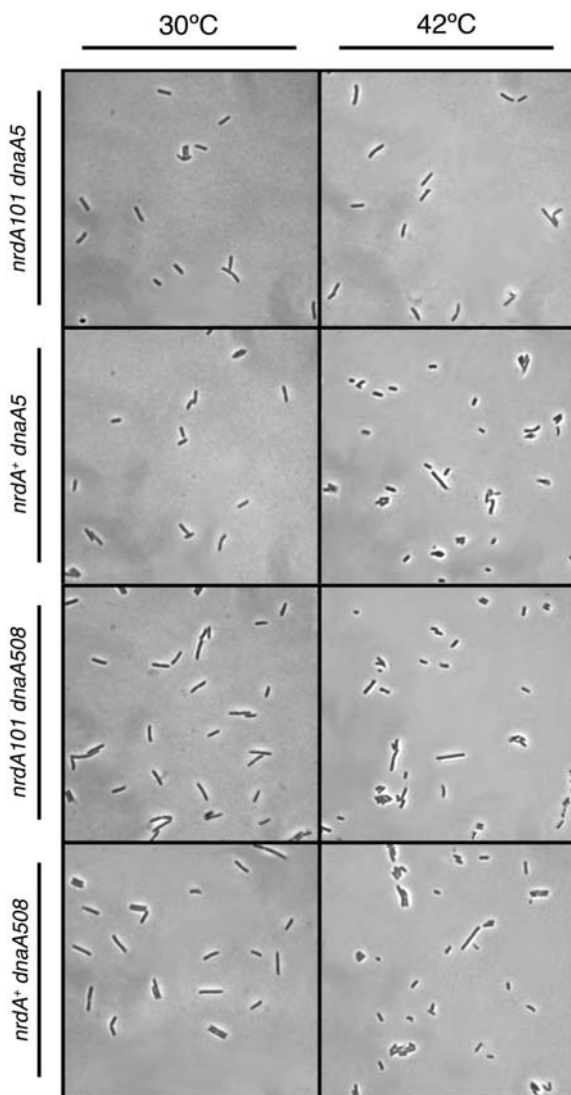
Se construyeron, mediante transducción generalizada, las estirpes *nrdA101 dnaA5*, *nrdA101 dnaA508* y sus respectivas isogénicas silvestres para *nrdA*. Tanto *dnaA5* como *dnaA508* codifican proteínas termolábiles que no son funcionales para el inicio de la replicación a 42°C. Al igual que DnaA46, DnaA5 posee la sustitución A184V en el dominio de unión a ATP/ADP, pero la mutación secundaria (G426S) no se encuentra en este dominio, sino en el dominio de unión al DNA. DnaA508 contiene las sustituciones P28L y T80I, ambas en el dominio de oligomerización (Hansen *et al.*, 1992). Un vez obtenidas y comprobadas las nuevas estirpes se procedió al análisis de su replicación cromosómica, segregación de nucleoides y división celular utilizando la misma metodología que se usó con los mutantes *dnaA46*.

En cuanto a la replicación cromosómica a 30°C, tanto el alelo *dnaA5* como *dnaA508* provocan un descenso en el  $\Delta G$  en el mutante *nrdA101* y en su isogénica *nrdA<sup>+</sup>* (Tabla 4). Esto se ve traducido en un menor número de puntos de replicación por célula, *n*, que sus estirpes parentales, aunque en los mutantes *dnaA5* la disminución es bastante leve.

**Tabla 4.** Parámetros de ciclo celular y síntesis de DNA a 42°C de las estirpes *dnaA5* y *dnaA508* utilizadas.

<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo relevante</i>	$\tau$ (min)	$\Delta G$ (%)	<i>Síntesis de DNA a 42°C</i> (%)	<i>n</i>	<i>C</i> (min)
JK607	<i>nrdA<sup>+</sup></i>	75	52	-	1,31	98
JS1018	<i>nrdA101</i>	75	90	45	2,10	158
JK915	<i>nrdA<sup>+</sup> dnaA5</i>	85	45	43	1,15	98
JS944	<i>nrdA101 dnaA5</i>	85	70	65	1,70	144
12916	<i>nrdA<sup>+</sup> dnaA508</i>	78	30	32	0,79	62
JS945	<i>nrdA101 dnaA508</i>	84	50	53	1,26	106

En lo que respecta a la capacidad de replicación a 42°C, en la tabla 4 se aprecia que la introducción de ambos alelos, *dnaA5* y *dnaA508*, permite que un mutante *nrdA101* consiga una síntesis de DNA a temperatura restrictiva semejante a la que se obtiene a 30°C tras inhibir la síntesis de proteínas. Por tanto, se puede afirmar que ambos alelos *dnaA* mutantes capacitan a una estirpe *nrdA101* para replicar cromosomas íntegramente después de ser incubada a temperatura restrictiva.



Un vez comprobado que DnaA5 y DnaA508 producen un efecto similar al de DnaA46 sobre la replicación de un mutante *nrdA101* se determinó si también revertían los defectos en división celular y segregación cromosómica de esta estirpe. Tras cuatro horas de incubación a 42°C, tanto el doble mutante *nrdA101 dnaA5* como *nrdA101 dnaA508* poseen un tamaño celular semejante el que presentan creciendo exponencialmente a 30°C, así como al de sus respectivas isogénicas silvestres para *nrdA* a 30°C y 42°C (Fig. 28).

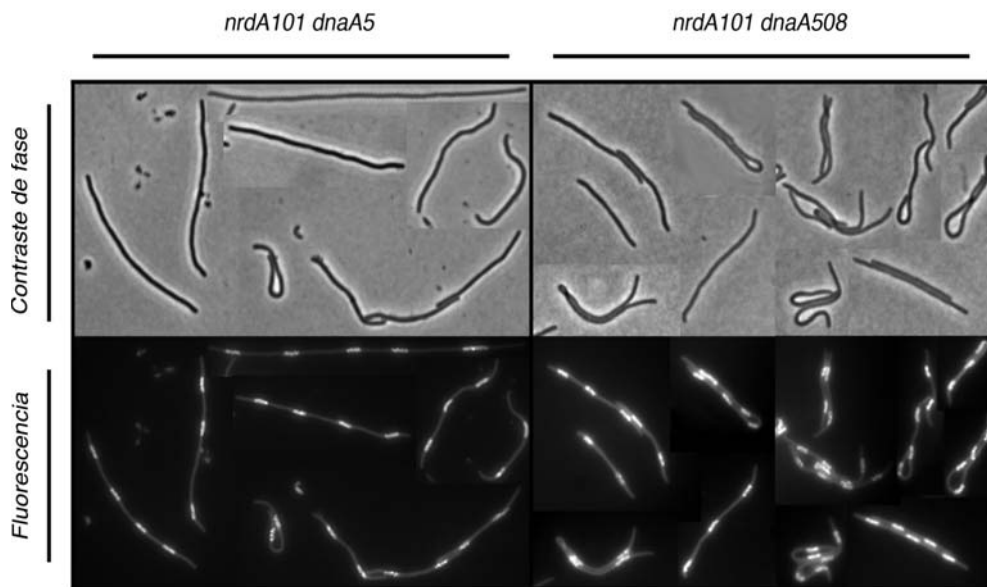
**Fig. 28.** Microfotografías de contraste de fase de fase de JS944 (*nrdA101 dnaA5*), JK915 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA5*), JS945 (*nrdA101 dnaA508*) y JK916 (*nrdA<sup>+</sup> dnaA508*) tras cuatro horas de incubación a 30°C o 42°C.

## Resultados

Para analizar la segregación cromosómica se incubaron los dobles mutantes, *nrdA101 dnaA5* y *nrdA101 dnaA508*, a 42°C durante cuatro horas en presencia de cefalexina. En la figura 29 se muestran las microfotografías de fluorescencia y sus respectivas de contraste de fase de ambas estirpes después del tratamiento mencionado.

En las imágenes se observa que en ambas estirpes los nucleoides se distribuyen de forma discreta y regular a lo largo de las células. Esto indica que tanto *dnaA5* como *dnaA508* suprimen los defectos de segregación cromosómica del mutante *nrdA101* cuando es incubado a 42°C.

En conjunto, los resultados obtenidos con la introducción de los alelos mutantes *dnaA5* y *dnaA508* en el mutante *nrdA101* demuestran que la capacidad de completar las replications en marcha, segregar los cromosomas y dividirse observada en este mutante tras la inactivación de DnaA a temperatura restrictiva no es un fenómeno exclusivo de *dnaA46* sino que otras mutaciones que afectan a diferentes dominios de la proteína DnaA, pero que también impiden el inicio de la replicación a 42°C, producen el mismo efecto sobre JS1018.



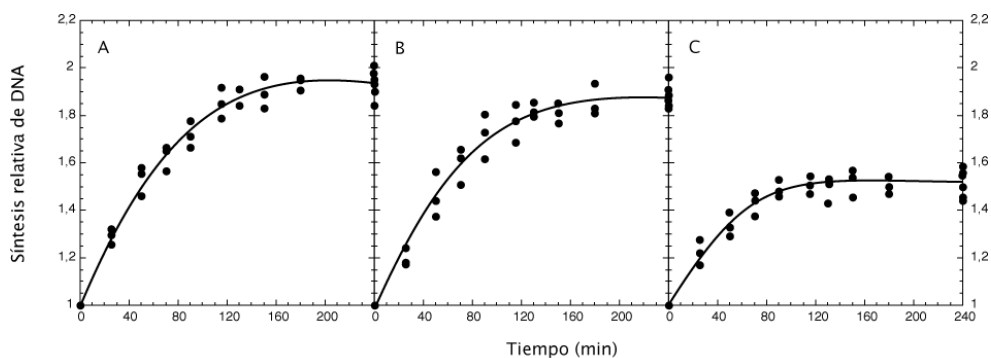
**Fig. 29.** Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS944 (*nrdA101 dnaA5*) y JS945 (*nrdA101 dnaA508*) tras cuatro horas de incubación a 42°C en presencia de cefalexina.



### 2.2.5. La inhibición de la iniciación por inactivación de DnaC no permite la replicación completa de los cromosomas a 42°C en un mutante *nrdA101*

Una vez demostrado que la inactivación de DnaA permite la finalización de la replicación cromosómica a un mutante *nrdA101* a 42°C, y que este efecto no es alelo-dependiente, el paso final para confirmar que la inhibición del inicio de replicación es la condición que posibilita la replicación completa de los cromosomas a temperatura restrictiva debía ser la inhabilitación del inicio por otro método que no implicara la inactivación de DnaA. Esta situación se consiguió introduciendo en JS1018 el alelo *dnaC2*. Este alelo codifica una proteína DnaC termosensible, lo que impide el inicio de la replicación a 42°C por la imposibilidad de cargar la helicasa DnaB en *oriC* (Carl, 1970; Withers y Bernander, 1998).

Se cuantificó la síntesis residual de DNA del doble mutante *nrdA101 dnaC2* tras ser incubado a temperatura restrictiva. En la figura 30 se observa una acumulación a 30°C tras adición de rifampicina de un 90%, similar a la observada en el mutante *nrdA101*, de lo que se deduce que *dnaC2* no altera el grado de solapamiento de ciclos de replicación en esta estirpe. A 42°C en presencia de rifampicina se alcanza una síntesis similar a la obtenida a 30°C. Esto indica que la gran mayoría, si no todas, las rondas de replicación en marcha en el momento del cambio de temperatura y adición del antibiótico son completadas. Sin embargo, cuando el cambio de temperatura no va acompañado de la adición de rifampicina, el doble mutante sólo consigue acumular un 50% más de DNA. Este descenso con respecto a la síntesis obtenida con rifampicina refleja que las horquillas de replicación se están parando antes de alcanzar el término.



**Fig. 30.** Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS948 (*nrdA101 dnaC2*) tras adición de rifampicina a 30°C (A), tras la adición de rifampicina y cambio a 42°C (B) y tras cambio a 42°C (C).

## *Resultados*

---

A priori, estos resultados invalidan la hipótesis que atribuye a la inhibición de la iniciación la responsabilidad de que las replications lleguen a término a 42°C. Estos resultados indican que los efectos en el fenotipo de *nrdA101* por la inactivación de DnaA deben tener su origen en la alteración de una función de la proteína DnaA diferente de su requerimiento en el inicio de replicación.

## Capítulo 3

### ***La inhibición de la iniciación no es necesaria para que un mutante *nrdA101* replique íntegramente su cromosoma a temperatura restrictiva***

#### **Resumen:**

En este capítulo se confirmó que la capacidad de replicar los cromosomas a 42°C de un mutante *nrdA101* no se debe a la ausencia de iniciación. Los resultados obtenidos tras la introducción en JS1018 de un alelo de *dnaA* que codifica una proteína funcional para el inicio de la replicación, pero que provoca una sobreexpresión del operón *nrdAB*, apuntaron a que la causa que permitía la replicación de cromosomas completos en los dobles mutantes *nrdA101 dnaA<sub>ts</sub>* era un aumento en la cantidad de NDP reductasa presente en la célula. Esta hipótesis se vio reforzada por el hecho de que la incubación del mutante *nrdA101* a 42°C en medio pobre en TdR, condición que aumenta la expresión de *nrdAB*, también permitiera una mayor termorresistencia de la replicación.

## *Resultados*

---

Además de su papel crucial en el proceso del inicio de la replicación desde *oriC*, una función no tan estudiada de la proteína DnaA es la de ser un regulador de la transcripción de determinados genes (Kaguni, 1997), entre ellos *nrdAB* (Herrick y Sclavi, 2007). Los resultados obtenidos nos llevaron a considerar la posibilidad de que un aumento de la expresión del operón *nrdAB* podría estar implicado en la capacidad del mutante *nrdA101* para completar las replications en marcha a temperatura restrictiva cuando se inactiva DnaA. *A priori*, no era previsible que un aumento de NDP reductasa termosensible codificada por el alelo *nrdA101* permitiera la replicación a 42°C ya que, en cualquier caso, la enzima sintetizada seguiría siendo termosensible y por tanto inactivada por la incubación a 42°C.

Para evaluar esta nueva hipótesis se construyeron las estirpes *nrdA101 dnaAT174P* y *nrdA<sup>+</sup> dnaAT174P*. El alelo *dnaAT174P* ha sido descubierto recientemente (Ortenberg *et al.*, 2004) y provoca un aumento de la expresión del operón *nrdAB* sin inhibir el inicio de la replicación. La sustitución AT174P en la proteína codificada por este alelo tiene como consecuencia la hidrólisis constitutiva de ATP por parte de DnaA sin la mediación de Hda. Como resultado, el balance DnaA-ATP / DnaA-ADP disminuye notablemente y se produce un incremento en la expresión de *nrdAB*. En base a estas y otras evidencias Gon y colaboradores han propuesto que DnaA-ATP actúa como represor de la transcripción de *nrdAB*, coordinando los niveles de NDP reductasa con el ciclo celular (Gon *et al.*, 2006).

### **3.1. Parámetros de ciclo celular de los mutantes *dnaAT174P* a 30°C**

Después construir y verificar la estirpe mutante *dnaAT174P* se analizó el efecto de esta mutación sobre el ciclo celular de JS1018 de manera análoga a como se realizó con el resto de mutaciones en *dnaA*. Los parámetros de ciclo más representativos se resumen en la tabla 5.

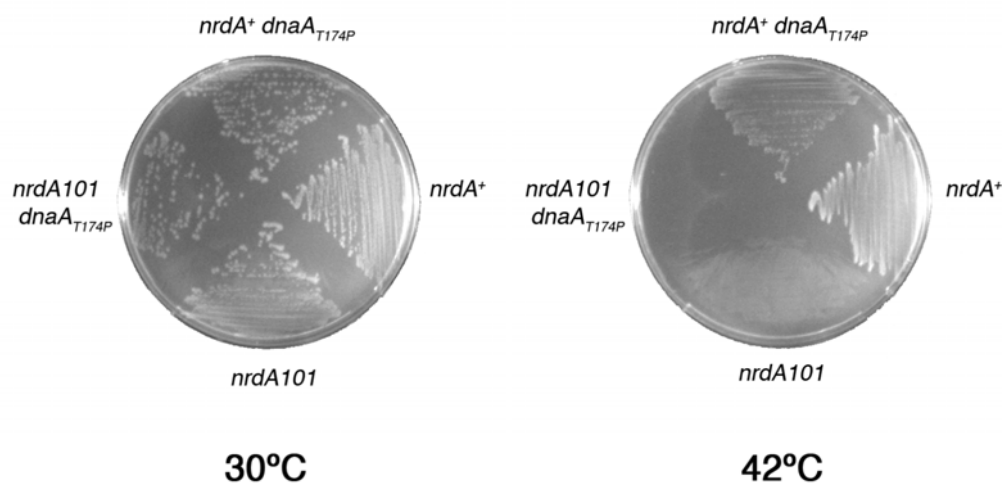
La introducción del alelo *dnaAT174P* no afecta en gran medida a la velocidad de crecimiento del mutante *nrdA101* ni de su parental *nrdA<sup>+</sup>*. El estudio de la síntesis de DNA del doble mutante tras la adición de rifampicina a temperatura permisiva revela que el alelo disminuye el número de puntos de replicación por cromosoma, *n*, en el mutante *nrdA101*, ya que la síntesis residual de DNA en estas condiciones pasa de un 90% en el mutante simple a un 55% en el doble mutante (Tabla 5). Esta reducción del solapamiento de ciclos de replicación también se da en la estirpe parental *nrdA<sup>+</sup> dnaAT174P* y se produce como consecuencia del aumento de velocidad de la replicación (Tabla 5), hecho similar al observado con el resto de mutaciones en *dnaA* analizadas en este trabajo. Esta reducción se ve corroborada mediante citometría de

## Resultados

flujo (Fig. 32-B), donde puede observarse que las células se agrupan en dos picos correspondientes a 2 y 4 cromosomas, mientras que en JS1018 se agrupan en picos de 4 y 8 cromosomas. Por otra parte, cabe mencionar que, en contraste con *dnaA46*, *dnaAT174P* no induce asincronía (Fig. 32-B).

**Tabla 5.** Parámetros de ciclo celular a 30°C de las estirpes *dnaAT174P* utilizadas.

<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo relevante</i>	$\tau$ (min)	$\Delta G$ (%)	<i>n</i>	<i>C</i> (min)
JK607	<i>nrdA</i> <sup>+</sup>	75	52	1,31	98
JS1018	<i>nrdA101</i>	75	90	2,10	158
JK913	<i>nrdA</i> <sup>+</sup> <i>dnaAT174P</i>	77	40	1,03	79
JS912	<i>nrdA101 dnaAT174P</i>	78	55	1,37	107

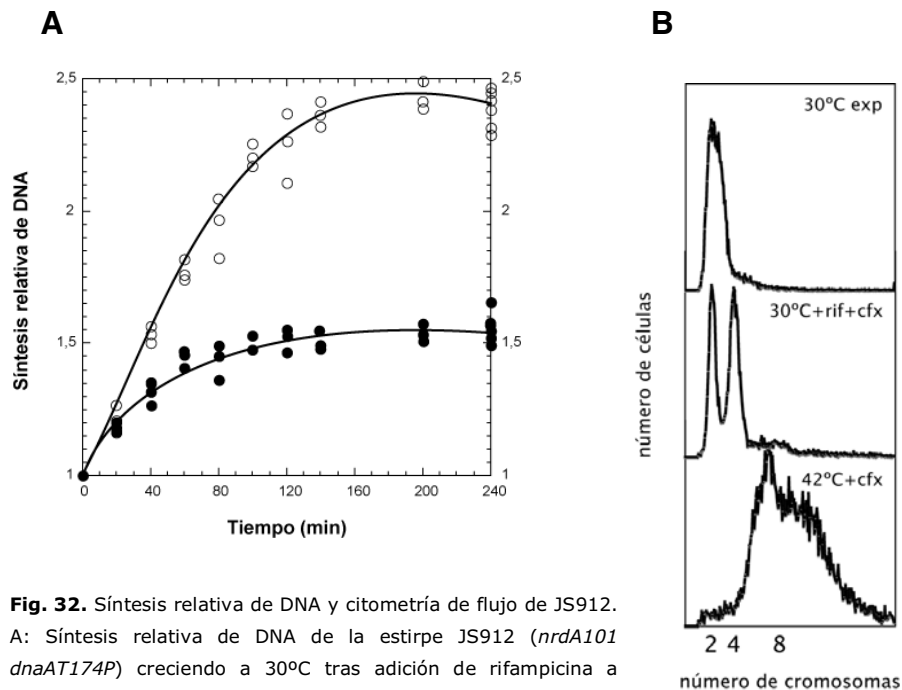


**Fig. 31.** Crecimiento en placa de JS1018 (*nrdA101*), JK607 (*nrdA*<sup>+</sup>), JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) y JK913 (*nrdA*<sup>+</sup> *dnaAT174P*) sembradas en Nutrient-Agar e incubadas 48 horas a 30°C o 42°C.

Hay que aclarar que el doble mutante *nrdA101 dnaAT174P* es incapaz de crecer a 42°C, ya sea en medio rico (LB) o en medio mínimo (MM9), en medio sólido (Fig. 31) o en medio líquido. La mutación *dnaAT174P* no suprime la termosensibilidad de JS1018 consecuencia de la mutación *nrdA101*. En cuanto a los mutantes *dnaA* termosensibles, *dnaA46*, *dnaA5* y *dnaA508*, la inviabilidad causada por *nrdA101* queda enmascarada por la propia incapacidad de las proteínas DnaA a 42°C para la iniciación. En cambio, el alelo *dnaAT174P* codifica una proteína que no pierde su actividad a 42°C y no confiere por sí misma un fenotipo termosensible a la bacteria que lo porta.

### **3.2. Efecto del alelo *dnaAT174P* sobre la replicación cromosómica de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva**

El estudio de la replicación del doble mutante *nrdA101 dnaAT174P* a 42°C arroja unos resultados bastante inesperados. Tras cambiar el cultivo a temperatura restrictiva, la replicación continuó durante más de dos horas, produciendo una acumulación relativa de DNA de alrededor de un 140% (Fig. 32-A). Esta termorresistencia de la replicación se aprecia igualmente mediante citometría de flujo, donde la cantidad de DNA por célula es muy superior a los 2 ó 4 cromosomas que se observan a 30°C tras inhibir el inicio de replicación (Fig. 32-B). El hecho de que la síntesis de DNA a 42°C sea mayor que la obtenida a 30°C en presencia de rifampicina indica que el alelo *dnaAT174P* no sólo capacita a un mutante *nrdA101* para completar las rondas de replicación en marcha tras el cambio a temperatura restrictiva sino que también posibilita que se produzcan nuevas iniciaciones a esta temperatura.



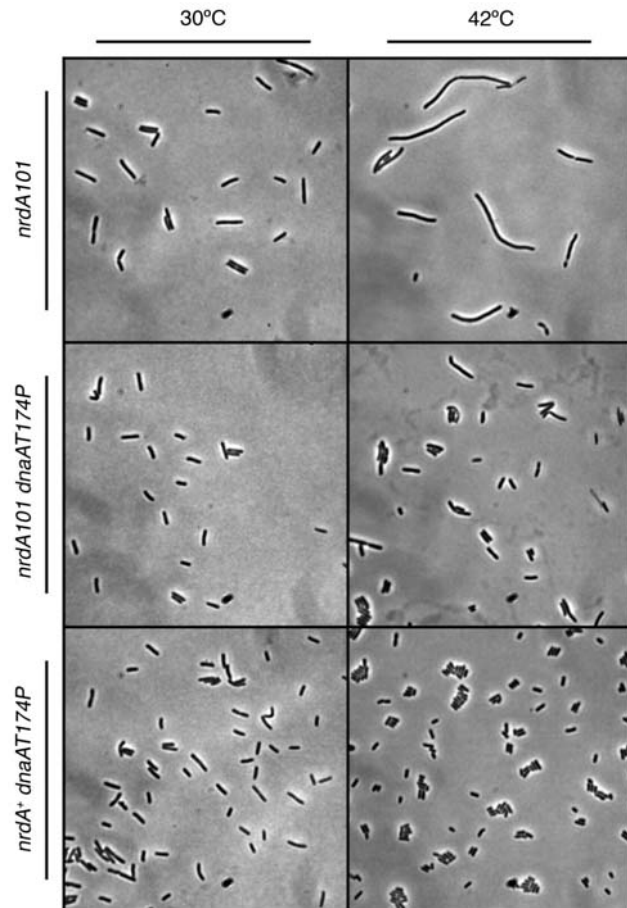
**Fig. 32.** Síntesis relativa de DNA y citometría de flujo de JS912. A: Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) creciendo a 30°C tras adición de rifampicina a tiempo cero (●) y tras cambio a 42°C a tiempo cero (○). B: Citometría de flujo DNA de la estirpe JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) creciendo exponencialmente a 30°C, tras cuatro horas en presencia de rifampicina a 30°C y tras cuatro horas a 42°C.

### 3.3. Efecto del alelo *dnaAT174P* sobre la morfología de una estirpe *nrdA101* a temperatura restrictiva

El siguiente paso fue comprobar si este aumento en la termorresistencia de la replicación de la estirpe *nrdA101* causado por la introducción del alelo *dnaA* mutante, también se correspondía con una correcta segregación cromosómica y división celular, aún en presencia de inicios de replicación a 42°C.

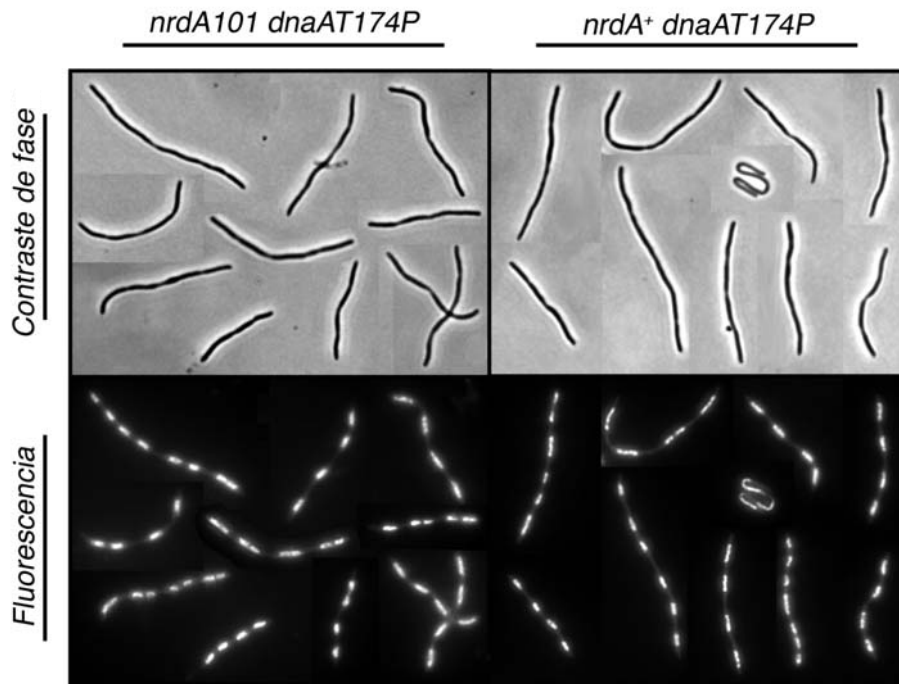
La morfología del doble mutante *nrdA101 dnaAT174P* a 30°C y tras cuatro horas a 42°C refleja que no se produce filamentación celular (Fig. 33). El tamaño de las células a 42°C es similar al que muestran a temperatura permisiva aunque con una leve pérdida de uniformidad. El fenotipo de su estirpe isogénica *nrdA*<sup>+</sup> es semejante, aunque el tamaño de las células es algo menor a 42°C y más uniforme que el del doble mutante.





**Fig. 33.** Microfotografías de contraste de fase de JS1018 (*nrdA101*), JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) y JK913 (*nrdA<sup>+</sup> dnaAT174P*) tras cuatro horas de incubación a 30°C o 42°C.

En el análisis de la segregación de nucleoides impidiendo la división celular con cefalexina y tiñendo con DAPI a 42°C (Fig. 34), no se aprecian diferencias en el reparto de nucleoides a lo largo de las células entre la estirpe *nrdA101 dnaAT174P* y la estirpe *nrdA<sup>+</sup> dnaAT174P*. En ambas, los nucleoides se distribuyen regularmente y con unos tamaños homogéneos. No se observan, por tanto, problemas de segregación cromosómica a temperatura restrictiva. Cabe destacar, no obstante, que aún siendo el solapamiento de ciclos de replicación equiparable al del resto de mutantes en *dnaA*, el número de nucleoides observados por célula a 42°C en un mutante *nrdA101* es mayor en presencia del alelo *dnaAT174P* que en presencia de *dnaA46*, *dnaA5* o *dnaA508*. Esto es debido a que *dnaAT174P* codifica una proteína DnaA funcional para el inicio de replicación a 42°C y posibilita nuevas iniciaciones que finalizan en cromosomas completos, al menos durante un tiempo.



**Fig. 34.** Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) y JK913 (*nrdA+ dnaAT174P*) tras cuatro horas de incubación a 42°C en presencia de cefalexina.

En conclusión, los resultados mostrados en este capítulo demuestran que inhibición del inicio de replicación no es una condición necesaria para la finalización de la replicación cromosómica en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva.

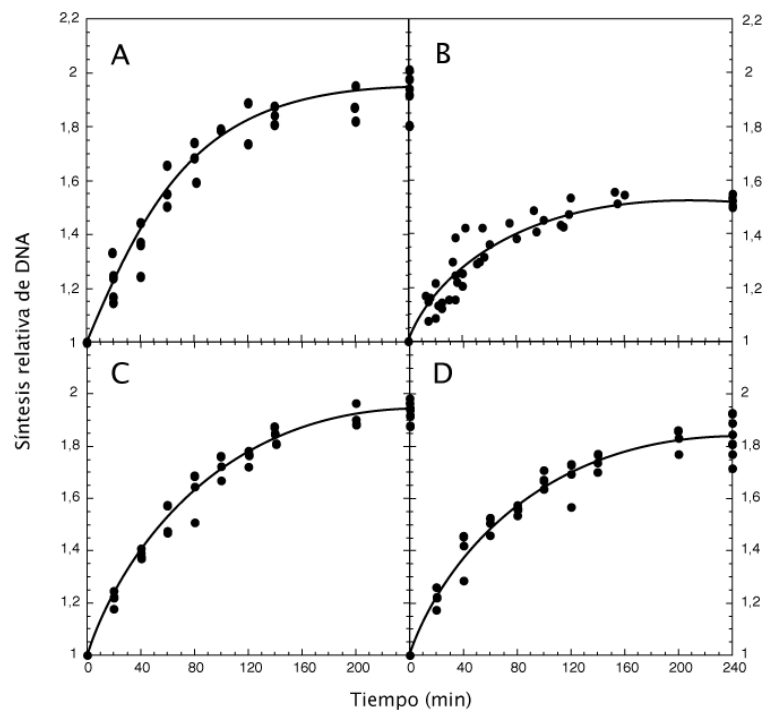
### **3.4. Concentraciones subóptimas de timidina provocan un aumento de la termorresistencia de la replicación en un mutante *nrdA101***

Los resultados expuestos hasta ahora descartan la hipótesis de que la inhibición del inicio de replicación sea la causa de la finalización de los cromosomas de una estirpe mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva y favorecen la posibilidad de que la sobreexpresión de *nrdAB* generada en las diferentes estirpes portadoras de mutaciones en

*dnaA* sea la condición que permita el aumento de síntesis de DNA a 42°C en el mutante *nrdA101*. El incremento en la expresión de *nrdAB* ya ha sido descrito en varios mutantes de iniciación y en el mutante *dnaAT174P* (Filpula y Fuchs, 1978; Gon *et al.*, 2006).

Para verificar esta última hipótesis se provocó un aumento en los niveles de NDP reductasa sin alterar a DnaA. Este aumento de los niveles de NDP reductasa se consiguió cultivando a JS1018 en medio mínimo con baja concentración de timidina (TdR). En estas condiciones, y teniendo en cuenta que JS1018 es auxótrofa para la TdR, la escasez de uno de los precursores del DNA causa un aumento de la expresión del operón *nrdAB* (Hanke and Fuchs, 1983).

Para determinar el grado en que la baja concentración de TdR afecta a la replicación a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101* se cuantificó la síntesis residual de DNA tras cambio a 42°C de un cultivo creciendo exponencialmente a 30°C en medio mínimo con timidina a una concentración de 2 µg/ml, dos veces y media menor a la óptima para esta estirpe.



**Fig. 35.** Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS1018 (*nrdA101*) creciendo con 5 µg/ml (A y B) ó 2 µg/ml (C y D) de TdR a 30°C tras la adición de rifampicina a tiempo cero (A y C) y tras cambio a 42°C a tiempo cero (B y D).

## Resultados

---

En la figura 35 se ilustra la síntesis residual de JS1018 en medio mínimo con 5 ó 2  $\mu\text{g/ml}$  de TdR. Se observa que la síntesis obtenida tras adición de rifampicina a 30°C es similar en ambos casos. Teniendo en cuenta que el tiempo de generación de JS1018 en medio mínimo con 2  $\mu\text{g/ml}$  de TdR es de 115 minutos y que el  $\Delta G$  es aproximadamente del 95%, el cálculo de los parámetros de ciclo celular arroja unos valores de 253 minutos para el periodo  $C$  y un  $n$  de 2,2. En lo que atañe a la capacidad de síntesis de DNA a temperatura restrictiva, el cultivo que crece en concentraciones subóptimas de TdR consigue una síntesis de DNA de algo más del 80%. Esto supone un apreciable aumento con respecto al 45-50% de síntesis que obtiene con 5  $\mu\text{g/ml}$  de timidina.

El incremento del tiempo de termorresistencia de la replicación de JS1018 en condiciones de escasez de timidina no requiere la inhibición del inicio de replicación a 42°C ni de la presencia de una proteína DnaA modificada de una forma concreta. Consecuentemente, los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que una sobreexpresión de *nrdAB* pueda contrarrestar el efecto de la temperatura en una estirpe *nrdA101*.

## Capítulo 4

### ***Condiciones que mantienen un nivel suficiente de NDP reductasa termosensible a 42°C permiten la replicación cromosómica en un mutante *nrdA101* in vivo a temperatura restrictiva***

#### **Resumen:**

En este capítulo se analizó la cantidad de NrdA en las diferentes condiciones que aumentan la capacidad de replicación a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101*. Los resultados confirmaron que las condiciones que permiten la replicación completa de cromosomas a 42°C sin inhibición de síntesis de RNA y/o proteínas provocan una sobreexpresión de NrdA. Se comprobó que la proteína NrdA codificada por *nrdA101* es degradada a 42°C de forma dependiente de la síntesis de proteínas.

Estos resultados sugieren que la condición que permite esta excepcional replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva es el mantenimiento de un nivel suficiente de NDP reductasa en la célula.

## *Resultados*

---

#### 4.1. Niveles de NrdA a 42°C en condiciones de sobreexpresión

Los resultados expuestos hasta el momento apuntan a la posibilidad de que una sobreexpresión de *nrdAB* suprima, al menos en parte, los problemas relacionados con la replicación, segregación cromosómica y división celular a 42°C derivados de la mutación *nrdA101*.

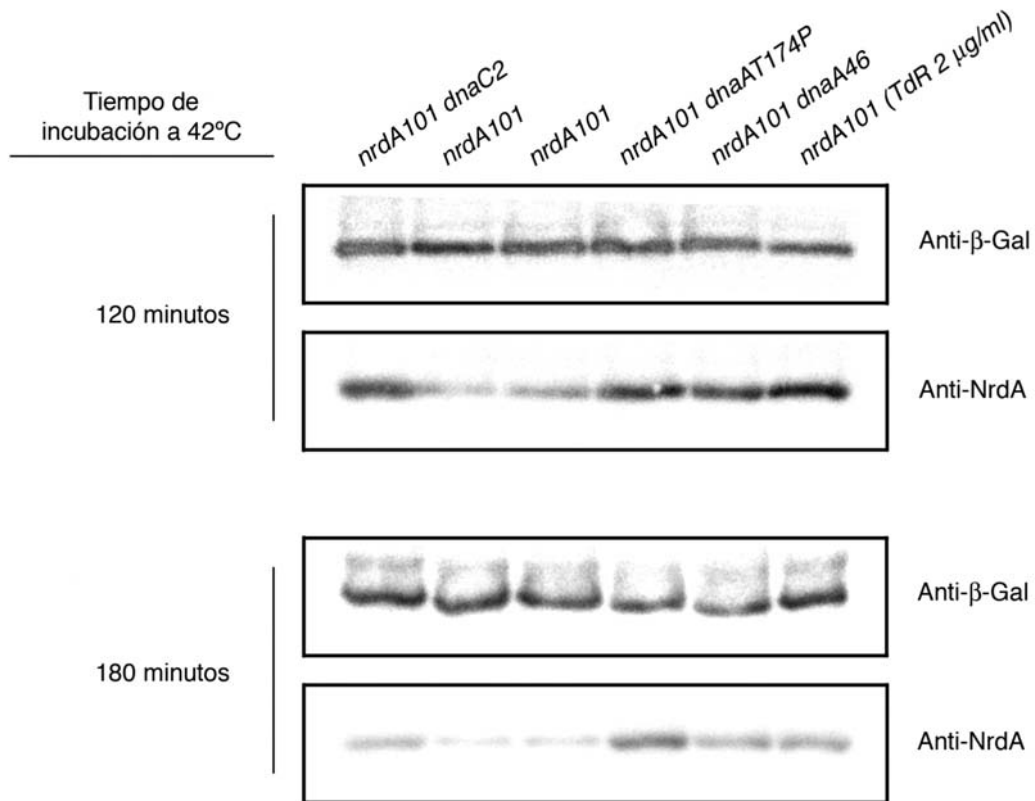
Para verificar si se estaba produciendo la sobreexpresión de la subunidad R1 codificada por el alelo *nrdA101* se realizaron extracciones de proteína total de cultivos del mutante *nrdA101* creciendo en presencia de 2 µg/ml de TdR y de los mutantes *nrdA101 dnaA174*, *nrdA101 dnaA46*, *nrdA101 dnaC2* y *nrdA101* creciendo con 5 µg/ml de TdR a 120 y 180 minutos tras el cambio a 42°C. Previa cuantificación de la concentración de proteína total de los extractos, la misma cantidad de proteína de cada muestra fue cargada y separada mediante SDS-PAGE. Posteriormente, la subunidad R1 (NrdA) de la NDP reductasa fue detectada por western blot usando como control de carga, la enzima β-Galactosidasa. Cada western blot fue repetido, al menos, tres veces con extractos procedentes de diferentes cultivos. La figura 36 muestra la imagen más representativa.

Tras 120 minutos a 42°C la banda de NrdA en el mutante simple *nrdA101* creciendo con 5 µg/ml de TdR es sensiblemente menos intensa que las bandas de NrdA correspondientes a los dobles mutantes *nrdA101dnaA* o *nrdA101dnaC2* y a el mutante simple *nrdA101* creciendo con 2 µg/ml de TdR. Estos resultados confirman la existencia de unos niveles de NrdA altos en las condiciones en las que la termorresistencia de la replicación del mutante *nrdA101* es prolongada. Estas diferencias se acentúan después de 180 minutos a temperatura restrictiva. Cabe destacar que en las muestras de 180 minutos también se observa un descenso en la cantidad de NrdA en la estirpe *dnaA46*, en la estirpe *dnaC2* y en el mutante simple *nrdA101* con 2 µg/ml de TdR con respecto a la estirpe *dnaAT174P*. Esta observación apoyaría la relación entre la presencia de la NDP reductasa y la prolongación de la termorresistencia, ya que la introducción del alelo *dnaAT174P* es la condición que permite mayor cantidad de síntesis de DNA tras la incubación de la estirpe *nrdA101* a temperatura restrictiva.

A la vista de estos resultados, se pone de manifiesto una correlación entre la cantidad de NDP reductasa presente a lo largo de la incubación a 42°C y la capacidad de sintetizar DNA, segregar los cromosomas y dividirse en JS1018.

El hecho de que se observe un aumento en los niveles de NrdA en la estirpe *nrdA101 dnaC2* parece contradecir al razonamiento anterior. Sin embargo, dada la implicación de DnaC en el proceso de elongación (Maisnier-Patin *et al.*, 2001; Withers y Bernander, 1998) es muy posible que su inactivación impida la finalización de la replicación cromosómica en presencia de una NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101*, aún siendo sobreexpresada.

## Resultados



**Fig. 36.** Niveles celulares de NrdA a 42°C en presencia de los alelos *dnaC2*, *dnaAT174P*, *dnaA46* y de 2µg/ml de TdR. Iguales cantidades de proteína total celular procedentes de cultivos de JS948 (*nrdA101 dnaC2*), JS1018 (*nrdA101*), JS912 (*nrdA101 dnaAT174P*) y JS875 (*nrdA101 dnaA46*) creciendo con 5µg/ml de TdR, y de JS1018 creciendo con 2µg/ml de TdR, obtenidas a diferentes tiempos tras cambio a 42°C, fueron separadas mediante SDS-PAGE. La subunidad R1 (*nrdA*) de la NDP reductasa fue detectada por western blot. Como control de carga, la enzima β-Galactosidasa fue detectada también mediante western blot.

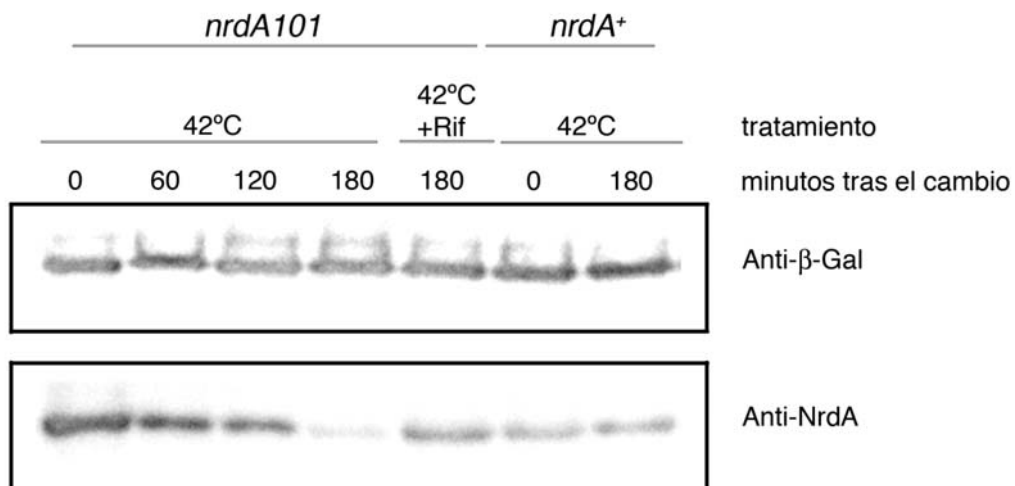
### 4.2. *NrdA* es degradada por una proteasa sintetizada a 42°C en un mutante *nrdA101*

El hecho de que la sobreexpresión de una enzima mutante compensara el mal funcionamiento de esa misma enzima podría tener dos explicaciones: una sería que el



exceso de enzima remediara el detrimento de actividad causado por la mutación; y la otra sería que la enzima mutante fuera degradada a temperatura restrictiva por alguna proteasa celular que se vería saturada en condiciones de sobreexpresión, proporcionando un mayor periodo de permanencia y actividad de la enzima mutante en estas condiciones. En el caso de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* la primera explicación es poco probable por dos razones: i) aunque sobreexpresada, la NDP reductasa codificada por *nrdA101* seguiría siendo termosensible, ii) la incubación a 42°C en presencia de rifampicina, es decir, sin sobreexpresión de *nrdAB*, permite que un mutante *nrdA101* pueda replicar los cromosomas íntegramente. En la figura 36 se observa que la diferencia en la cantidad de NrdA entre el mutante simple *nrdA101* y las condiciones que provocan la sobreexpresión de *nrdAB* se acentúa a medida que transcurre el tiempo tras el cambio a temperatura restrictiva. Este hecho podría ser consecuencia de una degradación de NrdA que sería compensada por el incremento en la producción de NDP reductasa.

Para comprobar si se estaba produciendo una degradación de NrdA en el mutante *nrdA101* se analizó el contenido en NrdA mediante western blot tras el cambio a 42°C con o sin rifampicina.



**Fig. 37.** Niveles de NrdA a 42°C en JS1018 y Jk607. Iguales cantidades de proteína total celular procedentes de cultivos de JS1018 (*nrdA101*) (izquierda) y JK607 (*nrdA<sup>+</sup>*) (derecha), obtenidas a diferentes tiempos tras cambio a 42°C, fueron separadas mediante SDS-PAGE. La subunidad R1 (*nrdA*) de la NDP reductasa fue detectada por western blot. Como control de carga, la enzima β-Galactosidasa fue detectada también mediante western blot.

## Resultados

---

En la figura 37 se aprecia cómo los niveles de NrdA descienden progresivamente después de la incubación del mutante *nrdA101* a 42°C, mientras permanecen constantes en la estirpe *nrdA*<sup>+</sup>. Además, puede apreciarse que el mutante *nrdA101* posee mayor cantidad de NrdA por proteína total que su estirpe parental *nrdA*<sup>+</sup>. Esto significa que la mutación *nrdA101* induce por sí misma un aumento en la expresión del operón *nrdAB*. Transcurridos 60 minutos después del cambio de temperatura se observa una disminución en la cantidad de R1 celular hasta prácticamente desaparecer a los 180 minutos en comparación con el momento del cambio. Por el contrario, en su estirpe isogénica *nrdA*<sup>+</sup> los niveles de R1 permanecen constantes en relación a la cantidad de proteína total después de 180 minutos de incubación a 42°C, como era esperable. Estos resultados demuestran que, en un mutante *nrdA101*, la subunidad R1 de la NDP reductasa codificada por éste alelo es degradada a temperatura restrictiva. Tras la inhibición de síntesis de RNA a 42°C durante 180 minutos se detecta una cantidad de NrdA muy superior al observado tras la incubación a 42°C en ausencia del antibiótico (Fig. 37). Esto indica que la degradación no se produce cuando el cambio de temperatura se ve acompañado de la adición de rifampicina. No obstante, también puede apreciarse un descenso en la cantidad de NrdA con respecto al tiempo 0.

Estos resultados revelan que la proteína codificada por el alelo *nrdA101* es degradada a 42°C probablemente por una o varias proteasas sintetizadas a causa del choque térmico o por la aparición de proteínas alteradas por efecto de la temperatura. La adición de rifampicina prevendría la síntesis de esta proteasa permitiendo el mantenimiento de unos niveles de NDP reductasa con los que se pueda llevar a cabo la finalización de las rondas de replicación activas.

# *Discusión*



Desde que fue relacionada por primera vez con la replicación, la NDP reductasa se ha considerado siempre como una proteína rigurosamente requerida para la elongación de la replicación (Wechsler y Gross, 1971). Sin embargo, aunque la NDP reductasa es necesaria para la elongación y el alelo *nrdA101* codifica una proteína que es inactivada en menos de 2 minutos a temperatura restrictiva *in vitro*, resultados previos obtenidos por nuestro grupo muestran que este alelo no puede considerarse como una mutación de elongación típica, ya que bajo condiciones restrictivas un mutante *nrdA101* sintetiza un 45% de su DNA y, tras la adición de rifampicina a 42°C, tiene capacidad para finalizar las rondas de replicación iniciadas, dando lugar a cromosomas completos (Guzman *et al.*, 2002). Estos resultados, junto con la imposibilidad de mantener la velocidad de replicación a menos que se dé una canalización o aporte directo de los nucleótidos al replisoma (Ji y Mathews, 1991), han llevado a proponer a la NDP reductasa como componente de la hiperestructura de replicación, que estaría formada por la asociación entre el replisoma y el complejo de biosíntesis de nucleótidos (Guzmán *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 1982; Norris *et al.*, 2007a; Norris *et al.*, 2007b). En base a esta propuesta la NDP reductasa termolábil codificada por el alelo *nrdA101* estaría protegida de la inactivación mientras la hiperestructura de replicación permanezca ensamblada.

En este trabajo se ha analizado la replicación en el mutante *nrdA101* en condiciones que permiten la replicación de cromosomas completos a temperatura restrictiva. Este análisis de la replicación ha constado de dos puntos básicos:

1. Determinar el requerimiento de las enzimas de recombinación.
2. Dilucidar las causas que permiten a un mutante *nrdA101* replicar íntegramente su cromosoma en estas condiciones.

Los resultados obtenidos indican que la replicación en condiciones restrictivas en presencia de rifampicina requiere la función estabilizadora de las horquillas de replicación asociada a la proteína RecA.

## Discusión

---

En cuanto al segundo punto de análisis, este trabajo demuestra que la capacidad de finalizar las rondas de replicación en presencia de rifampicina a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101* no es consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas ni de la inhibición de nuevos inicios de replicación, procesos en los que la rifampicina tiene un efecto directo. Esta capacidad reside en el mantenimiento de unos niveles de NDP reductasa suficientemente altos como para permitir la síntesis de DNA hasta alcanzar el término. Dado que la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* es termosensible, estos resultados aportan nuevos elementos que afinan el modelo en el que la NDP reductasa se concibe no como un elemento aislado, sino como parte de la hiperestructura de replicación.

- ***Papel de RecA en la estabilización de las horquillas de replicación en una estirpe nrdA101***

Los procesos de recombinación homóloga son fundamentales para el mantenimiento de la integridad del cromosoma y la recuperación de las horquillas de replicación paradas (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Michel *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2007). Conociendo que el mutante *nrdA101* está específicamente afectado en la progresión de las horquillas de replicación (Guarino *et al.*, 2007a), se examinó la implicación de las enzimas de recombinación en la replicación del mutante *nrdA101* bajo inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas a temperatura restrictiva.

Cuando una horquilla de replicación se detiene, puede convertirse en un punto susceptible de generar un corte de cadena doble (DSB). El complejo RecBCD reconoce los DSBs generados en la horquilla parada, degrada una de las cadenas hasta encontrar una secuencia Chi y carga a RecA, que iniciará el proceso de recombinación homóloga (Kuzminov, 1999; Spies M, 2003; Taylor AF, 2003) creando un intermediario de recombinación (*D-loop*) donde la proteína PriA carga al primosoma y se produce la reanudación de la replicación. Alternativamente, la horquilla parada también puede ser procesada mediante RFR, evitando la formación de un DSB para poder reensamblar el primosoma.

Los resultados presentados indican que en ausencia de síntesis de RNA y/o de proteínas la replicación de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva es absolutamente dependiente de la proteína RecA, parcialmente dependiente de la proteína RecB y no requiere el complejo de la resolvasa RuvABC o la helicasa RecG, que serían los encargados de resolver los intermediarios de recombinación que pudieran generarse durante la progresión de la horquilla de replicación.

El hecho de que en condiciones de inhibición de la transcripción a temperatura restrictiva un mutante *nrdA101* replique íntegramente su cromosoma en ausencia de RuvABC o RecG implicaría que las horquillas de replicación de un mutante *nrdA101* no se reanudan por vías que conllevan formación de intermediarios de recombinación que deban ser resueltos por RuvABC y/o RecG (Fig. 14), aunque para confirmar tal afirmación habría que analizar la replicación del mutante *nrdA101* en ausencia de ambas enzimas, ya que no puede descartarse que una pueda llevar a cabo el papel de la otra. Por tanto, el papel de la proteína RecA en la replicación de un mutante *nrdA101* en condiciones de inhibición de la transcripción a temperatura restrictiva parece ser otro distinto al de generar intermediarios de recombinación que deban ser resueltos por RuvABC y/o RecG.

RecA realiza multitud de funciones relacionadas con el metabolismo del DNA. Esta enzima es clave no sólo en procesos de reparación del DNA por recombinación homóloga y en la recuperación de horquillas paradas por vía de recombinación homóloga. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que RecA juega también un importante papel en el mantenimiento de la integridad de las horquillas paradas (revisado en Courcelle y Hanawalt, 2003). Es posible, por consiguiente, que el papel de la proteína RecA en la replicación de un mutante *nrdA101* a 42°C bajo inhibición de síntesis proteica podría radicar en la estabilización de la región de la horquilla de replicación parada, lo que evitaría su posible degradación.

Para diferenciar entre la función estabilizadora de horquillas de replicación y el resto de funciones de RecA, el doble mutante *nrdA101 recA* fue transformado con un plásmido portador del alelo *recAS25P* o del gen silvestre *recA*. *recAS25P* es un alelo mutante identificado recientemente que codifica una proteína RecA activa en recombinación homóloga, reparación del DNA, inducción de SOS y mutagénesis asociada a SOS, pero que, según Shibata y colaboradores, carece de la función de mantenimiento de la integridad de las horquillas de replicación paradas de RecA (Shibata *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos al determinar la síntesis de DNA en presencia de la proteína RecA y RecAS25P corroboran que la función de RecA requerida por la estirpe *nrdA101* para la replicación a temperatura restrictiva bajo inhibición de la síntesis de RNA y/o proteínas es la de la estabilización o protección de las horquillas de replicación. Mientras que la presencia de *recA* exógeno complementa la anulación de la copia cromosómica, esto no ocurre en presencia del alelo *recAS25P*, donde, tras un corto periodo de síntesis de DNA, comienza a observarse una degradación que acaba reduciendo la cantidad de DNA hasta un 20%.

Varios autores han informado sobre la degradación cromosómica observada en mutantes *recA* cuando son incubados en presencia de rifampicina (Skarstad y Boye, 1988, 1993). Hasta el momento no se han reunido suficientes evidencias para determinar la causa de que se produzca tal degradación. Skarstad y colaboradores

## Discusión

---

observaron que en este escenario se produce la degradación completa de cromosomas y demostraron que esta degradación es realizada por la exonucleasa RecBCD (Skarstad y Boye, 1993). Los resultados presentados aquí suscriben los resultados descritos por otros investigadores. Adicionalmente, se observó que esta degradación es más acusada a 42°C. Esto no había sido descrito hasta ahora y parece señalar que las horquillas de replicación son más susceptibles de ser degradadas a esta temperatura, lo cual no sería improbable dado que el aumento de temperatura podría propiciar cambios topológicos en el cromosoma y más concretamente en los puntos de replicación. Además, se detecta una mayor degradación en la estirpe *nrdA101 recA* que en su isogénica *nrdA*<sup>+</sup>. Esto podría tener su origen en la mayor frecuencia de paradas de la replicación que sufre un mutante *nrdA101* (Guarino *et al.*, 2007a) o en una mayor fragilidad de las horquillas que avanzan en presencia de una hiperestructura alterada.

Nuestros resultados indican que la estabilización de las horquillas desarrollada por RecA parece jugar un papel crucial para la replicación termorresistente observada en una estirpe *nrdA101* en un contexto de inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas.

- ***La inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas no es necesaria para que un mutante nrdA101 complete las rondas de replicación a temperatura restrictiva***

El segundo punto abordado en este trabajo fue investigar la causa por la que un mutante termosensible *nrdA101* fuera capaz de replicar su cromosoma íntegramente a temperatura restrictiva en presencia de rifampicina.

La primera cuestión que se planteó fue si la inhibición de la síntesis de RNA consecuente a la adición de rifampicina es la condición que posibilita la progresión de las horquillas de replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva. Como primera hipótesis para explicar este resultado se planteó la posibilidad de que la inhibición de la transcripción por la adición de rifampicina facilitara la progresión de la horquilla de replicación eliminando RNA polimerasas que estuvieran sintetizando RNA y que supondrían un obstáculo para la replicación. Esta hipótesis quedó descartada, dado que la rifampicina no impide la unión de la RNA polimerasa al DNA, así como la formación del complejo abierto y la incorporación del primer nucleótido (Hinkle *et al.*, 1972; McClure y Cech, 1978). Por otra parte, era posible que el fenotipo observado en presencia de rifampicina estuviera causado por otros efectos de la droga sobre la fisiología bacteriana y no sólo por la parada de la transcripción propiamente dicha. El efecto más directo de la inhibición de la síntesis de RNA es la parada de la síntesis de



proteínas. Para evaluar esta posibilidad se midió la síntesis de DNA en JS1018 a 42°C tras inhibir la traducción mediante cloranfenicol o carencia de aminoácidos.

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de cloranfenicol o en carencia de aminoácidos se produce una síntesis de DNA similar a la conseguida en presencia de rifampicina (Fig. 18), lo que indica que la inhibición de la síntesis de proteínas que se produce bajo estos tratamientos también posibilita que las horquillas completen la replicación a 42°C en un mutante *nrdA101*. Sin embargo, hay que hacer notar que la citometría de flujo revela que hay una cierta proporción de células que no completan las rondas de replicación para acabar con ocho cromosomas en presencia de cloranfenicol y, sobre todo, en carencia de aminoácidos. Esto podría ser debido a las diferencias establecidas en el mecanismo de acción de cada tratamiento. Tanto la rifampicina como el cloranfenicol o la carencia de aminoácidos provocan una parada de la traducción directa o indirectamente y afectan a la transcripción en diferente medida. Sin embargo, sus mecanismos de actuación cursan por vías muy diferentes. La rifampicina actúa sobre la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa impidiendo la producción de RNA (Ezekiel y Hutchins, 1968; Heil y Zillig, 1970; Wehrli *et al.*, 1968) y, por tanto, al no sintetizarse mRNA la traducción también se detiene posteriormente. El cloranfenicol actúa sobre la unidad 50S del ribosoma bacteriano inhibiendo la formación del enlace peptídico en el ribosoma e impidiendo la síntesis proteica (Schlesinger *et al.*, 1974). La carencia de aminoácidos en el medio, además de inhibir la síntesis de proteínas, induce en la célula el aumento de los niveles de guanosina tetrafosfato (ppGpp), una molécula señalizadora intracelular que desencadena una serie de procesos ante un estímulo de estrés encaminados a hacer entrar a la célula en un periodo de quiescencia (Baracchini y Bremer, 1988; Lagosky and Chang, 1980, 1981). Las diferencias en el mecanismo de actuación de la rifampicina, el cloranfenicol y la eliminación de aminoácidos podrían explicar las ligeras diferencias observadas mediante citometría de flujo en el mutante *nrdA101* cuando es incubado a temperatura restrictiva y ausencia de transcripción y/o de traducción.

Dado que la inhibición de la síntesis de proteínas es una condición requerida para que el mutante *nrdA101* sea capaz de finalizar su replicación a temperatura restrictiva, se abrieron dos interpretaciones. La primera fue que la inhibición de la síntesis de alguna proteína tuviera un efecto positivo en la progresión de las horquillas de replicación a temperatura restrictiva. La segunda surgió a partir del hecho de que tanto la síntesis de proteínas como la de RNA son procesos requeridos para el inicio de la replicación. Esto nos llevó a proponer la inhibición de la iniciación de las nuevas rondas de replicación como la condición que capacita a un mutante *nrdA101* para la finalización de la replicación a temperatura restrictiva. La relación entre iniciación y elongación de la replicación es muy atractiva y se han lanzado varias propuestas en la

## Discusión

---

última década (Atlung y Hansen, 2002; Boye *et al.*, 1996; Gon *et al.*, 2006; Grigorian *et al.*, 2003; Herrick y Sclavi, 2007; Simmons *et al.*, 2004; Von Freiesleben *et al.*, 2000).

Para poner a prueba la segunda hipótesis se llevó a cabo la introducción de la mutación *dnaA46* en la estirpe *nrdA101*. El alelo *dnaA46* codifica una proteína DnaA termolábil que se inactiva a 42°C. Por tanto, la bacteria que lo porte es incapaz de iniciar la replicación incluso en presencia de síntesis de RNA y proteínas a 42°C debido a que DnaA es absolutamente requerida para el inicio de la replicación cromosómica. Los resultados obtenidos tras la incubación a 42°C del doble mutante *nrdA101 dnaA46* (Fig. 21 y 23) indican que puede acabar las replications en marcha sin requerir inhibición de la síntesis de proteínas ni de RNA a temperatura restrictiva. Estos resultados permitirían descartar la posibilidad de que sea requerida la inhibición de la síntesis de alguna proteína y apoyarían la posibilidad de que la inhibición del inicio de nuevas rondas de replicación fuera la condición necesaria para que un mutante *nrdA101* replique íntegramente su cromosoma en condiciones restrictivas.

Resultados de nuestro grupo de investigación demuestran que la mutación *nrdA101* causa graves defectos en la división celular y en la segregación cromosómica a temperatura restrictiva indicando que la NDP reductasa tiene una implicación directa o indirecta en la segregación cromosómica, y sugiriendo que la hiperestructura de replicación está relacionada con la maquinaria de segregación (Guzmán *et al.*, 2003; Riola *et al.*, 2007). En este trabajo se muestra que la estirpe *nrdA101 dnaA46*, tras ser incubada a 42°C, segrega los cromosomas correctamente y posee un tamaño similar al de su estirpe isogénica *nrdA<sup>+</sup>* y al de ella misma creciendo a temperatura permisiva, lo que indica que no presenta problemas de división celular. Dado que la inactivación de la proteína DnaA permite a un mutante *nrdA101* completar las rondas de replicación en marcha a temperatura restrictiva, los defectos morfológicos observados en el mutante *nrdA101* tras ser incubado a 42°C podrían ser debidos a la presencia de horquillas paradas sin haber finalizado la replicación del cromosoma y con la consecuente alteración de la hiperestructura debida al efecto de la temperatura sobre la NDP reductasa mutante. El mantenimiento de la funcionalidad de la hiperestructura a 42°C durante el tiempo que dura la replicación del cromosoma íntegro en el doble mutante *nrdA101 dnaA46* permitiría una correcta segregación y posterior división a temperatura restrictiva.

El alelo *dnaA46* induce importantes alteraciones en el ciclo celular de la estirpe *nrdA101* a temperatura permisiva. Dos aspectos de la replicación son los más afectados: la elongación y la sincronía de la iniciación. El tiempo de generación no cambia significativamente.

La introducción de *dnaA46* en una estirpe mutante *nrdA101* conlleva un notable descenso en el tiempo de replicación (Tabla 3). El acortamiento del periodo C en mutantes *dnaA46* ha sido observado anteriormente por otros autores (Boye *et al.*,

1996; Lobner-Olesen *et al.*, 1989). Para explicar este fenómeno estos autores proponen que la baja capacidad de unión de la proteína DnaA46 al DNA, incluso a temperatura permisiva, despejaría el camino del replisoma de monómeros de DnaA que de otra forma se unirían a multitud de secuencias con mayor o menor afinidad a lo largo del cromosoma, lo cual afectaría directamente a la progresión de la horquilla de replicación. En la estirpe *nrdA101*, el hecho de que la presencia del alelo *dnaA46* induzca una sobreexpresión de *nrdAB* sugiere que este aumento en la velocidad de replicación pueda ser debido a una mayor disponibilidad de dNTPs, que ciertamente estaría limitada en una estirpe *nrdA101* a temperatura permisiva.

Los resultados de la figura 20 muestran que, tras inhibir el inicio de replicación en estirpes *dnaA46* por adición de rifampicina, hay poblaciones de células que acaban con un número de cromosomas diferente de  $2^n$ . Esto refleja una asincronía en la iniciación debido a que no todos los orígenes han iniciado o que la iniciación no se ha llevado a cabo en todos los orígenes a la vez (Skarstad *et al.*, 1988). La asincronía se observa tanto en la estirpe *nrdA101 dnaA46* como en la estirpe *nrdA<sup>+</sup> dnaA46*, lo que indica que es un fenotipo asociado a la presencia de la proteína Dna46 y no aparentemente relacionado con la presencia de una NDP reductasa alterada. La asincronía de la replicación en un mutante *dnaA46* ha sido descrita previamente en *E. coli* y no depende de la actividad ni de una insuficiente cantidad de DnaA funcional, ya que la sobreexpresión de *dnaA46* no revierte este fenotipo. Este comportamiento parece estar causado por un déficit en una función de DnaA diferente de su actuación positiva sobre el proceso de inicio de la replicación. Se ha propuesto que DnaA podría tener un papel importante en la coordinación de la iniciación en los diferentes *oriC* dentro de una misma célula (Skarstad *et al.*, 1988).

Por otra parte, para comprobar si la supresión de la mutación *nrdA101* por la inactivación de DnaA es específica del alelo *dnaA46* se analizó el fenotipo de los dobles mutantes *nrdA101 dnaA5* y *nrdA101 dnaA508*. Al igual que DnaA46, DnaA5 posee la sustitución A184V en el dominio de unión a ATP/ADP, pero la mutación secundaria G426S no se encuentra en este dominio, sino en el dominio de unión al DNA (Hansen *et al.*, 1992), por lo que, además de ser defectiva en la unión a ATP/ADP, también lo es en la unión al DNA (Carr y Kaguni, 1996). DnaA508 contiene las sustituciones P28L y T80I, ambas en el dominio de oligomerización (Hansen *et al.*, 1992). Debido a esto, DnaA508 presenta menor capacidad de unión a otros monómeros de DnaA y a DnaB (Seitz *et al.*, 2000; Weigel *et al.*, 1999). Tanto *dnaA5* como *dnaA508* confieren a la bacteria portadora un carácter termosensible, ya que no permiten el inicio de la replicación a más de 40°C.

Los resultados de la cuantificación de la síntesis de DNA a 42°C y de la microscopía indican que ambas mutaciones producen en una estirpe *nrdA101* un efecto similar al observado con *dnaA46*, esto es, posibilitan la replicación íntegra de los

## Discusión

---

cromosomas, la segregación cromosómica y la división celular a temperatura restrictiva. Esto demuestra que la supresión del fenotipo *nrdA101* por inactivación de DnaA no es específica del alelo *dnaA46*.

El hecho de que el doble mutante *nrdA101 dnaC2* no consiga finalizar las rondas de replicación a temperatura restrictiva indica que la inhibición de los inicios de replicación no es suficiente para que se lleve a cabo la finalización de las rondas de replicación en marcha tras el cambio de temperatura en un mutante *nrdA101*. En cualquier caso, estos resultados deben ser tomados con cautela. DnaC está descrito principalmente como factor de iniciación (Carl, 1970; Schubach *et al.*, 1973; Wechsler y Gross, 1971), interaccionando con DnaB para cargarla en *oriC* (Bramhill y Kornberg, 1988; Funnell *et al.*, 1987). Sin embargo, DnaC también participa en la organización del primosoma en la horquilla de replicación cuando ésta sufre una parada en su avance hacia el término (Maisnier-Patin *et al.*, 2001). Por lo tanto, DnaC no es un factor estrictamente requerido para la iniciación sino que también juega un papel importante en la elongación. Varios autores han informado de que mutantes *dnaC2* presentan problemas para completar las replications a temperatura restrictiva, encontrando cierto porcentaje de células que no consiguen acabar las rondas de replicación que tienen en marcha en el momento del cambio de temperatura. Presumiblemente, estas dificultades para completar las replications se deben a la ausencia de reanudación de las horquillas paradas estocásticamente a lo largo del cromosoma (Maisnier-Patin *et al.*, 2001; Rudolph *et al.*, 2007). Esto es así en estirpes *dnaC2* que no poseen ninguna mutación adicional que pudiera alterar la procesividad de la replicación. Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación han demostrado que una estirpe *nrdA101* tiene afectada la procesividad de la replicación incluso a temperatura permisiva, presentando una mayor frecuencia de paradas de la que su estirpe isogénica *nrdA+* (Guarino *et al.*, 2007a). Teniendo esto en cuenta, es lógico pensar que la síntesis de DNA a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101* sea todavía más dependiente de DnaC que en una estirpe silvestre. Esta dependencia podría ser responsable de que no se completen las rondas de replicación a 42°C en la estirpe *nrdA101 dnaC2* en condiciones de inhibición de la iniciación.

- ***La inhibición de la iniciación no es necesaria para que un mutante nrdA101 finalice la replicación a temperatura restrictiva***

Los resultados obtenidos con el doble mutante *nrdA101 dnaC2* apuntaban, aunque no de forma concluyente, a que la termorresistencia de la replicación observada

en un mutante *nrdA101* cuando se inactiva DnaA no es consecuencia de la ausencia de iniciación. Sin descartar todavía esta posibilidad, nos planteamos una nueva hipótesis.

Se ha descrito que mutantes condicionales de iniciación provocan un incremento de la expresión del operón *nrdAB*, sobre todo a temperatura restrictiva. Entre ellos están *dnaA46*, *dnaA508* y *dnaC2* (Filpula y Fuchs, 1978; Marinus, 2006). Este hecho nos llevó a considerar la posibilidad de que en los dobles mutantes *nrdA101 dnaA<sub>ts</sub>* la sobreexpresión de *nrdA101* pudiera estar creando una nueva situación que mediara en la finalización de la replicación cromosómica

Para comprobar esta nueva hipótesis se utilizó el alelo *dnaA174*, aislado por Otenberg y colaboradores durante la realización de este trabajo (Ortenberg *et al.*, 2004). *dnaA174* provoca un aumento de la expresión del operón *nrdAB* sin inhibir el inicio de la replicación. Al contrario que el resto de alelos *dnaA* utilizados, éste no codifica una proteína termolábil. La sustitución AT174P en la proteína codificada por este alelo tiene como consecuencia la hidrólisis constitutiva de ATP por parte de DnaA sin la mediación de Hda. Como resultado, el balance DnaA-ATP / DnaA-ADP disminuye notablemente. Basándose en éstas y otras evidencias Gon y colaboradores propusieron que DnaA-ATP actúa como represor de la transcripción de *nrdAB*, coordinando los niveles de NDP reductasa con el ciclo celular (Gon *et al.*, 2006).

Con el fin de averiguar si el aumento en la expresión de *nrdAB* podría ser la causa de la termorresistencia de la replicación en las estirpes *nrdA101 dnaA<sub>ts</sub>* se introdujo el alelo *dnaAT174P* en JS1018. La nueva estirpe no sólo consigue completar las replications en marcha sino que es capaz de iniciar nuevas rondas y permanecer sintetizando DNA durante mucho más tiempo (Fig. 32). Además, los cromosomas replicados son segregados correctamente y la división celular se lleva a cabo sin aparentes problemas (Fig. 33 y 34). Estos resultados descartan definitivamente la hipótesis de la ausencia de inicios como responsable de la finalización de las replications a 42°C.

Para verificar que la causa directa del aumento de la termorresistencia de la replicación del mutante *nrdA101* a 42°C es el incremento en los niveles de NDP reductasa en la célula y no la propia alteración de la proteína DnaA, se provocó una sobreexpresión de *nrdAB* sin recurrir a mutaciones en *dnaA*. El método empleado fue el crecimiento del mutante *nrdA101* en medio pobre en TdR. Cuando una estirpe auxótrofa para TdR, como es el caso de JS1018, es crecida en un medio con una concentración de TdR por debajo de la óptima para la replicación, la bacteria responde a esta escasez aumentando los niveles de NDP reductasa (Hanke y Fuchs, 1983). En estas condiciones, la síntesis de DNA de JS1018 obtenida a 42°C cuando se incubaba en medio con baja concentración de TdR es muy superior a la obtenida en presencia de la concentración óptima de TdR, lo que apoya la hipótesis de la sobreexpresión (Fig. 35).

## Discusión

---

Los resultados obtenidos señalan, por tanto, que un aumento de la cantidad de NDP reductasa confiere a un mutante *nrdA101* la capacidad de mantener la replicación durante un periodo mayor a 42°C. Este aumento fue corroborado determinando los niveles de NrdA a 42°C mediante western blot en las condiciones en las que se observa un aumento en la termorresistencia de la replicación. Se verificó que después de dos y, sobre todo, de tres horas de incubación a 42°C la cantidad de NrdA es muy superior en los dobles mutantes *nrdA101 dnaA46*, *nrdA101 dnaAT174P* y *nrdA101 dnaC2* que en el mutante sencillo *nrdA101*. Esto mismo se aprecia en el mutante sencillo cuando crece en medio pobre en TdR. Por consiguiente, exceptuando a la estirpe *nrdA101 dnaC2*, una mayor cantidad de NrdA a 42°C correlaciona con un periodo más largo de síntesis de DNA a temperatura restrictiva en el mutante *nrdA101*.

En 2006 Gon y colaboradores propusieron que DnaA-ATP actúa como represor de la transcripción de *nrdAB*. Sin embargo, esto entra en contradicción con los datos publicados anteriormente, que otorgan a DnaA una función como regulador positivo de la expresión de *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994), aunque posteriormente Herrick y Sclavi han reconciliado las dos propuestas en un modelo dual de la actuación de DnaA en el que bajos niveles de DnaA-ATP estimularían la expresión de *nrdAB* mientras que altos niveles la reprimirían (Herrick y Sclavi, 2007). Los datos presentados aquí apoyarían que DnaA-ATP reprime la expresión de *nrdAB* y que la sobreexpresión producida en mutantes en *dnaA* se debe a la ausencia de represión. DnaAT174P hidroliza ATP constitutivamente y DnaA46 y DnaA5 poseen menor capacidad de unirlo (Carr y Kaguni, 1996; Gon *et al.*, 2006; Hupp y Kaguni, 1993; Hwang y Kaguni, 1988), por lo que el resultado neto es una menor cantidad de DnaA unido a ATP. DnaA508 no tiene afectada su capacidad de unión a ATP, pero se ha probado que es degradada a 42°C. Esta degradación también ha sido observada en otros mutantes *dnaA<sub>s</sub>*, entre los que se encuentra *dnaA46* (Shimuta *et al.*, 2004). Así pues, el incremento en la expresión de *nrdAB* cuando baja la concentración de DnaA-ATP o cuando DnaA es degradado son datos difícilmente conciliables con un posible papel de DnaA como regulador positivo.

El mecanismo molecular que controla el aumento de la transcripción de *nrdAB* en un mutante *dnaC2* no ha sido descrito hasta el momento. La sobreexpresión de *nrdA* que se produce en el doble mutante *nrdA101 dnaC2* plantea una contradicción. En esta estirpe no se observa ningún cambio en su replicación con respecto a la estirpe *nrdA101* tras ser incubada a 42°C, pero, sí se aprecia un aumento en el nivel de NrdA. En este caso, la sobreexpresión de *nrdAB* no aumenta el periodo de termorresistencia de la replicación de un mutante *nrdA101* a 42°C. Teniendo en cuenta la implicación de DnaC en la elongación, es posible que su inactivación interfiera el avance de las horquillas hasta el término por su requerimiento en la reanudación de la replicación tras una parada. Estaríamos entonces ante una nueva situación, en la que el avance de las

horquillas de replicación de un mutante *nrdA101* a 42°C requeriría la actividad de la proteína DnaC.

- ***Condiciones que mantienen un nivel suficiente de NDP reductasa permiten la replicación en un mutante nrdA101 a temperatura restrictiva***

Los datos mostrados indican que un incremento en los niveles de NrdA101 permite la replicación en condiciones restrictivas. Esta asociación entre los niveles de NDP reductasa y la replicación a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101* sería imposible si la enzima fuera inactivada por la temperatura *in vivo* como ocurre *in vitro*, ya que un aumento de la proteína inactiva no tendría consecuencias para la replicación.

Dos alternativas podrían explicar esta observación. Una sería que el exceso de enzima alterada compensara el descenso de actividad causado por la incubación a 42°C; la segunda sería que la enzima mutante fuera degradada a temperatura restrictiva por alguna proteasa y que ésta se viera saturada en condiciones de sobreexpresión de *nrdAB*, proporcionando un mayor periodo de permanencia y actividad de la enzima mutante en estas condiciones.

Los resultados obtenidos indican que a 42°C se está produciendo una degradación de la subunidad R1 codificada por *nrdA101*. Esta degradación no se produce en presencia de rifampicina y se vería compensada en condiciones de sobreexpresión del operón en las que se produce un mantenimiento de los niveles de NDP reductasa codificada por *nrdA101* durante más tiempo a temperatura restrictiva.

El principal objetivo de este trabajo fue encontrar una explicación al hecho de que un mutante *nrdA101* complete las rondas de replicación después de ser incubado a 42°C en presencia de rifampicina. La proteína NrdA codificada por el alelo *nrdA101* es degradada a temperatura restrictiva, pero esta degradación no se observa bajo inhibición de la transcripción o de la traducción. Esto sugiere que la degradación de NrdA101 depende de la síntesis de un factor proteico, probablemente una proteasa expresada como respuesta al choque térmico o a la presencia de una proteína deformada. La inducción de sistemas de degradación/replicación de proteínas es un fenómeno ampliamente estudiado en *Escherichia coli* y forma parte de un cambio fisiológico global que se produce en la célula como respuesta a diferentes situaciones de estrés. Esta respuesta induce cambios en la expresión de proteasas, chaperonas y una gran cantidad de genes que controlan el estatus metabólico de la célula (revisado en Klauck *et al.*, 2007).

## Discusión

---

A modo de resumen, podemos afirmar que en este trabajo se encuentran y analizan dos condiciones en las que un mutante termosensible *nrdA101* puede replicar a temperatura restrictiva:

- La inhibición de la síntesis de RNA y/o de proteínas. Esta condición permitiría el mantenimiento de los niveles de NDP reductasa suficientemente altos como para soportar la replicación activa a temperatura restrictiva. Proponemos que la inhibición de la transcripción o de la traducción causaría la ausencia de una proteasa termoinducida o inducida por la presencia de proteínas deformadas. Bajo estas condiciones, la replicación cromosómica requeriría la actividad estabilizadora de las horquillas de replicación asociada a RecA.
- La sobreexpresión de *nrdA101*. Esta condición permitiría el mantenimiento de los niveles de NDP reductasa suficientes para mantener la replicación a 42°C, aún en presencia de proteasa.

Existen numerosas evidencias que apuntan a que esta hiperestructura está compuesta por la maquinaria de replicación, el complejo de síntesis de nucleótidos, el cromosoma y la membrana celular (revisado en Norris *et al.*, 2007a; y Norris *et al.*, 2007b). En una estirpe *nrdA101*, los requerimientos de RecA a temperatura restrictiva, bajo inhibición de síntesis de proteínas, y de DnaC, en condiciones de sobreexpresión de *nrdAB*, aportan nuevos indicios que relacionan el replisoma con el complejo de síntesis de nucleótidos. Ambas proteínas poseen un papel en la elongación de la replicación y son necesarias en el mutante *nrdA101* en situaciones en las que su ausencia en una estirpe *nrdA*<sup>+</sup> no supone un efecto dramático.

El requerimiento de DnaC y de RecA, en concreto de su actividad estabilizadora de las horquillas de replicación, parece reflejar que el mantenimiento de la actividad de la NDP reductasa termosensible en las condiciones restrictivas se ve perjudicado cuando la hiperestructura de replicación se desorganiza, bien sea a causa de la no estabilización de las horquillas por RecA o a causa del no reensamblaje del primosoma por la inactivación de DnaC. Esto sugiere que la NDP reductasa sería más susceptible a la inactivación/degradación cuando no se encontrara incluida en tal hiperestructura.

El hecho de que la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* sea capaz de mantener la replicación cromosómica durante más de dos ciclos supone un importante apoyo al modelo que implica a la NDP reductasa como un componente de la hiperestructura de replicación. Las condiciones experimentales en las que observamos una “excepcional” termorresistencia de la replicación del mutante *nrdA101* a 42°C tienen como punto en común el hecho de que la NDP reductasa codificada por el alelo



*nrdA101*, aún siendo termolabil, está activa en las condiciones restrictivas. Esto apoya la teoría de que la NDP reductasa actúa *in vivo* incluida en una estructura de orden superior que la protege de la inactivación térmica y/o de la degradación por alguna proteasa, pero además tiene otras implicaciones que perfilan el modelo.

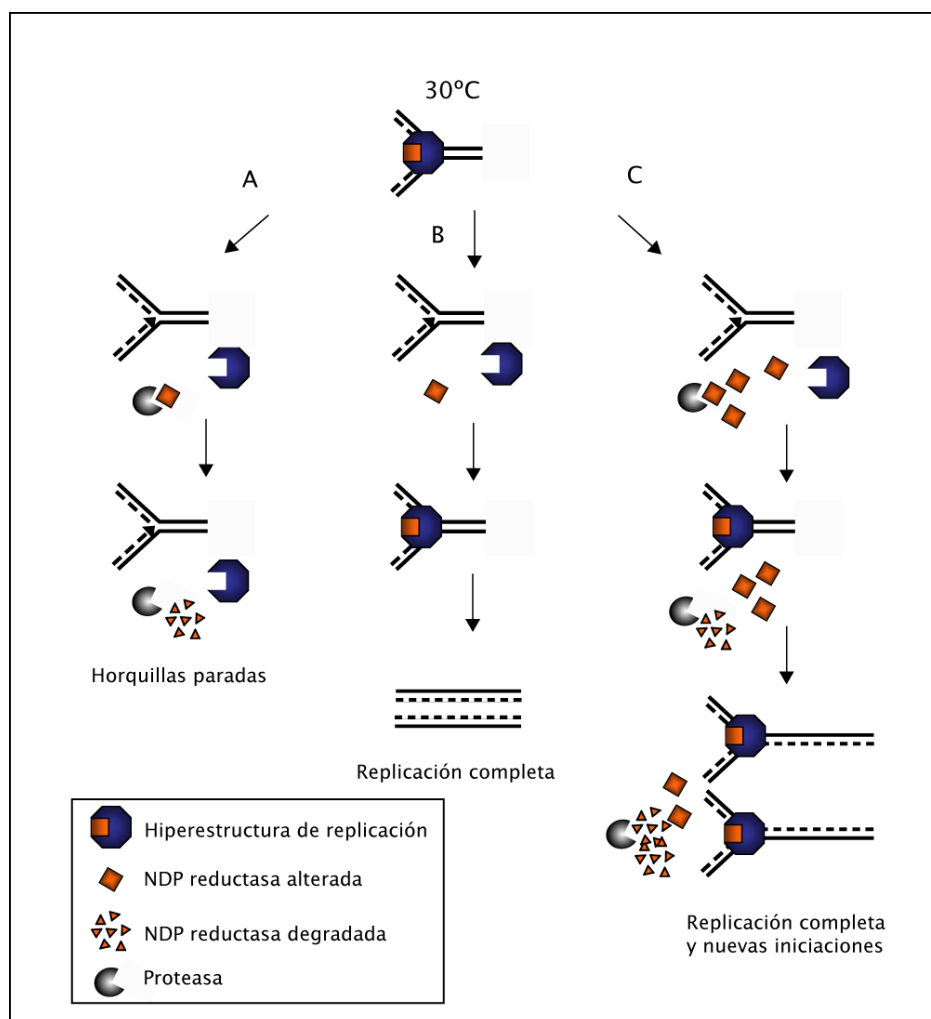
- **Modelo de replicación en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva**

Como punto final de este trabajo, los hechos observados nos llevan a proponer un modelo de replicación que proporciona una visión conjunta de los procesos que pudieran estar sucediendo en la replicación de un mutante *nrdA101*.

- A 30°C habría paradas de la replicación que causarían la desorganización de la hiperestructura de replicación. Estas horquillas paradas serían procesadas por alguno de los mecanismos propuestos y se reclutaría de nuevo a los componentes de la hiperestructura para reanudar la replicación, como ocurre en una estirpe *nrdA*<sup>+</sup>.
- A 42°C la NDP reductasa termosensible estaría protegida de la alteración estructural y de su posible degradación por su inclusión en la hiperestructura. La replicación continuaría, por tanto, hasta que se produjera una parada que causara la desorganización de la hiperestructura. En ese momento la NDP reductasa quedaría expuesta a la acción de la proteasa y el resultado sería que la replicación no podría reanudarse (Fig. 38-A).
- La inhibición de la síntesis de proteínas a temperatura restrictiva impediría la expresión de la proteasa. Tras la desorganización de la hiperestructura, la NDP reductasa, aunque alterada, no sería degradada y podría volver a ensamblarse junto con la hiperestructura. Esto permitiría la reanudación de la replicación para producir cromosomas completos (Fig. 38-B).
- En condiciones de sobreexpresión de *nrdAB* a 42°C existiría un exceso de NDP reductasa libre y deformada en el mutante *nrdA101* que saturaría la actividad de la proteasa permitiendo el mantenimiento un cierto nivel de

## Discusión

enzima para ser ensamblada en nuevas hiperestructuras de replicación. En estas condiciones un mutante *nrdA101* no sólo tiene capacidad para volver a organizar la hiperestructura de replicación tras una parada sino que también puede iniciar nuevas rondas de replicación a temperatura restrictiva, lo que implica la formación de nuevas hiperestructuras (Fig. 38-C).



**Fig. 38.** Modelo de replicación cromosómica en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva. (A) replicación a 42°C; (B) replicación a 42°C en ausencia de síntesis de proteínas; (C) replicación a 42°C en condiciones de sobrexpresión de *nrdAB*.

*Conclusiones*



1. En ausencia de síntesis de proteínas, un mutante *nrdA101* es capaz de replicar íntegramente el cromosoma bacteriano a temperatura restrictiva.
2. La actividad estabilizadora de la proteína RecA sobre las horquillas de replicación es necesaria para mantener la replicación cromosómica en un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva en ausencia de síntesis de proteínas.
3. La sobreexpresión de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* permite la replicación íntegra de los cromosomas a temperatura restrictiva.
4. La replicación completa de los cromosomas suprime las alteraciones en los procesos de división celular y segregación cromosómica en la estirpe *nrdA101* a temperatura restrictiva.
5. DnaC ejerce una función requerida para la replicación completa de los cromosomas en condiciones de sobreexpresión de la NDP reductasa en un mutante *nrdA101*.
6. El alelo *nrdA101* induce un aumento de la expresión de la NDP reductasa a temperatura restrictiva.
7. La NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* es capaz de llevar a cabo la reanudación y el inicio de nuevas rondas de replicación a temperatura restrictiva.
8. La NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* es degradada a 42°C. Esta degradación requiere síntesis de proteínas. Proponemos la existencia de una proteasa termoinducida que degradaría a la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101*.

## *Conclusiones*

---

*Anexo*



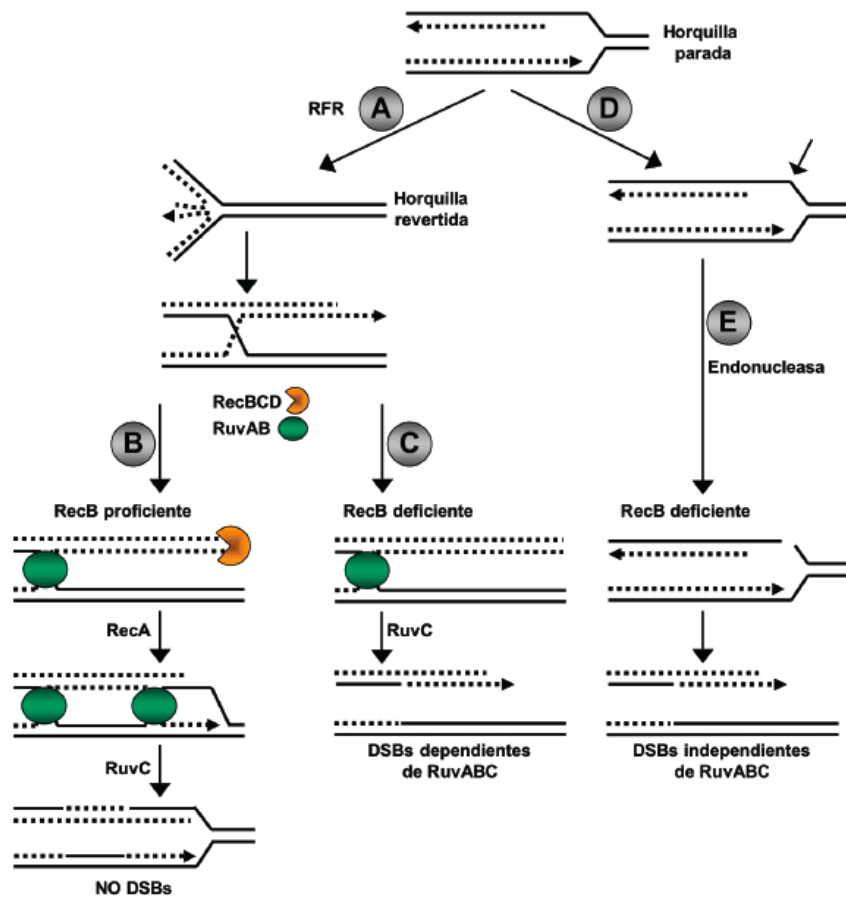


## **Procesamiento de las horquillas de replicación paradas por carencia de nucleótidos y su relación con la muerte por carencia de timina en *Escherichia coli***

Trabajos previos de nuestro laboratorio han verificado que las horquillas de replicación paradas por inactivación de la NDP reductasa tras la incubación de un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva eran procesadas vía RFR, aunque con ciertas limitaciones en comparación con otros mutantes de replicación (Guarino E., Tesis Doctoral, 2006). Esta observación podría estar relacionada con la posible participación de la NDP reductasa alterada en la hiperestructura de replicación, lo que nos indujo a llevar a cabo un estudio comparativo sobre la capacidad de la horquilla de replicación para ser revertida después de haber sido detenida por carencia de desoxirribonucleótidos mediante la inactivación de la NDP reductasa o por la eliminación de timina, uno de los precursores para la síntesis de dNTPs.

La inactivación de la NDP reductasa se realizó de dos maneras: por adición de hidroxiamina (Hu), que es un inhibidor específico de la NDP reductasa (Rosenkranz y Levy, 1965), o por la incubación de una estirpe *nrdA101* termosensible a 42°C. La carencia de timina se efectuó por la eliminación de la TdR del medio de crecimiento ya que las estirpes utilizadas son auxótrofas para este nutriente.

Durante muchos años se ha sabido que la eliminación de la timina del medio de crecimiento provoca la muerte celular de los microorganismos auxótrofos para este compuesto, proceso que se ha denominado “muerte por carencia de timina” (TLD, *thymineless death*). Esta letalidad es inusual, ya que la carencia del resto de dNTPs tiene un efecto bacteriostático, pero no letal. La carencia de timina conlleva multitud de efectos: detiene la síntesis de DNA, genera cortes de cadena sencilla; eliminación de plásmidos; pérdida de la capacidad de transformación; filamentación; cambios en el tamaño del pool de nucleótidos y nucleósidos; e inducción de fagos (Ahmad *et al.*, 1998). Este fenómeno ha sido investigado durante cinco décadas, pero el mecanismo molecular sigue aún siendo un enigma. En este trabajo proponemos que la TLD está relacionada con el destino de las horquillas de replicación paradas generadas cuando la timina es eliminada.



**Fig. 1.** Procesamiento de las horquillas de replicación paradas. En el primer paso (A), la replicación se para generando una horquilla revertida. Esta horquilla forma un intermediario de Holliday (HJ) (se muestran dos representaciones alternativas de esta estructura). En células  $Rec^+$  (B), RecBCD inicia una recombinación homóloga dependiente de RecA y el HJ que se forma es resuelto por RuvABC. En ausencia de RecBCD (C), la resolución del HJ por RuvABC genera DSBs en la horquilla de replicación parada. Alternativamente, la horquilla de replicación se para sin ser revertida (D) y es susceptible de ser cortada por una endonucleasa generando DSBs en la horquilla de replicación parada (E). Línea continua (cromosoma parental); líneas discontinuas (cadenas recién sintetizadas); discos (RuvAB); discos con incisión (RecBCD).

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Aproximación experimental**

Como se describe en *Introducción* (apartado 2.2.2), se han propuesto varias estrategias de procesamiento de las horquillas de replicación paradas. La mayoría de ellas requieren una actuación de las proteínas de recombinación en la que están implicadas distintas enzimas dependiendo de la causa que genera la parada de la horquilla (Kreuzer, 2005). En varios mutantes de replicación, la horquilla parada generada tras la inactivación de enzimas mutadas sufre una reversión que genera la formación de un intermediario de Holliday (HJ), adyacente a una cola de DNA de doble cadena, en una reacción denominada “reversión de la horquilla de replicación” (RFR) (Fig. 1-A) (Michel *et al.*, 2004). En una bacteria silvestre este intermediario puede ser procesado sin generar roturas de DNA de doble cadena (DSBs) mediante la acción de las proteínas de recombinación RecBCD, RecA y la resolvasa específica de HJ, RuvABC (Fig. 1-B) (Kuzminov, 1999). Sin embargo, en ausencia de la actividad RecBCD (Fig. 1-C), RuvABC lleva a cabo la resolución del HJ generado tras el RFR y genera roturas de la horquilla (Seigneur *et al.*, 1998).

Según este modelo de RFR, la reversión en la horquilla parada se puede verificar analizando si hay un aumento de DSBs en un fondo genético deficiente en *recB* y determinando si esos DSBs dependen de la actividad resolvasa de RuvABC midiendo la cantidad de DSBs en un fondo genético *recB* y *recB ruvABC* (Seigneur *et al.*, 1998). El empleo de una estirpe deficiente en *recB* es necesario para inhibir la degradación o la reparación por recombinación de la cola de DNA creada por la regresión de la horquilla (Fig. 1-B), permitiendo a la resolvasa RuvABC transformar esta cola en un corte de doble cadena, y para inhibir la reparación de los cortes de doble cadena generados por RuvABC (Fig. 1-C). La existencia de RFR en las horquillas de replicación paradas se ha verificado mediante este sistema en varios mutantes de replicación, como en mutantes *rep*, *dnaBts*, *holD<sup>C10</sup>*, *dnaEts* y *dnaNts* (Flores *et al.*, 2001; Grompone *et al.*, 2002; Michel *et al.*, 1997; Seigneur *et al.*, 1998).

Si la reversión de la horquilla parada no tuviera lugar, se podrían generar al menos dos situaciones. Por un lado, podría haber un aumento de DSBs independientes de la actividad de RuvABC y generados por otra endonucleasa desconocida (Fig. 1-E), como ocurre en el caso de un mutante *dnaBts recB ruvABC* a 42°C en ausencia de RecA (Horiuchi y Fujimura, 1995). Por otro lado, podría no haber un aumento en la cantidad de DSBs, debido a que la horquilla parada no fuese susceptible de la acción de una endonucleasa, y en ese caso la reanudación de las horquillas tendría lugar sin la generación de roturas. Esta situación ha sido descrita en mutantes *gyrB* (Grompone *et*

*al.*, 2003) y cuando se han situado las secuencias de terminación de la replicación *ter* en posiciones ectópicas en el cromosoma bacteriano (Bidnenko *et al.*, 2002).

- **La carencia de nucleótidos induce DSBs**

Cultivos de las estirpes JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*), JK707 (*nrdA<sup>+</sup> recB ruvABC*) y sus derivadas isogénicas *nrdA101* JS628 y JS705 respectivamente se crecieron a 30°C en medio mínimo M9 que contenía 5 µCi/ml de <sup>3</sup>H-TdR. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O.<sub>550nm</sub> de 0,2 unidades una alícuota del cultivo de JK626 y de JK707 se trató con Hu 50 mM y a una segunda alícuota se le eliminó la TdR por filtración y se mantuvo a 30°C. Para conseguir la inactivación térmica de la NDP reductasa, cultivos de las estirpes *nrdA101*, JS628 y JS705, que crecían a 30°C se cambiaron a 42°C tras alcanzar una DO<sub>550nm</sub> de 0.2 unidades. Para determinar la existencia de DSBs se cuantificó la cantidad de DNA lineal antes de aplicar el tratamiento y dos horas después de la adición de Hu o de la incubación a 42°C, así como 30 minutos después del tratamiento de eliminación de TdR.

Las células marcadas <sup>3</sup>H-TdR se lisaron suavemente en bloques de agarosa y su DNA se analizó por electroforesis en campo pulsante (PFGE), donde solamente entra en el gel el DNA lineal mientras que las moléculas circulares permanecen en los pocillos (apartado 8 de *Métodos*) (Michel *et al.*, 1997; Seigneur *et al.*, 1998).

Los resultados mostrados en la tabla 1 indican que la inactivación de la NDP reductasa por la adición de Hu aumenta dos veces aproximadamente la cantidad de DNA lineal en la estirpe JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) y JS628 (*nrdA101 recB*), revelando que se produce un aumento de DSBs. Sin embargo, cuando se analizó si la incubación de la estirpe JS628 (*nrdA101 recB*) a 42°C generaba la formación de DSBs, sólo se encontró un ligero aumento de estos con respecto a los encontrados a 30°C (Tabla 1). Al medir los DSBs en JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) en condiciones de carencia de timina, utilizando una aproximación experimental similar a la empleada con las otras condiciones, se encontró un aumento de DSBs en JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) 30 minutos después de la eliminación de TdR (Tabla 1). Aunque anteriormente ha sido observada la rotura del DNA en carencia de timina, el que se produjeran o no cortes de cadena doble en estas condiciones ha sido un tema controvertido (Nakayama y Hanawalt, 1975). Usando gradientes de densidad neutros, Yoshinaga y colaboradores fueron capaces de detectar DSBs en células de *E. coli* bajo carencia de timina (Yoshinaga, 1973) y, usando elución de filtro neutro, se han detectado DSBs en células FM3A de ratón mutantes nullos para la timidilato sintasa (Ayusawa *et al.*, 1983). En cambio, Nakayama y colaboradores fueron incapaces de detectar DSBs en células bajo carencia de timina usando PFGE (Nakayama

et al., 1994). Sin embargo, el sistema genético usado en ese trabajo difiere de nuestras condiciones experimentales.

**Tabla 1.** Porcentaje de DNA lineal en estirpes *nrdA*<sup>+</sup> y *nrdA101* en condiciones de eliminación de dNTP.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo relevante</b>	<b>30°C</b>	<b>42°C</b>	<b>+Hu</b>	<b>-TdR</b>
JK626	<i>nrdA</i> <sup>+</sup> <i>recB</i>	15.18 ± 2.83	13.97 ± 7.10	30.33 ± 3.20	24.14 ± 7.12
JK707	<i>nrdA</i> <sup>+</sup> <i>ruv</i> <i>recB</i>	6.74 ± 2.60	2.63 ± 0.70	3.68 ± 2.10	26.26 ± 9.83
JS628	<i>nrdA101</i> <i>recB</i>	24.79 ± 7.05	32.09 ± 6.02	40.88 ± 2.81	-
JS705	<i>nrdA101</i> <i>ruv</i> <i>recB</i>	5.94 ± 2.19	3.34 ± 2.28	5.55 ± 0.93	-

- ***Las horquillas de replicación paradas por carencia de nucleótidos difieren en su capacidad de reversión***

Para analizar si los DSBs eran debidos a la acción de RuvABC se analizó por campo pulsante el DNA de JK707 (*nrdA*<sup>+</sup> *recB* *ruvABC*) en presencia de Hu o tras la eliminación de TdR y de JS705 (*nrdA101* *recB* *ruvABC*) con Hu o tras incubarla a 42°C. El nivel de DNA lineal disminuyó en presencia de Hu o tras incubación a 42°C (Tabla 1), indicando que los DSBs generados por la eliminación de dNTPs en estas condiciones eran consecuencia de la actividad resolvasa de RuvABC en un fondo genético deficiente en *recB*. Estos resultados señalan que se induce RFR en las horquillas de replicación paradas por inactivación química de la NDP reductasa. El hecho de que la estirpe *nrdA101* incubada a temperatura restrictiva induzca sólo un pequeño aumento de DSBs dependientes de RuvABC indicaría que las horquillas de replicación paradas generadas por la inactivación térmica de la NDP reductasa son menos susceptibles de ser revertidas que en el caso de la inactivación química.

Sorprendentemente, los niveles de DSBs no se redujeron bajo carencia de timina (Tabla 1), por tanto, estos DSBs no dependen de la actividad resolvasa de RuvABC, ya que se dan bajo la inactivación de esta enzima. Esto indica que las horquillas de replicación paradas por carencia de timina no experimentan el proceso de RFR. Los DSBs encontrados con este tratamiento podrían ser generados o bien por una rotura endonucleolítica directa en una región de cadena sencilla en la horquilla parada

o cerca de ella (Fig. 1-D), por roturas en regiones de cadena sencilla en lugares no relacionados con la horquilla de replicación, o por ambos tipos de rotura.

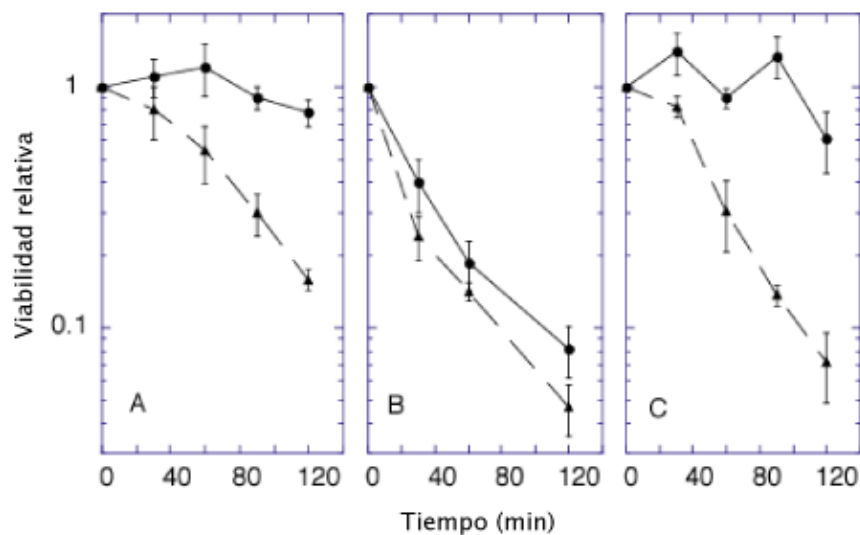
Estos resultados muestran que las horquillas de replicación paradas generadas por eliminación de nucleótidos presentan una capacidad diferente de experimentar RFR tras la eliminación de dNTPs dependiendo de la vía por la que se consiga esta eliminación. La reversión de la horquilla de replicación ocurre en la horquilla parada generada por la adición de Hu, es entorpecida en la horquilla generada por la inactivación térmica de la NDP reductasa y no tiene lugar cuando la replicación se para por la carencia de timina. Estas observaciones indican que la estructura generada en la horquilla de replicación es diferente dependiendo de la vía de inactivación de la NDP reductasa. Asumiendo el modelo en el que la NDP reductasa forma parte de la hiperestructura de replicación (Guzmán *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005; Norris *et al.*, 2007a; Norris *et al.*, 2007b; Riola *et al.*, 2007) y que la hiperestructura fuera un impedimento físico para la reversión de la horquilla (Flores *et al.*, 2005; Norris *et al.*, 2007a), los resultados obtenidos tras la inactivación térmica o química de la NDP reductasa pueden ser explicados estableciendo una relación entre la presencia de las proteínas de replicación en la horquilla parada y la capacidad que tiene la horquilla de llevar a cabo RFR. Proponemos que la horquilla de replicación parada en presencia de una NDP reductasa inactivada por Hu daría lugar al desensablaje de la hiperestructura permitiendo la reversión de la horquilla; mientras la horquilla parada a temperatura restrictiva en un mutante *nrdA101* podría dar lugar a un desensablaje en el que algunas proteínas de la hiperestructura permanecieran en la horquilla interfiriendo con el proceso de RFR (Guarino *et al.*, 2007b). En este sentido, el fenotipo del mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva es bastante peculiar, ya que en la mayoría de los mutantes de replicación se detecta RFR tras la incubación a 42°C (Mitchel 2004). Sólo el mutante termosensible portador del alelo *dnaN159* no induce RFR después de su incubación a temperatura restrictiva (aunque sí lo hace a 37°C) y en este caso se ha propuesto que la abrazadera  $\beta$  podría tener un papel atrayendo a proteínas que pudieran estar implicadas en catalizar el RFR (Grompone *et al.*, 2002).

No es probable que la carencia de timina afecte a las enzimas de la hiperestructura de replicación, así que se podría pensar que cuando las horquillas de replicación se paran bajo este tratamiento no se produce una desorganización de la hiperestructura. Las proteínas de replicación permanecerían en la horquilla parada e impedirían su reversión. Sin embargo, la eliminación de timina es una condición patológica para la célula, con una complicada trama de respuestas (Ahmad *et al.*, 1998), y no se pueden excluir otros efectos que pudieran explicar el entorpecimiento de la reversión. Podríamos proponer la inducción de algunas proteínas capaces de obstaculizar la RFR (Ahmad *et al.*, 1998; Freifelder *et al.*, 1972; Sat *et al.*, 2003) o los

cambios en el superenrollamiento resultantes de las roturas de cadena sencilla observadas (Nakayama y Hanawalt, 1975; Fierro-Fernández *et al.*, 2002).

- **Las horquillas de replicación revertidas previenen la letalidad**

Además de la formación de DSBs dependientes de RuvABC en un contexto deficiente en *recB*, el modelo del RFR implicaría diferencias en la viabilidad de estirpes deficientes en recombinación tratadas con Hu o con carencia de timina. Por un lado, si la RFR ocurre tras la adición de Hu, se esperaría un aumento de la letalidad en la estirpe mutante *recB* debido a la existencia de DSBs no reparados y una supresión de esta letalidad por la inactivación de la resolvasa RuvABC en una estirpe deficiente en *recB* y *ruvABC*. Por otro lado, si la RFR no ocurre en carencia de timina, la muerte por carencia de timina en la estirpe mutante *recB* no debería ser disminuida por la ausencia de la resolvasa RuvABC en la estirpe deficiente en *recB ruvABC*, ya que los DSBs inducidos por carencia de timina no son generados por RuvABC.



**Fig. 2.** Viabilidad de JK607 y derivadas deficientes en enzimas de recombinación. Efecto de la adición de Hu (●) y de la carencia de timina (▲) en la viabilidad de (A) la estirpe *rec*<sup>+</sup>, JK607; (B) la estirpe *recB* deficiente, JK626 y (C) la estirpe *recB ruvABC* deficiente, JK707. Se indica la desviación estándar de al menos cuatro experimentos independientes.

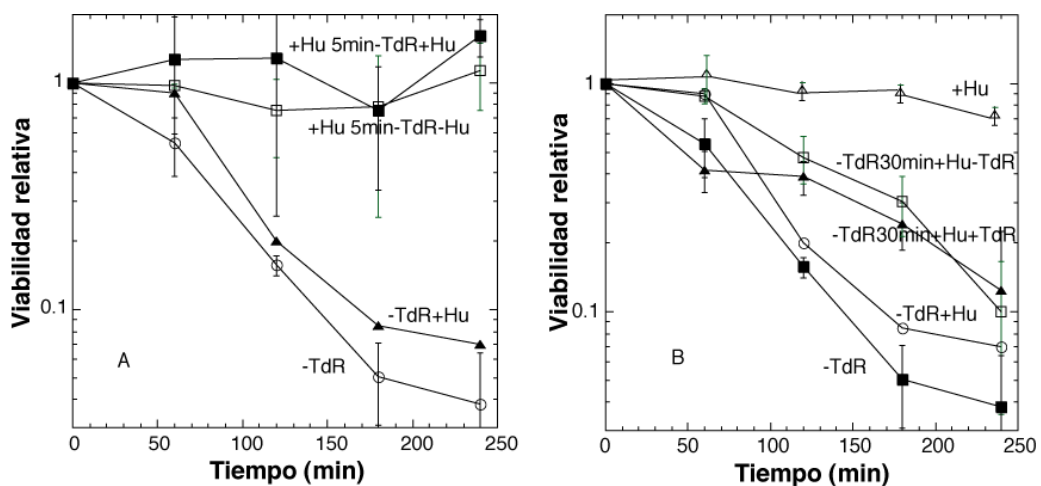
Los experimentos de viabilidad se llevaron a cabo creciendo a las estirpes JK607 (*rec*<sup>+</sup>), JK626 (*recB*) y JK707 (*recB ruvABC*) hasta una D.O.<sub>550</sub> de 0,2 y tratándolas con Hu o eliminado la TdR del medio, en las mismas condiciones experimentales que para los experimentos de electroforesis en campo pulsante. A los intervalos de tiempo indicados se tomaron alícuotas de 0,05 ml, se diluyeron apropiadamente y se sembraron en placas de medio rico para determinar el número de colonias. Se encontró que la viabilidad de la estirpe *recB* fue más sensible a la adición de Hu y a la carencia de timina, comparada con una estirpe silvestre (Fig. 2-A y B). Este resultado era esperable dado el aumento de los DSBs no reparados en ausencia de la actividad de RecBC. Este efecto negativo se recuperó por la inactivación de RuvABC sólo en el caso de la adición de Hu, pero no en la carencia de timina (Fig. 2-C). Estos resultados apoyan que la RFR ocurre cuando la replicación del DNA se inhibe por la adición de Hu, pero no cuando la parada de la síntesis de DNA se lleva a cabo por la carencia de timina. Estos resultados correlacionan el destino de las horquillas de replicación con la viabilidad de las células bajo estos tratamientos. Proponemos que el proceso de RFR podría proporcionar un sustrato para que las proteínas de recombinación se unieran e iniciaran alguna de las vías de recombinación (Michel *et al.*, 2004) o bien protegieran a las horquillas de replicación de una posible rotura (Courcelle y Hanawalt, 2003) evitando la pérdida de viabilidad de las células en determinadas condiciones, como el tratamiento con Hu.

- ***Las horquillas de replicación revertidas previenen TLD***

Después de observar que sólo las células que estaban replicando activamente su DNA sufrían TLD cuando se eliminaba la timina, Maaloe y Hanawalt propusieron una conexión entre las horquillas de replicación paradas y la TLD en *E. coli* (Hanawalt *et al.*, 1961; Maaloe y Hanawalt, 1961). Sin embargo, recientemente Morganroth y Hanawalt han observado que la muerte por carencia de timina ocurre tras la adición de Hu, concluyendo que la síntesis de DNA no es un requerimiento para TLD (Morganroth y Hanawalt, 2006). Surge entonces la pregunta ¿cuál es la conexión entre las horquillas de replicación paradas y la TLD? Según nuestro modelo, se podría esperar una supresión de la TLD tras la adición de Hu, pero sólo en caso de que la horquilla parada experimentase RFR en estas condiciones. En el trabajo mencionado, la adición de Hu se lleva a cabo a la vez que se elimina la TdR del cultivo y en esas condiciones el destino de la horquilla parada es, por el momento, desconocido. En este trabajo hemos realizado los experimentos separando ambos tratamientos en el tiempo. Por un lado, se añadió primero Hu durante 5 minutos con el fin de generar horquillas paradas que

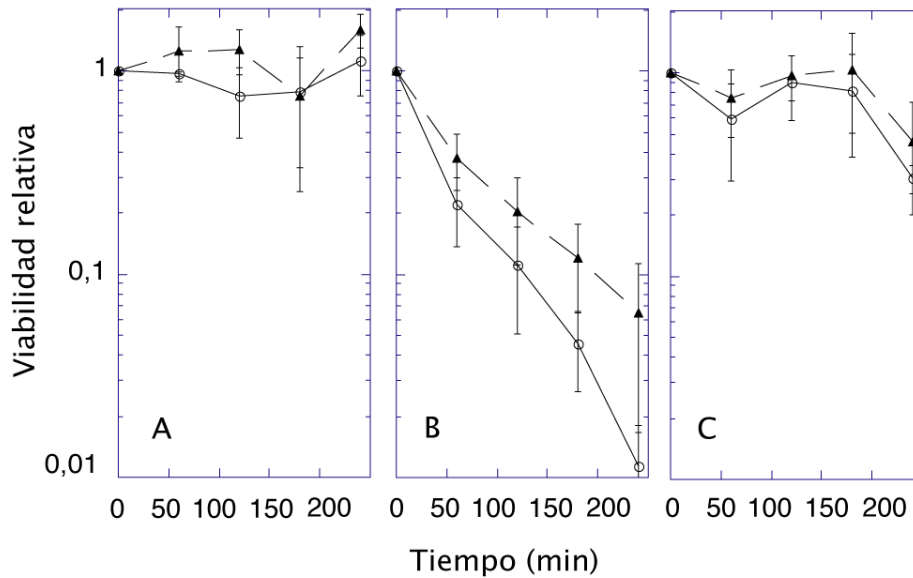


sufrieran una reversión y después se eliminó la TdR del medio de cultivo en presencia o en ausencia de Hu (Fig. 3-A). Los resultados muestran que la TLD es suprimida al adicionar Hu al cultivo antes de la eliminación de la TdR. Por otro lado se eliminó primero la TdR de los cultivos durante 30 minutos para generar horquillas paradas que no experimentarían una reversión y después se trataron los cultivos con Hu en presencia o en ausencia de TdR (Fig. 3-B). Estos resultados muestran que adición de Hu una vez que se ha eliminado la TdR del medio no suprime la TLD.



**Fig. 3.** Viabilidad de la estirpe *rec+* JK607 tras carencia de timina o adición de Hu. (A) Efecto de la adición de Hu 5 minutos antes de la carencia de timina en presencia o ausencia de Hu. (B) Efecto de 30 minutos de carencia de timina antes de la adición de Hu en presencia o ausencia de TdR. Se indica la desviación estándar de al menos cuatro experimentos independientes.

Para verificar que la prevención de la TLD observada cuando se añade Hu al cultivo 5 minutos antes de eliminar la TdR es consecuencia de que se está produciendo RFR se cuantificó la viabilidad de cultivos de JK607 (*rec+*), JK626 (*recB*) y JK707 (*recB ruvABC*) en estas condiciones (Fig. 4). Los resultados indican que la estirpe *recB* experimenta un descenso de su viabilidad, como era esperable, y que esta letalidad es suprimida por la inactivación de RuvABC. Esto señala que la adición de Hu 5 minutos antes de eliminar la TdR permite que las horquillas paradas sean revertidas.



**Fig. 4.** Viabilidad de JK607 y derivadas deficientes en enzimas de recombinación tras adición de Hu 5 minutos antes de la carencia de timina en presencia (▲) o ausencia (○) de Hu. (A) estirpe *rec<sup>+</sup>*, JK607; (B) estirpe *recB* deficiente, JK626; y (C) estirpe *recB ruvABC* deficiente, JK707. Se indica la desviación estándar de al menos cuatro experimentos independientes.

El hecho de que cuando se permite la reversión de las horquillas se previene la TLD apoya nuestra propuesta en la que la formación de cierta estructura por RFR evitaría el daño en el DNA causante de la letalidad producido por la ausencia de timina.

Conociendo que la adición de rifampicina previene la TLD (Ahmad *et al.*, 1998), se determinó el origen de los DSBs generados tras la carencia de timina en presencia de rifampicina y se utilizó como una aproximación diferente buscando un apoyo a la propuesta. Para analizar si los DSBs eran debidos a la acción de RuvABC, se analizó por campo pulsante el DNA de JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) y de JK707 (*nrdA<sup>+</sup> recB ruvABC*) tras la eliminación de TdR en presencia o ausencia de rifampicina. El nivel de DNA lineal en la estirpe *recB ruvABC* disminuyó en presencia de rifampicina (Tabla 2), indicando que la mayoría de los DSBs bajo estas condiciones eran originados por la endonucleasa RuvABC. Estos resultados muestran que la inhibición de la transcripción permite la reversión de las horquillas de replicación paradas por carencia de timina y, dado que la adición de rifampicina previene la TLD, estos datos apoyan una relación

entre el destino de las horquillas de replicación paradas y el efecto del tratamiento en la viabilidad celular.

**Tabla 2.** Porcentaje de DNA lineal en estirpes *nrdA*<sup>+</sup> bajo eliminación de TdR y/o de inhibición de síntesis de proteínas.

<i>Estirpe</i>	<i>Genotipo relevante</i>	<i>30°C</i>	<i>-TdR</i>	<i>-TdR +Rif</i>	<i>+Rif</i>
JK626	<i>nrdA</i> <sup>+</sup> <i>recB</i>	15.18 ± 2.83	24.14 ± 7.12	24.50 ± 2.05	13.97 ± 1.31
JK707	<i>nrdA</i> <sup>+</sup> <i>ruv recB</i>	6.74 ± 2.60	26.26 ± 9.83	10.46 ± 3.11	3.82 ± 0.98

Según esta propuesta la letalidad causada por la carencia de timina estaría relacionada con la aparición de DSBs independientes de RuvABC y sugerimos que estos DSBs, o al menos un número importante de ellos, se originan por una rotura endonucleolítica en la horquilla de replicación o cerca de ella. (Fig. 1-D y E). Esto explicaría la conexión existente entre la horquilla de replicación parada por carencia de timina y la TLD propuesta por Maaloe y Hanawalt en los sesenta. Sugerimos que esta conexión no se debe al proceso de replicación en sí mismo, ya que se ha demostrado que este no es requerido (Morganroth y Hanawalt, 2006), sino al destino de la horquilla de replicación parada cuando la TdR es eliminada.

*Anexo*

---

# *Bibliografía*



- Ahmad, S.I., Kirk, S.H., y Eisenstark, A. (1998) Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* **52**: 591-625.
- Alberts, B. (1998) The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* **92**: 291-294.
- Amundsen, S.K., y Smith, G.R. (2003) Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell* **112**: 741-744.
- Atlung, T., y Hansen, F.G. (2002) Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 1843-1850.
- Augustin, L.B., Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1994) *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* **176**: 378-387.
- Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H., Takeishi, K., Y Seno, T. (1983) Accumulation of DNA strand breaks during thymineless death in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *J Biol Chem* **258**: 12448-12454.
- Bahloul, A., Boubrik, F., y Rouviere-Yaniv, J. (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 Kornberg, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near *oriC*. *Cell* **55**: 113-123.
- Baker, T.A., y Wickner, S.H. (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **26**: 447-477.
- Baracchini, E., y Bremer, H. (1988) Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp. *J Biol Chem* **263**: 2597-2602.

## Bibliografía

---

- Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., Y Michel, B. (2002) Replication fork collapse at replication terminator sequences. *Embo J* **21**: 3898-3907.
- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M., y Sherratt, D. (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* **3**: 789-798.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T., y Sherratt, D.J. (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell* **75**: 351-361.
- Blinkova, A., Hervas, C., Stukenberg, P.T., Onrust, R., O'Donnell, M.E., y Walker, J.R. (1993) The *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme contains both products of the *dnaX* gene, tau and gamma, but only tau is essential. *J Bacteriol* **175**: 6018-6027.
- Boeneman, K., y Crooke, E. (2005) Chromosomal replication and the cell membrane. *Curr Opin Microbiol* **8**: 143-148.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Yanku, M., Schreiber, R., Gust, B., Chater, K., Aharonowitz, Y., y Cohen, G. (2004) Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**: 1022-1035.
- Boye, E., Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (1988) Timing of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **951**: 359-364.
- Boye, E., Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (2000) Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* **1**: 479-483.
- Boye, E., Steen, H.B., y Skarstad, K. (1983) Flow cytometry of bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. *J Gen Microbiol* **129**: 973-980.
- Boye, E., Stokke, T., Kleckner, N., y Skarstad, K. (1996) Coordinating DNA replication initiation with cell growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12206-12211.



- Bramhill, D., y Kornberg, A. (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**: 915-918.
- Breier, A.M., Weier, H.U., y Cozzarelli, N.R. (2005) Independence of replisomes in *Escherichia coli* chromosomal replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3942-3947.
- Bremer, H.y.P.P.D. (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by grow rate. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. 2 edit. F. C. Neidhardt *et al.* (eds.), ASM, Washington, D. C., pp. 1553-1569.
- Brown, N.C., y Reichard, P. (1969) Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* **46**: 39-55.
- Bujard, H., Baldari, C., Brunner, M., Deuschle, U., Gentz, R., Hughes, J., Kammerer, W., y Stuber, D. (1983) Integration of efficient promoters of the *E. coli* system into plasmid vectors. *Gene Amplif Anal* **3**: 65-87.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**: 195-203.
- Bussiere, D.E., y Bastia, D. (1999) Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes. *Mol Microbiol* **31**: 1611-1618.
- Campbell, J.L., y Kleckner, N. (1990) *E. coli* *oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* **62**: 967-979.
- Carl, P.L. (1970) *Escherichia coli* mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. *Mol Gen Genet* **109**: 107-122.
- Carr, K.M., y Kaguni, J.M. (1996) The A184V missense mutation of the *dnaA5* and *dnaA46* alleles confers a defect in ATP binding and thermolability in initiation of *Escherichia coli* DNA replication. *Mol Microbiol* **20**: 1307-1318.

## Bibliografía

---

- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez y D. Vinella. (1996) *The stringent response. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Washington, D. C.
- Castuma, C.E., Crooke, E., y Kornberg, A. (1993) Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator protein of replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 24665-24668.
- Chang, M.C., Yee, C.S., Stubbe, J., y Nocera, D.G. (2004) Turning on ribonucleotide reductase by light-initiated amino acid radical generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6882-6887.
- Chase, J.W., y Williams, K.R. (1986) Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu Rev Biochem* **55**: 103-136.
- Churchward, G., Estiva, E., y Bremer, H. (1981) Growth rate-dependent control of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **145**: 1232-1238.
- Churchward, G., Holmans, P., y Bremer, H. (1983) Increased expression of the *dnaA* gene has no effect on DNA replication in a *dnaA*<sup>+</sup> strain of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **192**: 506-508.
- Colloms, S.D., Sykora, P., Szatmari, G., y Sherratt, D.J. (1990) Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* **172**: 6973-6980.
- Cooper, P.K., y Hanawalt, P.C. (1972) Heterogeneity of patch size in repair replicated DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **67**: 1-10.
- Cooper, P.K. (1982) Characterization of long patch excision repair of DNA in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*: an inducible function under *rec-lex* control. *Mol Gen Genet* **185**: 189-197.
- Cooper, S., y Helmstetter, C.E. (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* **31**: 519-540.

- Cornet, F., Louarn, J., Patte, J., y Louarn, J.M. (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* **10**: 1152-1161.
- Courcelle, J., Carswell-Crumpton, C., y Hanawalt, P.C. (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**: 3714-3719.
- Courcelle, J., Crowley, D.J., y Hanawalt, P.C. (1999) Recovery of DNA replication in UV-irradiated *Escherichia coli* requires both excision repair and *recF* protein function. *J Bacteriol* **181**: 916-922.
- Courcelle, J., Ganesan, A.K., y Hanawalt, P.C. (2001) Therefore, what are recombination proteins there for? *Bioessays* **23**: 463-470.
- Courcelle, J., y Hanawalt, P.C. (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet* **37**: 611-646.
- Courcelle, J., Belle, J.J., y Courcelle, C.T. (2004) When replication travels on damaged templates: bumps and blocks in the road. *Res Microbiol* **155**: 231-237.
- Cox, M.M. (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8173-8180.
- Davis, R.E., y Mathews, C.K. (1993) Acidic C terminus of vaccinia virus DNA-binding protein interacts with ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 745-749.
- Dingman, C.W. (1974) Bidirectional chromosome replication: some topological considerations. *J Theor Biol* **43**: 187-195.
- Dixon, N.E., y Kornberg, A. (1984) Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 424-428.
- Donachie, W.D. (1992) What is the minimum number of dedicated functions required for a basic cell cycle? *Curr Opin Genet Dev* **2**: 792-798.

## Bibliografía

---

- Donachie, W.D. (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **47**: 199-230.
- Dower, W.J., Miller, J.F., y Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Ekberg, M., Birgander, P., y Sjoberg, B.M. (2003) *In vivo* assay for low-activity mutant forms of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* **185**: 1167-1173.
- Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D.T., y Nordlund, P. (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* **77**: 177-268.
- Ezekiel, D.H., y Hutchins, J.E. (1968) Mutations affecting RNA polymerase associated with rifampicin resistance in *Escherichia coli*. *Nature* **220**: 276-277.
- Fang, L., Davey, M.J., y O'Donnell, M. (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.
- Felczak, M.M., y Kaguni, J.M. (2004) The box VII motif of *Escherichia coli* DnaA protein is required for DnaA oligomerization at the *E. coli* replication origin. *J Biol Chem* **279**: 51156-51162.
- Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D.B., Stasiak, A., y Schwartzman, J.B. (2007) Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:1500-5.
- Filpula, D., y Fuchs, J.A. (1978) Regulation of the synthesis of ribonucleoside diphosphate reductase in *Escherichia coli*: specific activity of the enzyme in relationship to perturbations of DNA replication. *J Bacteriol* **135**: 429-435.
- Firshein, W. (1989) Role of the DNA/membrane complex in prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Microbiol* **43**: 89-120.

- Flores, M.J., Bierne, H., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2001) Impairment of lagging strand synthesis triggers the formation of a RuvABC substrate at replication forks. *Embo J* **20**: 619-629.
- Flores, M.J., Sánchez, N., y Michel, B. (2005) A fork-clearing role for UvrD. *Mol Microbiol* **57**: 1664-1675.
- Flower, A.M., y McHenry, C.S. (1986) The adjacent *dnaZ* and *dnaX* genes of *Escherichia coli* are contained within one continuous open reading frame. *Nucleic Acids Res* **14**: 8091-8101.
- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H., y Reichard, P. (1992) The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **65**: 147-183.
- Freifelder, D., y Levine, E. (1972) Stimulation of nuclease activity by thymine starvation. *Biochem Biophys Res Commun* **46**: 1782-1787.
- Fuchs, J.A., Karlstrom, H.O., Warner, H.R., y Reichard, P. (1972) Defective gene product in *dnaF* mutant of *Escherichia coli*. *Nat New Biol* **238**: 69-71.
- Funnell, B.E., Baker, T.A., y Kornberg, A. (1987) In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* **262**: 10327-10334.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001a) tau binds and organizes *Escherichia coli* replication proteins through distinct domains. Domain IV, located within the unique C terminus of tau, binds the replication fork, helicase, DnaB. *J Biol Chem* **276**: 4441-4446.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001b) tau binds and organizes *Escherichia coli* replication through distinct domains. Partial proteolysis of terminally tagged tau to determine candidate domains and to assign domain V as the alpha binding domain. *J Biol Chem* **276**: 4433-4440.
- Garriga, X., Eliasson, R., Torrents, E., Jordan, A., Barbe, J., Gibert, I., y Reichard, P. (1996) *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 189-192.

## Bibliografía

---

- Giraldo, R., Fernandez-Tornero, C., Evans, P.R., Diaz-Orejas, R., y Romero, A. (2003) A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol* **10**: 565-571.
- Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) The DnaX-binding subunits delta' and psi are bound to gamma and not tau in the DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **275**: 3017-3020.
- Gon, S., Camara, J.E., Klungsoyr, H.K., Crooke, E., Skarstad, K., y Beckwith, J. (2006) A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* **25**: 1137-1147.
- Graham, M.Y., Tal, M., y Schlessinger, D. (1982) lac Transcription in *Escherichia coli* cells treated with chloramphenicol. *J Bacteriol* **151**: 251-261.
- Grigorian, A.V., Lustig, R.B., Guzmán, E.C., Mahaffy, J.M., y Zyskind, J.W. (2003) *Escherichia coli* cells with increased levels of DnaA and deficient in recombinational repair have decreased viability. *J Bacteriol* **185**: 630-644.
- Grinberg, I., Shteinberg, T., Gorovitz, B., Aharonowitz, Y., Cohen, G., y Borovok, I. (2006) The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *J Bacteriol* **188**: 7635-7644.
- Grompone, G., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2003) Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* **48**: 845-854.
- Grompone, G., Seigneur, M., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2002) Replication fork reversal in DNA polymerase III mutants of *Escherichia coli*: a role for the beta clamp. *Mol Microbiol* **44**: 1331-1339.
- Guarino, E. (2006) Implicaciones de la NDP reductasa en la progresión de las horquillas de replicación en *Escherichia coli*. Tesis doctoral.
- Guarino, E., Jiménez-Sánchez, A., y Guzmán, E.C. (2007a) Defective ribonucleoside diphosphate reductase impairs replication fork progression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 3496-3501.

- Guarino, E., Salguero, I., Jiménez-Sánchez, A., y Guzmán, E.C. (2007b) Double-strand break generation under deoxyribonucleotide starvation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5782-5786.
- Guijo, M.I., Patte, J., del Mar Campos, M., Louarn, J.M., y Rebollo, J.E. (2001) Localized remodeling of the *Escherichia coli* chromosome: the patchwork of segments refractory and tolerant to inversion near the replication terminus. *Genetics* **157**: 1413-1423.
- Guzmán, E.C., Caballero, J.L., y Jiménez-Sánchez, A. (2002) Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 487-495.
- Guzmán, E.C., Guarino, E., Riola, J., Caballero, J.L., y Jiménez-Sánchez, A. (2003) Ribonucleoside diphosphate reductase is a functional and structural component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Recent Res. Devel. Mol. Biol.* **1**: 29-43.
- Haber, J.E. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* **24**: 271-275.
- Han, J.S., Kwon, H.S., Yim, J.B., y Hwang, D.S. (1998) Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*. *Mol Gen Genet* **259**: 610-614.
- Hanawalt, P.C., Maaloe, O., Cummings, D.J., and Schaechter, M. (1961) The normal DNA replication cycle. II. *J Mol Biol* **3**: 156-165.
- Hanke, P.D., y Fuchs, J.A. (1983) Regulation of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **154**: 1040-1045.
- Hanke, P.D., y Fuchs, J.A. (1984) Requirement of protein synthesis for the induction of ribonucleoside diphosphate reductase mRNA in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**: 327-331.
- Hansen, F.G., Koefoed, S., y Atlung, T. (1992) Cloning and nucleotide sequence determination of twelve mutant *dnaA* genes of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **234**: 14-21.

## Bibliografía

---

- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., y Murray, A.W. (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**: C47-52.
- Heil, A., y Zillig, W. (1970) Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Lett* **11**: 165-168.
- Heller, R.C., y Marians, K.J. (2005) The disposition of nascent strands at stalled replication forks dictates the pathway of replisome loading during restart. *Mol Cell* **17**: 733-743.
- Helmstetter, C.E. (1996) Timing of Synthetic Activities in the Cell Cycle. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2 edit. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C.: 1627-1639.
- Herrick, J., y Sclavi, B. (2007) Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**: 22-34.
- Hiasa, H., y Marians, K.J. (1994) Fis cannot support *oriC* DNA replication *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 24999-25003.
- Higgins, N.P., Kato, K., y Strauss, B. (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* **101**: 417-425.
- Hill, T.M. (1996) Features of the chromosomal terminus region. In Neidhardt, F. C. et al. (eds), *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, DC.: 1602-1614.
- Hingorani, M.M., y O'Donnell, M. (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**: 24550-24563.
- Hinkle, D.C., Mangel, W.F., y Chamberlin, M.J. (1972) Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. IV. The effect of rifampicin on binding and on RNA chain initiation. *J Mol Biol* **70**: 209-220.
- Hishida, T., Han, Y.W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H., y Shinagawa, H. (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS



- signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev* **18**: 1886-1897.
- Holland, I.B. (1987) Genetic analysis of the *E. coli* division clock. *Cell* **48**: 361-362.
  - Holmgren, A., y Bjornstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* **252**: 199-208.
  - Horii, Z.I., y Suzuki, K. (1970) Degradation of the DNA of *recA* mutants of *Escherichia coli* K-12 after irradiation with ultraviolet light. II. Further studies including a *recA uvrA* double mutant. *Photochem Photobiol* **11**: 99-107.
  - Horiuchi, T., y Fujimura, Y. (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**: 783-791.
  - Horiuchi, T., Fujimura, Y., Nishitani, H., Kobayashi, T., y Hidaka, M. (1994) The DNA replication fork blocked at the *Ter* site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J Bacteriol* **176**: 4656-4663.
  - Howard-Flanders, P., Theriot, L., y Stedeford, J.B. (1969) Some properties of excision-defective recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **97**: 1134-1141.
  - Hupp, T.R., y Kaguni, J.M. (1993) DnaA5 protein is thermolabile in initiation of replication from the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 13128-13136.
  - Hwang, D.S., y Kaguni, J.M. (1988) Interaction of *dnaA46* protein with a stimulatory protein in replication from the *Escherichia coli* chromosomal origin. *J Biol Chem* **263**: 10633-10640.
  - Hwang, D.S., y Kornberg, A. (1990) A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E. coli* minichromosome. *Cell* **63**: 325-331.
  - Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1998a) A 45 bp inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli nrd* operon. *Mol Microbiol* **28**: 1307-1314.

## Bibliografía

---

- Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1998b) Multiple cis-acting sites positively regulate *Escherichia coli nrd* expression. *Mol Microbiol* **28**: 1315-1322.
- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2001) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* **106**: 429-441.
- Ji, J.P., y Mathews, C.K. (1991) Analysis of mutagenesis induced by a thermolabile T4 phage deoxycytidylate hydroxymethylase suggests localized deoxyribonucleotide pool imbalance. *Mol Gen Genet* **226**: 257-264.
- Jiménez-Sánchez, A., y Guzmán, E.C. (1988) Direct procedure for the determination of the number of replication forks and the reinitiation fraction in bacteria. *Comput Appl Biosci* **4**: 431-433.
- Jiménez-Sánchez, A., y Jiménez-Martínez, J. (1998) Genética Microbiana. Serie Genética, editorial Síntesis. Madrid.
- Johnson, A., y O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* **74**: 283-315.
- Jones, J.M., y Nakai, H. (2000) PriA and phage T4 gp59: factors that promote DNA replication on forked DNA substrates microreview. *Mol Microbiol* **36**: 519-527.
- Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbe, J., y Reichard, P. (1994) A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12892-12896.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I., y Barbe, J. (1996) Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* **19**: 777-790.
- Kaguni, J.M. (1997) *Escherichia coli* DnaA protein: the replication initiator. *Mol Cells* **7**: 145-157.

- Kaguni, J.M. (2006) DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu Rev Microbiol* **60**: 351-375.
- Katayama, T., y Kornberg, A. (1994) Hyperactive initiation of chromosomal replication in vivo and *in vitro* by a mutant initiator protein, DnaAcos, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 12698-12703.
- Katayama, T., y Crooke, E. (1995) DnaA protein is sensitive to a soluble factor and is specifically inactivated for initiation of *in vitro* replication of the *Escherichia coli* minichromosome. *J Biol Chem* **270**: 9265-9271.
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., y Sekimizu, K. (1998) The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* **94**: 61-71.
- Katayama, T., y Sekimizu, K. (1999) Inactivation of *Escherichia coli* DnaA protein by DNA polymerase III and negative regulations for initiation of chromosomal replication. *Biochimie* **81**: 835-840.
- Kato, J., y Katayama, T. (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *Embo J* **20**: 4253-4262.
- Kato, J. (2005) Regulatory network of the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 331-342.
- Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* **64**: 171-200.
- Khidhir, M.A., Casaregola, S., y Holland, I.B. (1985) Mechanism of transient inhibition of DNA synthesis in ultraviolet-irradiated *E. coli*: inhibition is independent of *recA* whilst recovery requires RecA protein itself and an additional, inducible SOS function. *Mol Gen Genet* **199**: 133-140.
- Kim, M.S., Bae, S.H., Yun, S.H., Lee, H.J., Ji, S.C., Lee, J.H., Srivastava, P., Lee, S.H., Chae, H., Lee, Y., Choi, B.S., Chattoraj, D.K., y Lim, H.M. (2005a) Cnu, a novel *oriC*-binding protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6998-7008.

## Bibliografía

---

- Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., y Marians, K.J. (1996) Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* **84**: 643-650.
- Kim, J., Wheeler, L.J., Shen, R., y Mathews, C.K. (2005) Protein-DNA interactions in the T4 dNTP synthetase complex dependent on gene 32 single-stranded DNA-binding protein. *Mol Microbiol* **55**: 1502-1514.
- Klauck, E., Typas, A., y Hengge, R. (2007) The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **90**: 103-127.
- 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.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Krause, M., Ruckert, B., Lurz, R., y Messer, W. (1997) Complexes at the replication origin of *Bacillus subtilis* with homologous and heterologous DnaA protein. *J Mol Biol* **274**: 365-380.
- Krause, M., y Messer, W. (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, K.N. (2005) Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **59**: 43-67.
- Kurokawa, K., Nishida, S., Emoto, A., Sekimizu, K., y Katayama, T. (1999) Replication cycle-coordinated change of the adenine nucleotide-bound forms of DnaA protein in *Escherichia coli*. *Embo J* **18**: 6642-6652.

- Kuzminov, A. (1995) Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**: 373-384.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 751-813, table of contents.
- LaDuca, R.J., Crute, J.J., McHenry, C.S., y Bambara, R.A. (1986) The beta subunit of the *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme interacts functionally with the catalytic core in the absence of other subunits. *J Biol Chem* **261**: 7550-7557.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagosky, P.A., y Chang, F.N. (1980) Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate basal-level synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**: 499-508.
- Lagosky, P.A., y Chang, F.N. (1981) Correlation between RNA synthesis and basal level guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in relaxed mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**: 11651-11656.
- Langer, U., Richter, S., Roth, A., Weigel, C., y Messer, W. (1996) A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 301-311.
- Learn, B.A., Um, S.J., Huang, L., y McMacken, R. (1997) Cryptic single-stranded-DNA binding activities of the phage lambda P and *Escherichia coli* DnaC replication initiation proteins facilitate the transfer of *E. coli* DnaB helicase onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1154-1159.
- Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* **186**: 790-797.
- Lehman, I.R., y Uyemura, D.G. (1976) DNA polymerase I: essential replication enzyme. *Science* **193**: 963-969.

## Bibliografía

---

- Lemon, K.P., y Grossman, A.D. (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**: 1516-1519.
- Leonard, A.C., y Grimwade, J.E. (2005) Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol* **55**: 978-985.
- Leu, F.P., Georgescu, R., y O'Donnell, M. (2003) Mechanism of the *E. coli* tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol Cell* **11**: 315-327.
- Li, Z., Kitchen, J.L., Boeneman, K., Anand, P., y Crooke, E. (2005) Restoration of growth to acidic phospholipid-deficient cells by DnaA(L366K) is independent of its capacity for nucleotide binding and exchange and requires DnaA. *J Biol Chem* **280**: 9796-9801.
- Li, X., y Marians, K.J. (2000) Two distinct triggers for cycling of the lagging strand polymerase at the replication fork. *J Biol Chem* **275**: 34757-34765.
- Lloyd, R.G., y Sharples, G.J. (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *Embo J* **12**: 17-22.
- Lobner-Olesen, A., Skarstad, K., Hansen, F.G., von Meyenburg, K., y Boye, E. (1989) The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell* **57**: 881-889.
- Lother, H., Lurz, R., y Orr, E. (1984) DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res* **12**: 901-914.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., y Kleckner, N. (1994) SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* **77**: 413-426.
- Ludlam, A.V., McNatt, M.W., Carr, K.M., y Kaguni, J.M. (2001) Essential amino acids of *Escherichia coli* DnaC protein in an N-terminal domain interact with DnaB helicase. *J Biol Chem* **276**: 27345-27353.
- Maaloe, O., y Hanawalt, P.C. (1961) Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. I. *J Mol Biol* **3**: 144-155.

- Maisnier-Patin, S., Nordstrom, K., y Dasgupta, S. (2001) Replication arrests during a single round of replication of the *Escherichia coli* chromosome in the absence of DnaC activity. *Mol Microbiol* **42**: 1371-1382.
- Maki, H., y Kornberg, A. (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.
- Manwaring, J.D., y Fuchs, J.A. (1979) Relationship between deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in an *nrda* mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **138**: 245-248.
- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* **61**: 673-719.
- Marinus, M.G., Hansen, F.G.2, y Løbner-Olesen, A. (2006) Cell cycle and cytoskeletal elements in bacteria. In *DnaC inactivation induces the SOS response in E. coli* Copenhagen, Denmark.
- Marszalek, J., y Kaguni, J.M. (1994) DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 4883-4890.
- Mathews, C.K. (1976) Biochemistry of DNA-defective mutants of bacteriophage T4. Thymine nucleotide pool dynamics. *Arch Biochem Biophys* **172**: 178-187.
- Mathews, C.K. (2006) DNA precursor metabolism and genomic stability. *Faseb J* **20**: 1300-1314.
- Mathews, C.K., Moen, L.K., Wang, Y., y Sargent, R.G. (1988) Intracellular organization of DNA precursor biosynthetic enzymes. *Trends Biochem Sci* **13**: 394-397.
- Mathews, C.K., y Sinha, N.K. (1982) Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 302-306.
- McClure, W.R., y Cech, C.L. (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* **253**: 8949-8956.

## Bibliografía

---

- McGarry, K.C., Ryan, V.T., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (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 U S A* **101**: 2811-2816.
- McGlynn, P., y Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 859-870.
- McGlynn, P. (2004) Links between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 107-112.
- McHenry, C.S., y Crow, W. (1979) DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits. *J Biol Chem* **254**: 1748-1753.
- Messer, W. (2002) The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 355-374.
- Michel, B., Ehrlich, S.D., y Uzest, M. (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *Embo J* **16**: 430-438.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., y Lestini, R. (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 967-980.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M.J., y Bidnenko, V. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12783-12788.
- Michel, B., Recchia, G.D., Penel-Colin, M., Ehrlich, S.D., y Sherratt, D.J. (2000) Resolution of holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in *rep* mutants and UV-irradiated cells. *Mol Microbiol* **37**: 180-191.
- Migocki, M.D., Lewis, P.J., Wake, R.G., y Harry, E.J. (2004) The midcell replication factory in *Bacillus subtilis* is highly mobile: implications for coordinating chromosome replication with other cell cycle events. *Mol Microbiol* **54**: 452-463.
- Miller, J.F. (1992) A short course in bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Lab. Press*.



- Mizushima, T., Katayama, T., y Sekimizu, K. (1996) Effect on DNA topology by DnaA protein, the initiation factor of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**: 11512-11516.
- Mizushima, T., Nishida, S., Kurokawa, K., Katayama, T., Miki, T., y Sekimizu, K. (1997) Negative control of DNA replication by hydrolysis of ATP bound to DnaA protein, the initiator of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* **16**: 3724-3730.
- Molina, F., Jimenéz-Sánchez, A., y Guzmán, E.C. (1998) Determining the optimal thymidine concentration for growing *thy* *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **180**: 2992-2994.
- Molina, F., y Skarstad, K. (2004) Replication fork and SeqA focus distributions in *Escherichia coli* suggest a replication hyperstructure dependent on nucleotide metabolism. *Mol Microbiol* **52**: 1597-1612.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Alamo, M.J., Holmgren, A., y Pueyo, C. (2001) Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level *in vivo*. *J Biol Chem* **276**: 18031-18037.
- Morganroth, P.A., y Hanawalt, P.C. (2006) Role of DNA replication and repair in thymineless death in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5286-5288.
- Morigen, Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (2003) Titration of the *Escherichia coli* DnaA protein to excess *datA* sites causes destabilization of replication forks, delayed replication initiation and delayed cell division. *Mol Microbiol* **50**: 349-362.
- Morigen, Molina, F., y Skarstad, K. (2005) Deletion of the *datA* site does not affect once-per-cell-cycle timing but induces rifampin-resistant replication. *J Bacteriol* **187**: 3913-3920.
- Mulugu, S., Potnis, A., Shamsuzzaman, Taylor, J., Alexander, K., y Bastia, D. (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9569-9574.

## Bibliografía

---

- Nakayama, H., y Hanawalt, P. (1975) Sedimentation analysis of deoxyribonucleic acid from thymine-starved *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **121**: 537-547.
- Nakayama, K., Kusano, K., Irino, N., y Nakayama, H. (1994) Thymine starvation-induced structural changes in *Escherichia coli* DNA. Detection by pulsed field gel electrophoresis and evidence for involvement of homologous recombination. *J Mol Biol* **243**: 611-620.
- Nievera, C., Torgue, J.J., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (2006) SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the *E. coli* pre-RC. *Mol Cell* **24**: 581-592.
- Nollmann, M., Crisona, N.J., y Arimondo, P.B. (2007) Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* **89**: 490-499.
- Nordlund, P., y Eklund, H. (1993) Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* **232**: 123-164.
- Nordlund, P., y Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**: 681-706.
- Norris, V., S. Alexandre, Y. Bouligand, D. Cellier, M. Demarty, G. Grehan, G. Gouesbet, J. Guespin, E. Insinna, L. Le Sceller, B. Maheu, C. Monnier, N. Grant, T. Onoda, N. Orange, A. Oshima, L. Picton, H. Polaert, C. Ripoll, M. Thellier, J.-M. Valleton, M.-C. Verdus, J.-C. Vincent, G. White, y P. Wiggins (1999) Hypothesis: hyperstructures regulate bacterial structure and the cell cycle. *Biochimie* **81**:915-920.
- Norris, V., den Blaauwen, T., Cabin-Flaman, A., Doi, R.H., Harshey, R., Janniere, L., Jiménez-Sánchez, A., Jin, D.J., Levin, P.A., Mileykovskaya, E., Minsky, A., Saier, M., Jr., y Skarstad, K. (2007a) Functional taxonomy of bacterial hyperstructures. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 230-253.
- Norris, V., den Blaauwen, T., Doi, R.H., Harshey, R., Janniere, L., Jiménez-Sánchez, A., Jin, D.J., Levin, P.A., Mileykovskaya, E., Minsky, A., Misevic, G., Ripoll, C., Saier, M., Jr., Skarstad, K. y Thellier, M. (2007b) Toward a Hyperstructure Taxonomy. *Annu Rev Microbiol.* 61: 309-329.

- Norris, V., Fralick, J., y Danchin, A. (2000) A SeqA hyperstructure and its interactions direct the replication and sequestration of DNA. *Mol Microbiol* **37**: 696-702.
- O'Donnell, M.E. (1987) Accessory proteins bind a primed template and mediate rapid cycling of DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**: 16558-16565.
- Ogawa, T., Pickett, G.G., Kogoma, T., y Kornberg, A. (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 U S A* **81**: 1040-1044.
- Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M., y Reichard, P. (1996) The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J Biol Chem* **271**: 9410-9416.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Turner, J., Naktinis, V., y O'Donnell, M. (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. III. Interface between two polymerases and the clamp loader. *J Biol Chem* **270**: 13366-13377.
- Ortenberg, R., Gon, S., Porat, A., y Beckwith, J. (2004) Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7439-7444.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R., y Blakley, R.L. (1972) A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemistry* **11**: 2378-2388.
- Paulsson, J., y Chattoraj, D.K. (2006) Origin inactivation in bacterial DNA replication control. *Mol Microbiol* **61**: 9-15.
- Perals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., y Louarn, J.M. (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* **36**: 33-43.

## Bibliografía

---

- Polaczek, P., Kwan, K., y Campbell, J.L. (1998a) 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.
- Polaczek, P., Kwan, K., y Campbell, J.L. (1998b) 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.
- Pritchard, A.E., Dallmann, H.G., Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of  $\Delta\delta'$  with DnaX(4) forms DnaX(3) $\Delta\delta'$ . *Embo J* **19**: 6536-6545.
- Pritchard, R.H., y Zaritsky, A. (1970) Effect of thymine concentration on the replication velocity of DNA in a thymineless mutant of *Escherichia coli*. *Nature* **226**: 126-131.
- Recchia, G.D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G., y Sherratt, D.J. (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *Embo J* **18**: 5724-5734.
- Reems, J.A., Wood, S., y McHenry, C.S. (1995) *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme subunits alpha, beta, and gamma directly contact the primer-template. *J Biol Chem* **270**: 5606-5613.
- Reichard, P., y Ehrenberg, A. (1983) Ribonucleotide reductase--a radical enzyme. *Science* **221**: 514-519.
- Reichard, P. (1993a) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773-1777.
- Reichard, P. (1993b) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 8383-8386.
- Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem Sci* **22**: 81-85.

- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K., y Nash, H.A. (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**: 1295-1306.
- Riola, J., Guarino, E., Guzmán, E.C., y Jiménez-Sánchez, A. (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**: 70-81.
- Rodionov, D.A., y Gelfand, M.S. (2005) Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* **21**: 385-389.
- Rosenkranz, H.S., y Levy, J.A. (1965) Hydroxyurea: a Specific Inhibitor of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *Biochim Biophys Acta* **95**: 181-183.
- Rudd, K.E. (1998) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the physical map. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 985-1019.
- Rudolph, C.J., Upton, A.L., y Lloyd, R.G. (2007) Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**: 668-681.
- Sahapiro, H.M. (1995) Practical Flow Cytometry. *Wiley-Liss*.
- Sandler, S.J., Samra, H.S., y Clark, A.J. (1996) Differential suppression of *priA2::kan* phenotypes in *Escherichia coli* K-12 by mutations in *priA*, *lexA*, and *dnaC*. *Genetics* **143**: 5-13.
- Sandler, S.J., y Marians, K.J. (2000) Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 9-13.
- Sat, B., Reches, M., y Engelberg-Kulka, H. (2003) The *Escherichia coli* *mazEF* suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* **185**: 1803-1807.
- Schaper, S., y Messer, W. (1995) Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J Biol Chem* **270**: 17622-17626.
- Schlesinger, D.H., Niall, H.D., y Wilson, D. (1974) Localization of translation initiation in the message for *E. coli* UDP-galactose 4-epimerase: the amino terminal sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **61**: 282-289.

## Bibliografía

---

- Schubach, W.H., Whitmer, J.D., y Davern, C.I. (1973) Genetic control of DNA initiation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **74**: 205-221.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* **95**: 419-430.
- Seitz, H., Weigel, C., y Messer, W. (2000) The interaction domains of the DnaA and DnaB replication proteins of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37**: 1270-1279.
- Sekimizu, K., Bramhill, D., y Kornberg, A. (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.
- Setlow, R.B., y Carrier, W.L. (1964) The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: an Error-Correcting Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 226-231.
- Shibata, T., Hishida, T., Kubota, Y., Han, Y.W., Iwasaki, H., y 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.
- Shimuta, T.R., Nakano, K., Yamaguchi, Y., Ozaki, S., Fujimitsu, K., Matsunaga, C., Noguchi, K., Emoto, A., y Katayama, T. (2004) Novel heat shock protein HspQ stimulates the degradation of mutant DnaA protein in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **9**: 1151-1166.
- Simmons, L.A., Breier, A.M., Cozzarelli, N.R., y Kaguni, J.M. (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol* **51**: 349-358.
- Skarstad, K., y Boye, E. (1988) Perturbed chromosomal replication in *recA* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 2549-2554.
- Skarstad, K., y Boye, E. (1993) Degradation of individual chromosomes in *recA* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5505-5509.
- Skarstad, K., y Boye, E. (1994) The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim Biophys Acta* **1217**: 111-130.

- Skarstad, K., von Meyenburg, K., Hansen, F.G., y Boye, E. (1988) Coordination of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*: effects of different dnaA alleles. *J Bacteriol* **170**: 852-858.
- Slater, S.C., Lifšics, M.R., O'Donnell, M., y Maurer, R. (1994) holE, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a holE mutant and comparison with a dnaQ (epsilon-subunit) mutant. *J Bacteriol* **176**: 815-821.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Speck, C., y Messer, W. (2001) Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA. *Embo J* **20**: 1469-1476.
- Spies M, B.P., Dillingham MS, Handa N, Baskin RJ, and Kowalczykowski S.C. (2003) A molecular throttle: the recombination hotspot *chi* controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell*. **114(5)**: 647-654.
- Stayton, M.M., y Kornberg, A. (1983) Complexes of *Escherichia coli* primase with the replication origin of G4 phage DNA. *J Biol Chem* **258**: 13205-13212.
- Steen, H.B. (1980) Further developments of a microscope-based flow cytometer: light scatter detection and excitation intensity compensation. *Cytometry* **1**: 26-31.
- Steen, H.B., y Boye, E. (1981) *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *J Bacteriol* **145**: 1091-1094.
- Steiner, W.W., y Kuempel, P.L. (1998) Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J Bacteriol* **180**: 6269-6275.
- Stubbe, J. (2000) Ribonucleotide reductases: the link between an RNA and a DNA world? *Curr Opin Struct Biol* **10**: 731-736.
- Studwell, P.S., y O'Donnell, M. (1990) Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **265**: 1171-1178.

## Bibliografía

---

- Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1993) DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*. *J Biol Chem* **268**: 11785-11791.
- Stukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1991) Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **266**: 11328-11334.
- Stukenberg, P.T., Turner, J., y O'Donnell, M. (1994) An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* **78**: 877-887.
- Sueoka, N., y Yoshikawa, H. (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 Katayama, T. (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.
- Sun, L., y Fuchs, J.A. (1992) *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell* **3**: 1095-1105.
- Sun, W., y Godson, G.N. (1996) Interaction of *Escherichia coli* primase with a phage *G4ori(c)*-*E. coli* SSB complex. *J Bacteriol* **178**: 6701-6705.
- Sun, W., y Godson, G.N. (1998) Structure of the *Escherichia coli* primase/single-strand DNA-binding protein/phage *G4oric* complex required for primer RNA synthesis. *J Mol Biol* **276**: 689-703.
- Sun, L., Jacobson, B.A., Dien, B.S., Srienc, F., y Fuchs, J.A. (1994) Cell cycle regulation of the *Escherichia coli* *nrd* operon: requirement for a cis-acting upstream AT-rich sequence. *J Bacteriol* **176**: 2415-2426.
- Tabor, S., y Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 1074-1078.
- Taylor AF, S.G. (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. *Nature* **423**: 889-893



- Thelander, L., y Reichard, P. (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* **48**: 133-158.
- Torrents, E., Buist, G., Liu, A., Eliasson, R., Kok, J., Gibert, I., Graslund, A., y Reichard, P. (2000) The anaerobic (class III) ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Catalytic properties and allosteric regulation of the pure enzyme system. *J Biol Chem* **275**: 2463-2471.
- Torrents, E., Grinberg, I., Gorovitz-Harris, B., Lundstrom, H., Borovok, I., Aharonowitz, Y., Sjoberg, B.M., y Cohen, G. (2007) NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**: 5012-5021.
- Tougu, K., Peng, H., y Marians, K.J. (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**: 4675-4682.
- Tougu, K., y Marians, K.J. (1996a) The extreme C terminus of primase is required for interaction with DnaB at the replication fork. *J Biol Chem* **271**: 21391-21397.
- Tougu, K., y Marians, K.J. (1996b) The interaction between helicase and primase sets the replication fork clock. *J Biol Chem* **271**: 21398-21405.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Travers, A. (1976a) RNA polymerase specificity and the control of growth. *Nature* **263**: 641-646.
- Travers, A. (1976b) Modulation of RNA polymerase specificity by ppGpp. *Mol Gen Genet* **147**: 225-232.
- Tsai, P.K., y Hogenkamp, H.P. (1980) The purification and characterization of an adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside diphosphate reductase from *Corynebacterium nephridii*. *J Biol Chem* **255**: 1273-1278.

## Bibliografía

---

- Tsuchihashi, Z., y Kornberg, A. (1990) Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2516-2520.
- Turner, J., Hingorani, M.M., Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1999) The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *Embo J* **18**: 771-783.
- Von Freiesleben, U., Rasmussen, K.V., Atlung, T., y Hansen, F.G. (2000) Rifampicin-resistant initiation of chromosome replication from *oriC* in *ihf* mutants. *Mol Microbiol* **37**: 1087-1093.
- Wahle, E., Lasken, R.S., y Kornberg, A. (1989) The *dnaB-dnaC* replication protein complex of *Escherichia coli*. I. Formation and properties. *J Biol Chem* **264**: 2463-2468.
- Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A., y Losick, R. (1998) Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**: 883-892.
- Wechsler, J.A., y Gross, J.D. (1971) *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Mol Gen Genet* **113**: 273-284.
- Wehrli, W., Nuesch, J., Knusel, F., y Staehelin, M. (1968) Action of rifamycins on RNA polymerase. *Biochim Biophys Acta* **157**: 215-217.
- Weigel, C., Schmidt, A., Seitz, H., Tungler, D., Welzeck, M., y Messer, W. (1999) The N-terminus promotes oligomerization of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA. *Mol Microbiol* **34**: 53-66.
- Weigel, C., y Seitz, H. (2002) Strand-specific loading of DnaB helicase by DnaA to a substrate mimicking unwound *oriC*. *Mol Microbiol* **46**: 1149-1156.
- West, S.C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. *Annu Rev Genet* **31**: 213-244.
- Wheeler, L.J., Rajagopal, I., y Mathews, C.K. (2005) Stimulation of mutagenesis by proportional deoxyribonucleoside triphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* **4**: 1450-1456.

- Wheeler, L.J., Ray, N.B., Ungermann, C., Hendricks, S.P., Bernard, M.A., Hanson, E.S., y Mathews, C.K. (1996) T4 phage gene 32 protein as a candidate organizing factor for the deoxyribonucleoside triphosphate synthetase complex. *J Biol Chem* **271**: 11156-11162.
- Wheeler, L., Wang, Y., y Mathews, C.K. (1992) Specific associations of T4 bacteriophage proteins with immobilized deoxycytidylate hydroxymethylase. *J Biol Chem* **267**: 7664-7670.
- Withers, H.L., y Bernander, R. (1998) Characterization of *dnaC2* and *dnaC28* mutants by flow cytometry. *J Bacteriol* **180**: 1624-1631.
- Wold, S., Crooke, E., y Skarstad, K. (1996) The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from *oriC* *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **24**: 3527-3532.
- Wu, C.A., Zechner, E.L., Reems, J.A., McHenry, C.S., y Marians, K.J. (1992) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. V. Primase action regulates the cycle of Okazaki fragment synthesis. *J Biol Chem* **267**: 4074-4083.
- Yamazoe, M., Adachi, S., Kanaya, S., Ohsumi, K., y Hiraga, S. (2005) Sequential binding of SeqA protein to nascent DNA segments at replication forks in synchronized cultures of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **55**: 289-298.
- Yao, N., Leu, F.P., Anjelkovic, J., Turner, J., y O'Donnell, M. (2000) DNA structure requirements for the *Escherichia coli* gamma complex clamp loader and DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* **275**: 11440-11450.
- Yoshinaga, K. (1973) Double-strand scission of DNA involved in thymineless death of *Escherichia coli* 15 TAU. *Biochim Biophys Acta* **294**: 204-213.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1999) Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell* **96**: 153-163.

## Bibliografía

---

- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992a) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. II. Frequency of primer synthesis and efficiency of primer utilization control Okazaki fragment size. *J Biol Chem* **267**: 4045-4053.
- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992b) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. III. A polymerase-primase interaction governs primer size. *J Biol Chem* **267**: 4054-4063.
- Zheng, L., Zhou, M., Chai, Q., Parrish, J., Xue, D., Patrick, S.M., Turchi, J.J., Yannone, S.M., Chen, D., y Shen, B. (2005) Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks. *EMBO Rep* **6**: 83-89.
- Zyskind, J.W.B., S. L. (1989) *Recombinant DNA. Laboratory manual*.

# *Figuras y Tablas*



• FIGURAS

Fig. 1.	Fases del ciclo celular de cultivos creciendo lenta y rápidamente.	13
Fig. 2.	Esquema de <i>oriC</i> .	15
Fig. 3.	Iniciación de la replicación cromosómica en <i>E. coli</i> .	17
Fig. 4.	Dinámica del replisoma de <i>Escherichia coli</i> .	22
Fig. 5.	Procesamiento de horquillas paradas con generación de DSBs o sin generación de DSBs.	27
Fig. 6.	Modelo general para la recuperación de la replicación promovida por RecA.	28
Fig. 7.	Esquema de la enzima NDP reductasa	32
Fig. 8.	Promotor de <i>nrdAB</i> .	35
Fig. 9.	Síntesis de DNA y citometría de flujo JS1018.	37
Fig. 10.	Procesamiento del gel de campo pulsante.	71
Fig. 11.	Esquema de la disposición de elementos durante la transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nylon.	83
Fig. 12.	Esquema de la disposición de elementos durante la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa.	89
Fig. 13.	Síntesis relativa de DNA y citometrías de flujo de estirpes derivadas de JS1018 deficientes en recombinación a 30°C tras la adición de rifampicina.	96

## Índice de figuras y tablas

---

Fig. 14.	Síntesis relativa de DNA y citometrías de flujo en estirpes derivadas de JS1018 deficientes en recombinación tras la adición de rifampicina a 42°C.	98
Fig. 15.	Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS627 tras adición de rifampicina, cloranfenicol o eliminación de los aminoácidos requeridos a 30°C y a 42°C.	99
Fig. 16.	Degradación cromosómica en JK625 y JS627 tras adición de rifampicina a 30°C o a 42°C.	100
Fig. 17.	Síntesis relativa de DNA de las estirpes JS881 y JS882 tras la adición de rifampicina a 30°C y 42°C.	102
Fig. 18.	Síntesis de DNA y citometría de flujo de JS1018 a 30°C y 42°C tras la inhibición de la síntesis de proteínas.	105
Fig. 19.	Citometría de flujo de JK607 tras la inhibición de la síntesis de proteínas a 30°C y a 42°C.	107
Fig. 20.	Síntesis de DNA y citometría de flujo de JK607, JS1018, JK876 y JS875 a 30°C en presencia de rifampicina.	108
Fig. 21.	Síntesis de DNA y citometrías de flujo de JS1018, JS875 y JK876 tras incubación a 42°C con o sin rifampicina.	110
Fig. 22.	Determinación de la frecuencia de marcadores por Southern blot de JS1018 y JS875.	111
Fig. 23.	Frecuencia de marcadores de JS1018 y JS875.	112
Fig. 24.	Microfotografías de contraste de fase de JS1018, JS875 y JK876 a 30°C y 42°C.	114
Fig. 25.	Citometrías de flujo de JS1018, JS875 y JK876 a 30°C o 42°C.	115
Fig. 26.	Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS1018, JS875 y JK876 en presencia de cefalexina a 30°C y 42°C.	116



## Índice de figuras y tablas

---

Fig. 27.	Citometrías de flujo de JK876 y JS875 a 42°C sin adición de cefalexina.	117
Fig. 28.	Microfotografías de contraste de fase de JS944, JK915, JS945 y JK916 a 30°C y 42°C.	119
Fig. 29.	Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS944 y JS945 a 42°C con cefalexina.	120
Fig. 30.	Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS948 tras adición de rifampicina a 30°C y a 42°C sin adición de rifampicina.	121
Fig. 31.	Crecimiento en placa de JS1018, JK607, JS912 y JK913 sembradas en Nutrient-Agar e incubadas a 30°C o a 42°C.	126
Fig. 32.	Síntesis relativa de DNA y citometría de flujo de JS912.	128
Fig. 33.	Microfotografías de contraste de fase de JS1018, JS912 y JK913 a 30°C y 42°C.	129
Fig. 34.	Microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia de JS912 y JK913 tras cuatro horas de incubación a 42°C en presencia de cefalexina.	130
Fig. 35.	Síntesis relativa de DNA de la estirpe de JS1018 creciendo con 5 µg/ml ó 2 µg/ml de TdR a 30°C tras la adición de rifampicina y tras cambio a 42°C.	131
Fig. 36.	Niveles celulares de NrdA a 42°C en presencia de los alelos <i>dnaC2</i> , <i>dnaAT174P</i> , <i>dnaA46</i> y de TdR 2 µg/ml.	136
Fig. 37.	Niveles celulares de NrdA a 42°C en JS1018 y JK607	137
Fig. 38.	Modelo de replicación en un mutante <i>nrdA101</i> a temperatura restrictiva.	154

## Índice de figuras y tablas

---

### • TABLAS

Tabla 1.	Estirpes de <i>E. coli</i> K-12 empleadas en este trabajo.	47
Tabla 2.	Sondas empleadas durante el análisis de la frecuencia de marcadores.	87
Tabla 3.	Parámetros de ciclo celular a 30°C de JK607, JS1018, JK876 y JS875	109
Tabla 4.	Parámetros de ciclo celular y síntesis de DNA a 42°C de las estirpes <i>dnaA5</i> y <i>dnaA508</i> utilizadas.	118
Tabla 5.	Parámetros de ciclo celular a 30°C de las estirpes <i>dnaAT174P</i> utilizadas.	126

### • FIGURAS Y TABLAS EN ANEXO

Fig. 1.	Procesamiento de las horquillas de replicación paradas.	162
Fig. 2.	Viabilidad de JK607 y derivadas deficientes en enzimas de recombinación.	167
Fig. 3.	Viabilidad de JK607 tras carencia de timina o adición de Hu.	169
Fig. 4.	Viabilidad de JK607 y derivadas deficientes en enzimas de recombinación tras adición de Hu 5 minutos antes de la carencia de timina en presencia o ausencia de Hu.	170
Tabla 1.	Porcentaje de DNA lineal en estirpes <i>nrdA</i> <sup>+</sup> y <i>nrdA101</i> en condiciones de eliminación de dNTP.	165
Tabla 2.	Porcentaje de DNA lineal en estirpes <i>nrdA</i> <sup>+</sup> bajo eliminación de timidina y/o inhibición de síntesis de proteínas.	171





## *Agradecimientos*

En primer lugar quiero agradecer a mis directores el esfuerzo y la fe que han depositado en este trabajo. A Elena, porque en los momentos en los que creía estar en un callejón sin salida, siempre ha sido ella quien ha propuesto nuevas hipótesis y ha encontrado explicación a lo inexplicable; y a Alfonso, por su gran capacidad de análisis y por aportar el contrapunto práctico necesario para no perdernos en divagaciones etéreas.

A mis compañeros de Genética (José, Mari Toñi, Rocío, Emilia, Nacho, Felipe...) por hacer que nunca en estos años haya considerado como un trabajo las horas pasadas en el laboratorio, por aguantar mis penas en los malos momentos y porque los lazos creados son insolubles. Soy consciente de que no volveré a encontrar un grupo así en ningún sitio.

A Encarna. Primero por ser capaz de adivinar el experimento que quería hacer a partir de mis notas surrealistas e incluso corregirlo. Y segundo por ser como es. Supongo que tendrá algún fallo...

A la gente de Bioquímica y de Microbiología por la colaboración prestada y el suministro de material en la época de escasez. Especialmente quiero agradecer al profesor Jaime Correa su inestimable ayuda al final de este trabajo.

Al resto de amiguetes de la Universidad (Modesto, Adrián, Alex, Víctor, Bettina, Chari y muchos más) por la preocupación e interés que han mostrado siempre en mi trabajo.

A mis amigos de toda la vida (Samuel, Paco, César, Lolo y Gonzalo) por nombrarme asesor científico oficial del grupo, ellos sabrán, y por el apoyo y confianza que nunca han dejado de prestarme.

A mi familia. A mi padre por creer que su hijo pertenece a una suerte de élite por hacer una tesis y presumir de ello delante de todos sus conocidos. A mi madre por su inquietud y por intentar comprender de qué va lo de la "Cherichia" esa. A mi hermano por aguantarme cuando me pongo pesado intentando decirle qué es lo que tiene que hacer con su vida como si yo lo supiera. Siempre me han hecho saber que se sienten orgullosos y, al fin y al cabo, es a lo que aspiro.

A los Drs. James R. Walker y Alexandra Blinkova por el suministro de parte de las bacterias y otros materiales utilizados en este trabajo, así como por su inestimable ayuda y asesoramiento durante mi estancia en la Universidad de Texas.

A los Drs. Morigen, Steven Sandler, Judith Zyskind y Takashi Hishida por el amable suministro de estirpes y plásmidos utilizados en este trabajo.

Nunca podré agradecer suficientemente a Estrella su profunda implicación en todas las fases de este trabajo. Tal ha sido su ayuda que me he vuelto peligrosamente dependiente de ella.

Por último agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de la beca de Formación de Profesorado Universitario que me ha permitido llevar a cabo este trabajo (AP2002-1157). Tampoco hubiera sido posible realizar esta tesis sin la financiación proporcionada por los proyectos BMC2002-00830 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y 2PR04A036 de la Junta de Extremadura.



