

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR Y GENETICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

INDUCCION TERMICA
DEL INICIO DE LA REPLICACION CROMOSOMICA
EN *Escherichia coli*

Emilia del Carmen Botello Cambero
Badajoz, 1994

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

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

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR Y GENETICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

**INDUCCION TERMICA
DEL INICIO DE LA REPLICACION CROMOSOMICA
EN *Escherichia coli***

Memoria presentada por la Licenciada
Emilia del Carmen Botello Cambero
para optar al grado de
Doctor en Ciencias (Biológicas).
Badajoz, Marzo de 1994.

Alfonso Jiménez Sánchez, Catedrático de Genética de la
Universidad de Extremadura

CERTIFICA

Que el presente trabajo de investigación, titulado "Inducción térmica del inicio de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*", ha sido realizado por la Lcda. D^a. Emilia del Carmen Botello Cambero, bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de esta Universidad, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Badajoz a 4 de Marzo de 1994.



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

*El **DNA** no es solamente una molécula
estática para ser leída, sino que,
su comportamiento dinámico es
también portador de información*

INDICE

INTRODUCCION

1. REPLICACION CROMOSOMICA EN <i>Escherichia coli</i>	3
1.1. CICLO CELULAR Y REPLICACION	3
1.2. ETAPAS DE LA REPLICACION CROMOSOMICA	7
1.2.1. Iniciación	7
1.2.1.1. Estructura de <i>oriC</i>	8
1.2.1.2. Un modelo para el inicio de la replicación en <i>oriC</i>	9
1.2.2. Elongación	11
1.2.3. Terminación	13
1.3. REGULACION DE LA REPLICACION CROMOSOMICA	14
1.3.1. Modelos de control de la replicación	14
1.3.1.1. Control positivo	15
1.3.1.2. Control negativo	16
1.3.1.3. Otros modelos	16
1.3.2. Factores que regulan la replicación	17
1.3.2.1. La respuesta restringida	17
1.3.2.2. Estructura y función de <i>oriC</i>	20
1.3.2.3. Regulación transcripcional	21
1.3.2.4. DnaA	24
1.3.2.5. PinO	26
1.3.2.6. Asociación de <i>oriC</i> a la membrana celular	27
1.3.3. Replicación estable	30
2. RESPUESTA DE <i>Escherichia coli</i> A LA TEMPERATURA	33
2.1. METABOLISMO CELULAR	33
2.2. LA RESPUESTA DE CHOQUE TERMICO	35
2.2.1. Las proteínas de choque térmico	36
2.2.1.1. Carabinas	37

2.2.1.2. Proteasas	39
2.2.1.3. Otras proteínas	41
2.2.2. Regulación de la respuesta de choque térmico	41
2.2.2.1. Regulación de σ^{32}	41
2.2.2.2. Autorregulación de la respuesta de choque térmico	44
2.2.3. Choque térmico y otras respuestas de estrés	45
2.3. ESTRUCTURA DEL DNA	47

M A T E R I A L E S

1. ESTIRPES BACTERIANAS	51
2. PLASMIDOS Y FAGOS	52
3. PRODUCTOS QUIMICOS	54
3.1. ANTIBIOTICOS	54
3.2. PRODUCTOS RADIATIVOS	55
4. TAMPONES Y SOLUCIONES	55
5. MEDIOS DE CRECIMIENTO	57
5.1. MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS	57
5.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA EL FAGO λ	57
6. ENZIMAS Y SISTEMAS DE CLONACION Y MARCAJE	58

M E T O D O S

1. CRECIMIENTO	61
2. CAMBIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO	62
3. CONSERVACION DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS	63
4. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO	63
4.1. MARCAJE DEL DNA <i>in vivo</i>	63
4.2. MEDIDA DE LA SINTESIS DE DNA	64
4.2.1. En crecimiento exponencial	65
4.2.2. Tras la inhibición de inicios de replicación	65

4.2.3. Tras la inducción de inicios de replicación.....	65
5. AISLAMIENTO DEL FAGO λ.....	66
6. AISLAMIENTO DE DNA.....	67
6.1. DNA CROMOSOMICO.....	67
6.2. DNA DEL FAGO λ.....	68
6.3. DNA PLASMIDICO.....	69
6.3.1. Lisis por calor.....	69
6.3.2. Método Brij.....	70
7. PURIFICACION Y CONCENTRACION DE DNA.....	71
8. DIGESTION Y LIGAMIENTO DE DNA.....	72
9. ELECTROFORESIS DE DNA.....	73
9.1. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	73
9.1.1. Electroforesis sobre membrana de diálisis.....	73
9.1.2. Centrifugación a través de lana de vidrio.....	74
10. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE DNA.....	74
10.1. DENSITOMETRIA DE GELES.....	74
10.2. ESPECTROFOTOMETRIA.....	75
11. TRANSFORMACION.....	75
12. DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MARCADORES.....	76
12.1. MARCAJE DE DNA CROMOSOMICO <i>in vitro</i>.....	76
12.2. PREPARACION DE LOS FILTROS PARA LA HIBRIDACION.....	77
12.3. HIBRIDACION.....	78
12.4. LAVADO DE LOS FILTROS.....	79
12.5. RECUENTO E INTERPRETACION.....	79
13. IDENTIFICACION DE CLONES RECOMBINANTES POR COMPLEMENTACION α.....	79
14. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASICA.....	80

RESULTADOS

1. ANALISIS DE LA INDUCCION TERMICA DEL INICIO DE LA REPLICACION	85
1.1. DEPENDENCIA DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO	86
1.2. REGULACION DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA	91
1.3. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL ORIGEN DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA	94
1.4. ANALISIS DE LA ACUMULACION DE DNA	96
2. INDUCCION TERMICA DE LA REPLICACION Y LA RESPUESTA DE CHOQUE TERMICO	99
2.1. EFECTO TERMODINAMICO DEL AUMENTO DE TEMPERATURA 100	
2.2. LA RESPUESTA DE CHOQUE TERMICO	101
2.2.1. Clonación y control del gen <i>rpoH</i>	101
2.2.2. Efecto de la inducción de la respuesta de choque térmico	107
2.3. EFECTO DE LA CLONACION DE <i>rpoH</i> EN EL CONTROL DE LA REPLICACION CROMOSOMICA	110
3. REPLICACION TERMOINDUCIDA Y REPLICACION ESTABLE	112

DISCUSION

1. REPLICACION TERMOINDUCIDA	120
1.1. UN MODELO PARA EL INICIO DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA	129
2. ALTERACION DEL CONTROL DE LA REPLICACION	131
2.1. UN MODELO PARA EL CONTROL DE LA REPLICACION CROMOSOMICA	133

CONCLUSIONES

.....	139
-------	-----

AGRADECIMIENTOS

.....	141
-------	-----

BIBLIOGRAFIA

.....	145
-------	-----

INTRODUCCION

1. REPLICACION CROMOSOMICA EN *Escherichia coli*

1.1. CICLO CELULAR Y REPLICACION

La vida de una célula bacteriana comienza con su nacimiento y acaba con la formación, por fisión binaria, de dos células nuevas. Entre estos dos procesos, nacimiento y división celular, la célula crece de manera que en el momento de la división todos los elementos celulares presentes en el nacimiento se han duplicado para dar lugar a dos células esencialmente idénticas. Las etapas necesarias para llevar a cabo la multiplicación de las células bacterianas constituyen el ciclo celular bacteriano.

El ciclo celular bacteriano, al igual que el de otros organismos, agrupa la progresión de varias etapas que incluyen (63, 143): el crecimiento celular, la duplicación del genoma o replicación (periodo C en bacterias y fase S en eucariontes), la separación de los cromosomas replicados (partición en bacterias y mitosis en eucariontes) y la división celular. La mayor diferencia entre el ciclo celular de eucariontes y el bacteriano es que en eucariontes el tiempo requerido para la replicación del cromosoma, fase S, es siempre menor que el del ciclo celular completo, mientras que en bacterias el periodo C puede ser mayor. En las células bacterianas los procesos que constituyen el ciclo celular están cuidadosamente controlados y coordinados unos con otros para, en un amplio rango de condiciones ambientales, conseguir la producción del máximo número de células viables por biomasa en el menor tiempo posible.

El conocimiento de los mecanismos de control y coordinación de las diferentes etapas del ciclo celular en *Escherichia coli*, a pesar de su aparente simplicidad, siguen constituyendo un interesante y controvertido tema de estudio.

La información genética de *E. coli* está contenida en una molécula circular de DNA de aproximadamente 4.700 kpb (301), que se duplica en cada ciclo celular durante el proceso de replicación para asegurar que cada célula hija reciba el

contenido de la información genética completo. Para analizar el ciclo celular con respecto a la replicación cromosómica en *E. coli*, por lo que a este trabajo interesa, se pueden definir tres periodos de tiempo (127): el tiempo que transcurre entre dos inicios de replicación consecutivos o tiempo de interiniciación, **I**, el tiempo en el que se realiza la replicación del cromosoma, periodo **C**, y el tiempo necesario entre la finalización de una ronda de replicación y la división celular siguiente, definido como periodo **D**. En el modelo descrito por Cooper y Helmstetter (50) para explicar el ciclo celular los periodos C y D son considerados constantes. Las predicciones de este modelo explican la existencia de periodos de tiempo en los que no hay replicación del DNA en cultivos que crecen lentamente, con tiempos de duplicación mayores al periodo C, y la existencia de cromosomas con varios puntos de replicación a la vez en cultivos con tiempos de duplicación inferiores a C minutos. Si se considera que las células comienzan un ciclo celular tras el inicio de la anterior ronda de replicación, la replicación cromosómica correspondiente a ese ciclo iniciará en I minutos y la célula se dividirá C+D minutos después de este inicio. Ya que la preparación de la célula para una nueva ronda de replicación es asumida como un proceso continuo, la célula comienza a preparar el siguiente inicio en el momento en que uno tiene lugar, dando comienzo de nuevo la secuencia I, C y D. Luego el ciclo celular puede ser considerado como la sucesión de varias secuencias lineales, I, C y D, que se solapan (Fig. 1).

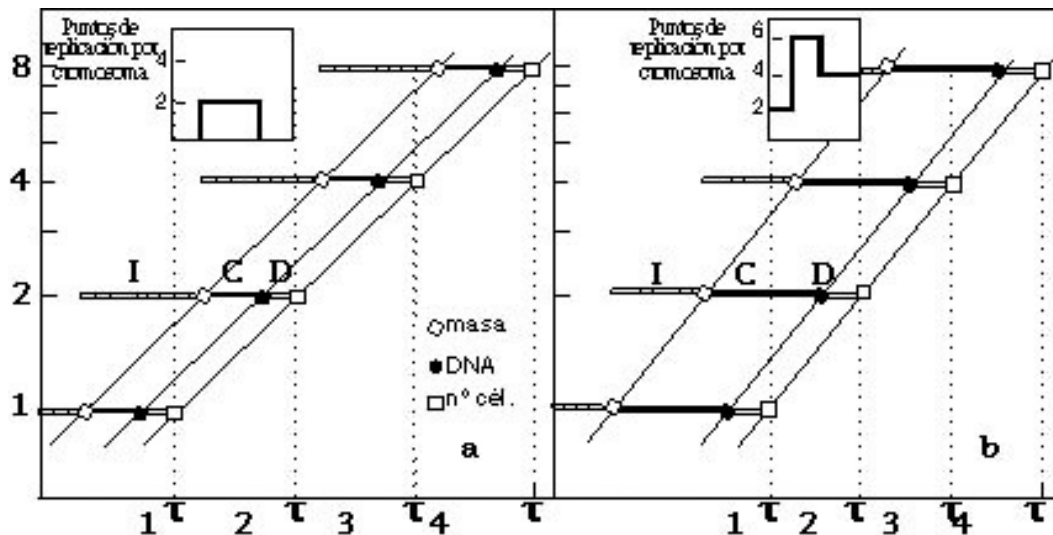


Figura 1. Ciclo celular y replicación en un cultivo creciendo lenta ($C < \tau$, a) y rápidamente ($C > \tau$, b).

Durante la replicación cromosómica se distinguen funcionalmente tres etapas: iniciación, elongación y terminación. La replicación inicia en un lugar fijo del cromosoma, *oriC*, localizado en el minuto 83,5 del mapa genético de *E. coli* (10, 301) y procede bidireccionalmente a lo largo del cromosoma a la misma velocidad en ambas direcciones, durante el periodo de elongación, hasta que los puntos de replicación se localizan en la región diametralmente opuesta del cromosoma, la región del término, o alcanzan los sitios de parada de la replicación, sitios *ter*, de esta región. Posteriormente se procede a la decatenación y la segregación de los nucleoides en la etapa de partición, previa a la división celular.

La etapa de elongación o periodo C requiere un tiempo prácticamente constante a una temperatura dada en un amplio rango de velocidades de crecimiento. Se ha encontrado que a 37°C y con tiempos de generación menores a 60 minutos el periodo C es de aproximadamente 40 minutos y que gradualmente se alarga al decrecer la velocidad de crecimiento, desde 38 minutos cuando el tiempo de generación es de 25 minutos hasta 60 minutos cuando el tiempo de generación es de 120 minutos, y en cultivos que crecen más lentamente el valor de C es aproximadamente un tercio del tiempo de generación. El periodo D es más constante, de 10 a 20 minutos para todas las velocidades de crecimiento (58, 127). En las células bacterianas, por lo tanto, la replicación del DNA está controlada en la etapa de iniciación. La tasa de replicación no está determinada por la velocidad de elongación sino por la frecuencia de inicio de la replicación.

Para sostener un crecimiento celular equilibrado, es decir para mantener constante la concentración de DNA durante el crecimiento exponencial, es necesario y suficiente que un inicio de replicación, y sólo uno, tenga lugar en cada ciclo celular (31, 324). Si el tiempo requerido para la replicación cromosómica es mayor al del ciclo celular, el inicio y el fin de una misma ronda de replicación no se producen en el mismo ciclo y la división celular que tenga lugar en ese ciclo es la consecuencia de la última terminación de las rondas de replicación en marcha. Así el tiempo entre dos divisiones sucesivas o tiempo de generación, τ , está determinado por el tiempo de interiniciación, I (50, 127, 187). Este mecanismo de control del inicio de la replicación cromosómica durante el crecimiento celular equilibrado, para asegurar una división celular en cada ciclo celular (Fig. 1), determina que la frecuencia de iniciación, ϕ , de la replicación sea:

$$\phi = \tau / I = 1$$

Dada esta regulación las diferencias entre la duración del periodo C y el tiempo de generación no tienen ninguna consecuencia en la precisión del ciclo celular. El inicio de la replicación es por tanto una etapa clave en el ciclo celular bacteriano.

La frecuencia de iniciación determina la tasa de síntesis de DNA y, por lo tanto, el contenido de DNA por célula.

El acoplamiento entre la replicación y el crecimiento celular requiere que el momento de la iniciación dentro del ciclo celular esté en función de la velocidad de crecimiento (57). Donachie combinó datos sobre la concentración de DNA en función de la velocidad de crecimiento con el modelo de ciclo celular propuesto por Cooper y Helmstetter y concluyó que la iniciación de la replicación tiene lugar a una relación de orígenes cromosómicos/ masa celular aproximadamente constante e independiente de la velocidad de crecimiento de las células y definió esa masa celular como **masa de iniciación, M_i** (62). Este parámetro refleja la concentración intracelular o actividad de un hipotético factor que controla el inicio de la replicación cromosómica en bacterias. La masa de iniciación sería por lo tanto un factor que determinaría el tamaño celular y la concentración de DNA. Posteriores aproximaciones de tipo experimental a este problema llevaron a la definición de la **masa de iniciación**, denotada como **M_o** , como la masa por origen en cultivos exponenciales no sincrónicos según el siguiente algoritmo (57):

$$M_o = \frac{\text{masa}}{\text{origen}} = \frac{\text{masa/genoma}}{\text{origen/genoma}} = \frac{DO/DNA}{2^n / G} = \frac{DO/DNA}{\Delta G + 1}$$

donde DO/DNA es el inverso de la concentración de DNA por masa del cultivo, 2^n el número de orígenes por cromosoma, G la cantidad de DNA por cromosoma e ΔG es el incremento relativo de DNA obtenido tras la inhibición del inicio de la replicación (consultar apartado 4.2.2 de Métodos). Así se encontró que la masa de iniciación incrementa al aumentar la velocidad de crecimiento y que alcanza un nivel máximo para velocidades de crecimiento superiores a una duplicación por hora.

Sin embargo estos dos planteamientos del parámetro masa de iniciación, la invariabilidad de célula a célula, es decir en clones individuales (62), y la variación de la masa de iniciación media de un cultivo en función de la velocidad de crecimiento (57), son fenómenos separados con diferente significado. La invariabilidad de célula a célula se relaciona con modelos del control del inicio de la replicación, mientras que la variación con la velocidad de crecimiento se relaciona con la regulación de la síntesis del factor que controlara el inicio de la replicación. Luego la constancia de la masa de iniciación en una célula es más la consecuencia del tipo de control de la iniciación y no la responsable de este (57, 161).

El inicio de la replicación es no sólo una etapa regulada en el tiempo como un suceso cíclico (50, 127, 187), sino que también presenta un alto grado de sincronía en los orígenes de replicación presentes en una misma célula (128, 186, 324). Como consecuencia del solapamiento de varias rondas de replicación, en cultivos bacterianos con tiempos de generación menores al periodo C, una célula tiene 2 o 4 orígenes de replicación en su cromosoma en el momento del inicio de una nueva ronda de replicación (50). Analizando el contenido final de DNA en células individuales de estos cultivos tras la inhibición de la iniciación, se ha determinado que al menos el 95% de las células contienen 2, 4 u 8 cromosomas completos, lo que indica que la iniciación en células con múltiples orígenes ocurre sincrónicamente en todos ellos, con un coeficiente de variación muy pequeño (324).

1.2. ETAPAS DE LA REPLICACION CROMOSOMICA

La replicación cromosómica es el proceso más importante del ciclo celular en *Escherichia coli*. La inhibición de la replicación cromosómica bloquea la división celular, mientras que la inhibición específica de la división celular permite la síntesis de DNA y el crecimiento celular (265). El conocimiento que, estructural y funcionalmente, se tiene de este proceso testimonia su complejidad, lo que hace que actualmente siga siendo objeto de investigación (para una revisión consultar 18 y 240). De las etapas en las que puede ser dividido funcionalmente este proceso, iniciación, elongación y terminación, la iniciación es la más compleja debido a que es la que está sujeta al mecanismo de control que conecta la replicación con el ciclo celular. Las estrategias de diferentes replicones para la iniciación son bastante variables, comparadas con la conservación del mecanismo de la elongación, lo que puede ser el reflejo de la necesidad de la regulación de la replicación en esta etapa (18).

1.2.1. Iniciación

El proceso de iniciación de la replicación cromosómica conlleva la identificación del sitio donde tiene lugar, *oriC*, y la apertura de la doble hélice en la región del origen para permitir la formación de los puntos de replicación, ya que los componentes enzimáticos del complejo de replicación actúan sobre moldes de DNA de cadena sencilla.

1.2.1.1. Estructura de *oriC*

La secuencia de DNA *oriC* está definida en un fragmento de 257 pb localizado en el minuto 83,5 del mapa genético de *E. coli* (6, 10, 248, 251, 280, 339). Se han utilizado aproximaciones filogenéticas y mutacionales para definir los requerimientos estructurales de *oriC* y se ha encontrado que la secuencia de *oriC* está altamente conservada en enterobacterias y que comparte determinadas características con los orígenes de replicación de otras bacterias, plásmidos y fagos (34, 405, 406). Dentro del mínimo origen de replicación de *E. coli*, que no posee regiones codificadoras para proteínas, hay dos tipos de secuencias: “elementos reconocidos por proteínas”, que conservan su secuencia de bases en varios orígenes de replicación de bacterias gram-negativas, separados por zonas que parecen actuar como “regiones espaciadoras”, cuyos tamaños son esenciales para la función de *oriC* (279).

La secuencia mínima de *oriC* en *E. coli* contiene 4 (89) o 5 (245) copias de la secuencia consenso de 9 pb 5'-(T/C)(T/C)(A/T/C)T(A/C)C(A/G)(A/C/T) (A/C)-3' (311), en forma de dos repeticiones invertidas, denotadas como **R1**, **R2**, **R3** y **R4**, y la quinta como **R5** o **M** localizada entre R1 y R2, a las cuales se une la proteína DnaA requerida en el inicio de la replicación tanto *in vitro* (89, 245, 388) como *in vivo* (308, 388). *oriC* contiene 11 copias de la secuencia 5'-GATC-3' reconocida por la enzima DNA adenina metiltransferasa de *E. coli*, o metilasa Dam (96), y de las que su estado de metilación parece dirigir la unión de *oriC* a la membrana celular (95, 201, 277). A la izquierda de R1 hay tres repeticiones directas de la secuencia de 13 pb rica en A y T 5'-GATCTNTTNTTTT-3', de la que forma parte la secuencia reconocida por la metilasa Dam, que son los sitios donde se inicia el proceso de apertura de la doble hélice requerida para la iniciación de la replicación (33, 34). Adyacente a la izquierda de los trecémeros se localiza otra secuencia rica en A y T, 5'-TATTAAAAAGAA-3', denominada **grupo AT**, que identifica el extremo izquierdo de *oriC* (6).

En el segmento mínimo de *oriC* se ha localizado entre R3 y R4 un sitio de unión de la DNA girasa (227). Se han purificado proteínas de membrana que se unen específicamente a zonas dentro de *oriC*, tanto a DNA de cadena sencilla (155, 156) como doble (129, 194), que unirán el DNA a la membrana. Este origen contiene también sitios de unión específicos para las proteínas de unión a DNA de doble cadena IHF (82, 292) y FIS (99), que junto con la proteína HU son las proteínas equivalentes a las histonas de eucariotes, que funcionan como factores accesorios que ayudan al ensamblaje de diferentes complejos DNA-proteínas y que pueden favorecer la formación de estructuras que faciliten el inicio de la

replicación mediante la introducción de plegamientos en la hélice del DNA (84, 314).

Por lo tanto el origen de replicación es una compleja región con señales reguladoras densamente empaquetadas. La repetición de las diferentes secuencias sugiere que *oriC* podría formar varios tipos de estructuras secundarias alternativas (251).

Que el inicio de la replicación tenga lugar específicamente en *oriC* está asegurado por la acción de varias proteínas auxiliares, entre las que se incluyen la RNasa HI, la DNA topoisomerasa I y la proteína HU, que eliminan la posibilidad de utilización de otros lugares cromosómicos como orígenes de replicación (165, 166, 243, 273). Probablemente estas proteínas reducen la síntesis de los cebadores no específicos de la replicación realizada por la RNA polimerasa bacteriana (274).

1.2.1.2. Un modelo para el inicio de la replicación en *oriC*

El mecanismo de iniciación de la replicación cromosómica ha sido dilucidado basándose en estudios *in vitro* con minicromosomas, plásmidos cuyo origen de replicación es *oriC*, (90, 166, 188) lo que ha llevado a proponer el siguiente modelo para el inicio de la replicación (Fig. 2, 33, 34).

La identificación del origen de replicación y la subsecuente desnaturalización de *oriC* es llevada a cabo por la unión específica y altamente cooperativa de la proteína DnaA a las secuencias que reconoce en *oriC* (89, 388). La proteína DnaA tiene una débil actividad ATPásica y se puede encontrar unida a ATP o ADP o a fosfolípidos y, aunque todas las formas pueden unirse a *oriC*, solamente la forma de DnaA unida a ATP es capaz de continuar las etapas siguientes requeridas para la iniciación (318). La unión de DnaA a *oriC* lleva a la formación de una estructura nucleoproteica denominada **complejo inicial** que consiste en un núcleo central de 10 a 40 monómeros de DnaA envueltos por el DNA de *oriC* superenrollado negativamente (92, 388). Se ha demostrado que DnaA está unida a las secuencias R1, R2 y R4 durante la mayor parte del ciclo celular, y que estas uniones resultan en la formación de un complejo donde la unión de DnaA a R3 es impedida, a pesar de su alta afinidad. Esto implica que a concentraciones no saturantes de DnaA la unión a R3 no se lleva a cabo y que es necesaria una transición de esta conformación para permitir la interacción DnaA-R3 que sería por lo tanto la última señal para el inicio de la replicación (245, 308, 311).

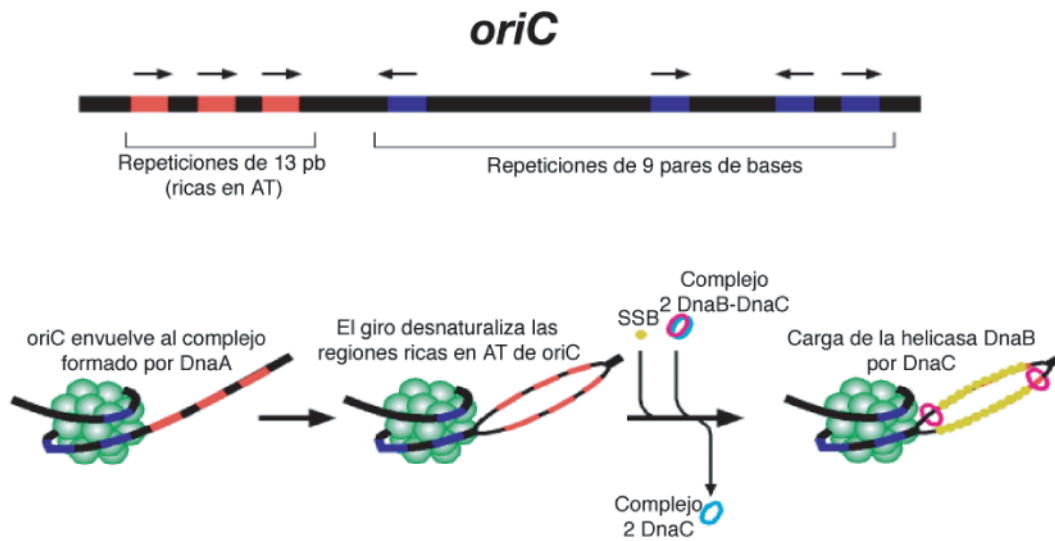


Figura 2. Modelo para el inicio de la replicación en *oriC*.

El complejo inicial puede ser convertido así en un **complejo abierto** donde la zona rica en A+T es desnaturalizada secuencialmente desde el trecémero derecho hacia la izquierda (33, 400). Este proceso de apertura de la doble hélice es estrictamente dependiente de DNA superenrollado negativamente (15), requiere una temperatura mínima, mayor de 22°C, y es estimulado por bajos niveles de las proteínas HU o IHF (33, 149, 325). Las condiciones óptimas para su formación y estabilidad *in vitro* son la presencia de alta temperatura, 38°C, y ATP 5 mM e *in vivo* también es requerido un proceso de transcripción (204, 250). Se determina así la región del origen de la replicación y se generan las cadenas sencillas de DNA para que las proteínas que forman el complejo de replicación se unan en el lugar de iniciación correcto y la síntesis de DNA comience.

La proteína DnaA del complejo abierto dirige al complejo DnaB-DnaC al lugar del DNA desnaturalizado, la región de los trecémeros, formando el **complejo precebador** que estabiliza la apertura del DNA en esa zona. DnaC actúa como proteína acompañante; se ha propuesto que DnaC reconoce a DnaA, facilita así la unión de DnaB al origen y se libera del complejo DnaB-DnaC al final de este proceso (92). Si las proteínas SSB y DNA girasa están presentes la actividad DNA helicasa de DnaB desenrolla el DNA de doble cadena bidireccionalmente desde *oriC* tanto *in vivo* como *in vitro* (16, 17, 167). La proteína DnaB es la responsable del desenrollamiento del DNA en el punto de replicación pero es incapaz de iniciar el desenrollamiento en una molécula de doble cadena por lo tanto dos complejos con DnaB, cada uno de ellos unidos a una cadena de DNA, deben situarse en *oriC* durante la iniciación (16, 17, 61). Una vez comenzado el

desenrollamiento si se suministran la primasa y la holoenzima DNA polimerasa III estará formado el punto de replicación y tendrá lugar la síntesis de la molécula copia del cromosoma.

1.2.2. Elongación

La proteína DnaB es la que une los procesos de iniciación y elongación de la replicación, interactúa con los factores de iniciación y, una vez unida al molde de DNA y activadas sus funciones enzimáticas, establece al resto de las proteínas en el punto de replicación para llevar a cabo la etapa de elongación.

Durante el proceso de elongación la proteína DnaB posee las actividades de DNA helicasa, desplazándose sin disociarse de la cadena de DNA a la que está unida en la dirección $5' \rightarrow 3'$ para realizar la apertura de la doble hélice, y la de **promotor móvil** denominada así porque activa la síntesis de los RNA cebadores llevada a cabo por la primasa (208).

Una vez formado el punto de replicación, el complejo de replicación está constituido por cuatro componentes básicos: la proteína DnaB, requerida para el desenrollamiento de la doble cadena del DNA parental, que genera así cadenas sencillas de DNA; la primasa, requerida para la síntesis de los cebadores de RNA para la síntesis de las nuevas cadenas de DNA, ya que las DNA polimerasas no inician la síntesis de DNA *de novo*; la proteína SSB, que se une al DNA de cadena sencilla generado por la DNA helicasa para protegerlo y estabilizar el desenrollamiento del DNA, evitando la formación de una estructura secundaria que impida la síntesis de DNA; y la DNA polimerasa III holoenzima, un complejo formado por varias proteínas que copia los moldes de DNA de cadena sencilla por elongación de los cebadores previamente sintetizados. El movimiento en el punto de replicación requiere una topoisomerasa para eliminar la tensión topológica asociada con el desenrollamiento de la doble cadena de DNA. Esta función es realizada por la DNA girasa que introduce superenrollamiento negativo en el DNA, previo al paso por el punto de replicación (17, 91).

En el punto de replicación, durante el proceso de elongación, se encuentra una asimetría fundamental debida a los requerimientos enzimáticos para la síntesis de DNA. La orientación antiparalela que presentan las cadenas molde de la doble hélice de DNA y el hecho de que la DNA polimerasa III sólo sintetice DNA en la dirección $5' \rightarrow 3'$ hacen que una cadena pueda ser sintetizada de forma continua mientras que su complementaria es sintetizada de forma discontinua en pequeños

fragmentos de aproximadamente 2 kpb de longitud denominados **fragmentos de Okazaki**.

Una vez iniciado el desenrollamiento, la primasa interacciona con la proteína DnaB en el complejo de replicación y así es inducida a sintetizar cebadores de RNA. Actualmente se desarrollan investigaciones para determinar si la síntesis de los cebadores durante la replicación cromosómica está precedida por el ensamblaje a DnaB de un complejo de varias proteínas entre las que podrían estar PriA (proteína n'), PriB (proteína n), PriC (proteína n''), DnaT (proteína i) y DnaC. Este complejo móvil de varias proteínas que se unen transitoriamente a la primasa, para sintetizar un nuevo cebador, es denominado **primosoma** (1). Los cebadores iniciales son extendidos por la DNA polimerasa III constituyendo la cadena de DNA de síntesis continua. La acción helicasa 5'→3' de DnaB la coloca sobre el molde para la síntesis de DNA de la cadena discontinua. El desenrollamiento de la doble hélice de DNA por DnaB permite por tanto la síntesis de la cadena continua y la síntesis intermitente por la primasa de los múltiples cebadores de los fragmentos de Okazaki de la cadena sintetizada de forma discontinua.

Hay pruebas de la naturaleza de dímero de la DNA polimerasa III en el complejo de replicación, pudiendo interactuar simultáneamente con ambas cadenas molde, y de cierta asimetría funcional en la acción de las subunidades de las 2 holoenzimas del dímero de forma que su avance es físicamente en la misma dirección (389, 390). La polimerasa que sintetiza la cadena continua se mueve en la misma dirección que DnaB y se une y copia la cadena opuesta a la que se une DnaB. Para sintetizar la cadena discontinua, la DNA polimerasa se une a la misma cadena que DnaB pero se desplaza en la dirección contraria. El núcleo enzimático de la DNA polimerasa que sintetiza la cadena discontinua de DNA debe llevar a cabo varios ciclos de asociación y disociación con la cadena molde para la síntesis de DNA, sin embargo se ha demostrado que actúa procesivamente durante los múltiples ciclos de síntesis de los fragmentos de Okazaki siendo las interacciones proteína-proteína, probablemente con el núcleo de la DNA polimerasa que sintetiza la cadena continua, las que actúan para retener a la polimerasa de la cadena discontinua en el punto de replicación (389, 390). El avance de las dos polimerasas de cada punto de replicación físicamente en la misma dirección se puede conseguir si la cadena molde de la cadena que se sintetiza de forma discontinua forma un bucle durante la síntesis de fragmentos de Okazaki. Un giro de 180° de esta cadena la coloca en la misma orientación que la de la cadena molde para la síntesis continua y tras alcanzar el complejo de replicación el extremo 5' del anterior fragmento sintetizado la cadena molde es

liberada y pierde el giro hasta el comienzo de la síntesis de DNA del siguiente fragmento de Okazaki (240).

La síntesis discontinua de DNA hace necesaria la acción de otras proteínas en el proceso de elongación. Las cortas cadenas de fragmentos de Okazaki generadas de forma discontinua requieren un procesamiento que es rápidamente realizado tras su síntesis. La eliminación del cebador de RNA la lleva a cabo la RNasa HI y/o la DNA polimerasa I con su actividad exonucleasa 5' → 3', la síntesis de DNA en el hueco generado es realizada por la actividad polimerásica de la DNA polimerasa I y la unión de todos los fragmentos sintetizados para que formen una cadena continua es llevada a cabo por la acción de la DNA ligasa (91, 275).

1.2.3. Terminación

Cuando en el complejo de replicación que se formó en *oriC*, y por el que se ha desplazado todo el cromosoma bidireccionalmente, converge la zona diametralmente opuesta del cromosoma, la región del término, la replicación se detiene (10, 193, 229).

A ambos lados de la región del término del cromosoma de *E. coli* se localizan sitios relacionados con la inhibición del movimiento del complejo de replicación que actúan de forma polar, de tal modo que permiten la entrada de la región del término en el complejo de replicación pero no la salida de él (141, 244). Estos sitios de inhibición de la replicación se han descrito también en otros sistemas bacterianos (24, 382), virus (22) y células eucarióticas (133).

Hay dos *loci* primarios localizados en los extremos de la región del término que inhiben la progresión del cromosoma por el complejo de replicación, los terminadores de la replicación *terA* (28,3 min) y *terC* (33,5 min). *terC* sólo inhibe a la replicación que se realiza en el sentido opuesto a las agujas del reloj y *terA* inhibe la replicación que tiene el sentido horario (141, 244). En los terminadores se ha identificado una secuencia consenso de 23 pb, la secuencia *ter*, que actúa como señal de terminación (139). Posteriormente se ha localizado esta secuencia consenso en otras posiciones en las proximidades de la región de terminación. Se conocen actualmente 6 sitios para la terminación en esta zona del cromosoma de *E. coli* y su orientación, actuando todos ellos de forma polar para inhibir el movimiento en el complejo de replicación de replicación en un sentido, *terC*, *terB* y *terF*, y en el contrario, *terA*, *terD* y *terE*. La disposición de estas secuencias parece contribuir a la organización del cromosoma (136, 140, 288, 319).

La proteína Tus es un componente requerido para la terminación de la replicación en las secuencias de terminación. El mecanismo que inhibe la replicación implica la unión de la proteína Tus a las secuencias *ter* (135, 174 288). Las DNA helicasas, incluyendo a DnaB, son específicamente bloqueadas por estos complejos Tus-*ter* (173, 209) lo que resulta en la parada del complejo de replicación.

Este sistema específico para la terminación no es esencial, ya que cuando la región del término es delecionada, la replicación finaliza al encontrarse el punto de replicación en cualquier región cromosómica desplazándose en direcciones opuestas, pero asegura que la terminación y la resolución de los cromosomas tengan lugar en esta región cromosómica cuando esta región no alcanza el complejo de replicación simultáneamente (130).

1.3. REGULACION DE LA REPLICACION CROMOSOMICA

El periodo crítico del ciclo celular que coordina la replicación cromosómica con el crecimiento celular es el tiempo de interiniciación, I, el cual debe ser siempre igual al tiempo de generación (50, 127, 187). Para que la coordinación entre replicación y crecimiento celular exista, el momento en el que tiene lugar una iniciación de la replicación debe estar regulado dentro del ciclo celular y responder a los cambios de la velocidad de crecimiento celular. En la célula debe existir algún mecanismo que genere la actividad cíclica de la iniciación como resultado del proceso de crecimiento continuo (para una revisión consultar 31, 39, 161).

1.3.1. Modelos de control de la replicación

La hipótesis del replicón formulada por Jacob et al. (154) para explicar el control del inicio de la replicación define los términos **replicón** como una unidad de replicación de DNA que es controlada en un lugar, el **replicador**, situado cerca del comienzo de la replicación y el **iniciador** como una proteína cuya síntesis o actividad cíclica, en la hipótesis considerado como un factor que actúa positivamente sobre la iniciación, controlará la replicación.

Todos los modelos propuestos posteriormente para explicar el control de la replicación suponen la existencia de una estructura denominada **oscilador** que provee el mecanismo celular que genera la actividad cíclica de la iniciación. Esta

estructura tendrá sitios de unión al factor que controla la replicación, que puede actuar positiva o negativamente. Este concepto difiere del de replicador en que el oscilador puede no estar localizado en el origen de replicación y, mientras que el replicador recibe la señal cíclica, el oscilador puede generarla.

Para generar una actividad de replicación cíclica el oscilador debe detectar el crecimiento celular para conocer el tiempo de generación, generar una señal que lleve a la iniciación y detectar esa iniciación para dar comienzo a un nuevo ciclo. El sensor del crecimiento puede ser un conjunto de múltiples sitios de unión para una proteína específica de control que sea sintetizada constitutivamente y que puede ser un factor positivo que se acumula durante el crecimiento en esta estructura o un inhibidor de la iniciación que se diluya por el crecimiento. El oscilador puede o no formar parte de *oriC*, pero el hecho de que los minicromosomas sean compatibles con el cromosoma hace sugerir que *oriC* no forma parte esencial del oscilador. El factor que lleve a la iniciación, por unión al oscilador o generado por él, podría ser una proteína, un RNA o un tipo de estructura específica en el DNA y que podría funcionar como un activador o como un factor que elimina un inhibidor de la iniciación. El sensor que detecte el inicio de la replicación, y con él el inicio de un nuevo ciclo, debe detectar una señal generada por la iniciación como podría ser su propia duplicación, si es un sitio de *oriC* o cercano a él, o la alteración de una estructura de membrana.

La búsqueda del mecanismo celular que genere sucesos cíclicos de iniciación ha llevado a postular los siguientes modelos de control de la replicación.

1.3.1.1. Control positivo

Hay modelos que asumen que un factor positivo, un **iniciador**, que es sintetizado constitutivamente es el que controla al oscilador. La acumulación del iniciador durante el ciclo celular en sus múltiples sitios de unión hace que, al alcanzar un número de sitios unidos al iniciador o de iniciadores por sitio, tenga lugar el proceso de iniciación. Cuanto mayor sea el número, de sitios unidos al iniciador o de iniciadores por sitio, requerido para que esto ocurra, mayor será la sincronía de la iniciación en los múltiples orígenes presentes en la célula y la precisión del ciclo celular. En el proceso de iniciación el iniciador será consumido o inactivado y tras un tiempo de generación se volverán a acumular los iniciadores necesarios para un nuevo inicio.

Como modelos de control positivo han sido propuestos recientemente el denominado **modelo de titulación del iniciador** (120) y el formulado por J. M. Mahaffy y J. W. Zyskind (237) en los que la proteína DnaA actúa como iniciador.

En el primero los sitios de unión al iniciador están repartidos por el cromosoma y más concentrados cerca de *oriC*, aunque estos con menos afinidad por el iniciador, y en el de Mahaffy y Zyskind son los diferentes estados en los que se encuentra la proteína DnaA en la célula los que determinan su unión o no a los sitios de unión en *oriC*.

1.3.1.2. Control negativo

El **modelo de la dilución del inhibidor**, formulado por Pritchard et al. (293, 295), propone un mecanismo de control negativo de la replicación. El mantenimiento de la concentración de orígenes por masa durante un crecimiento equilibrado se llevaría a cabo por la dilución de un producto inhibidor del inicio de la replicación. El inhibidor sería un producto inestable que se sintetizaría constitutivamente desde un gen cercano al origen de replicación y cuya concentración disminuiría por aumento de la masa celular y por su inestabilidad. Independientemente del número de orígenes presentes, poco después de cada iniciación se duplicaría el gen que codifica al inhibidor que llevaría a alcanzar su máxima concentración e impediría una nueva iniciación. Cuando el inhibidor se diluya por debajo de una concentración umbral, el origen dejará de ser inhibido y se permitirá el inicio de la siguiente ronda de replicación en los orígenes presentes. Del tiempo requerido para alcanzar esta concentración umbral dependerá la frecuencia de iniciación, y como esta se alcanza por el aumento de la masa, la célula mantiene el mismo número de orígenes de generación en generación. Si por cualquier cambio de las condiciones de crecimiento hay un desacoplamiento entre la frecuencia de iniciación y el aumento de la masa, este siempre llevará a variaciones en la concentración del inhibidor que conducirán a una vuelta al equilibrio de estos parámetros.

De este modelo se deduce que la concentración de inhibidor debe actuar sobre el propio origen de replicación para que este detecte de forma directa la duplicación de la masa, probablemente manteniendo en la región del origen una conformación desfavorable para la iniciación hasta alcanzar su concentración umbral. Este mecanismo de control negativo es el que actúa en el control de la replicación de plásmidos como ColE1 (47.a, 196.a), F (173.b, 359.a) y R1 (218.a).

1.3.1.3. Otros modelos

Los modelos anteriores hipotetizan diferentes tipos de control, pero todos sugieren la existencia de un producto que sirve para determinar el momento de la

iniciación a una concentración saturante, el iniciador, o tras su dilución, el inhibidor. Sin embargo el mecanismo de control de la replicación puede ser más complejo de lo propuesto en los anteriores modelos. Hay modelos que proponen la existencia de más de un factor limitante aunque con un sólo factor que controla al oscilador y que precede en su acción al resto de los factores limitantes. Otra posibilidad es que la iniciación fuera controlada negativamente y que el oscilador, controlado positivamente, generara un factor para eliminar el inhibidor.

1.3.2. Factores que regulan la replicación

Hasta ahora no hay una respuesta al tipo de control de la replicación. Los datos obtenidos en estudios de la replicación realizados *in vivo* e *in vitro* determinan los elementos requeridos para el proceso de iniciación. El conocimiento de estos elementos nos acercará a la comprensión del mecanismo de control de la replicación, ya que en sus interacciones es donde se debe encontrar el paso que limite la tasa de inicios. A continuación se presentan los factores, conocidos o sugeridos, que afectan a la regulación de la replicación cromosómica.

1.3.2.1. La respuesta restringida

El control de la replicación cromosómica es dependiente de la velocidad de crecimiento. La masa de iniciación de un cultivo, parámetro que determina o determinado por el momento del inicio de la replicación, incrementa al aumentar la velocidad de crecimiento, hecho que refleja la regulación dependiente de la velocidad de crecimiento del factor que controla la iniciación (57). La dependencia de la masa de iniciación de la velocidad de crecimiento podría ser el resultado de algún tipo de regulación metabólica.

Cuando un cultivo bacteriano experimenta una carencia causada por la limitación de los aminoácidos requeridos o de la fuente primaria de energía realiza una rápida, compleja y variada serie de reajustes en la regulación de numerosas funciones celulares que se conoce con el nombre de **respuesta restringida** (para una revisión consultar 47). Distintas líneas de evidencia, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que el nucleótido fosforilado de guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato, **ppGpp**, es el mediador principal de la respuesta restringida (7).

La acumulación de ppGpp es regulada por al menos dos mecanismos en *E. coli*, dependiendo del estímulo que provoque la respuesta. Durante la carencia de aminoácidos o la presencia de agentes desnaturizantes la activación de la

síntesis de ppGpp se lleva a cabo por el producto del gen *relA*, la enzima ppGpp sintetasa I que tiene actividad ATP:GTP(GDP) pirofosforil-transferasa. La enzima es activa cuando se une a ribosomas que contienen RNA mensajero y RNA transferente no cargado unidos en el sitio aceptor del ribosoma (124, 287). La carencia de aminoácidos en estirpes mutantes *relA* no aumenta los niveles de ppGpp celulares, lo que se conoce como **respuesta relajada** (331). El segundo mecanismo se activa por la carencia de la fuente de energía o la adición de agentes quelantes y esta inducción requiere la presencia del producto del gen *spoT*, la enzima ppGpp sintetasa II. Esta enzima es bifuncional y participa tanto en la síntesis como en la degradación de ppGpp, pudiendo ser sus funciones afectadas independientemente por mutación (134, 392). La síntesis de ppGpp en carencia de la fuente primaria de carbono parece estar regulada por el producto del gen *relX* aunque su modo de acción no es conocido (93, 285). Estas dos enzimas, ppGpp sintetasa I y II, se regulan de forma diferente en condiciones de estrés y la síntesis de ppGpp que cataliza cada una de ellas es independiente de la otra. El nivel basal de ppGpp en la célula, en condiciones de crecimiento equilibrado, es el resultado de las contribuciones aditivas de ambas enzimas (285) y el control de la degradación lo lleva a cabo el producto del gen *spoT* (134, 392).

Los cambios en la concentración de ppGpp afectan a la expresión de muchos genes y ajustan diferentes actividades fisiológicas celulares, siendo el efecto más característico la reducción drástica de la velocidad de síntesis de RNA estable. Existe una correlación estricta entre la concentración de ppGpp y la síntesis de RNA estable que ha sido explicada proponiendo un modelo de actuación de ppGpp unido a la RNA polimerasa (21, 197, 198, 207, 305 310). Las dos formas de la RNA polimerasa, unida o no a ppGpp, diferirán en su afinidad por los promotores (21, 355, 356), encontrándose en los promotores sensibles a ppGpp al menos dos o tres secuencias conservadas (199, 357). Estos hechos sugieren que uno de los mecanismos primarios de control de la velocidad de crecimiento es vía ppGpp, estando la concentración intracelular de ppGpp inversamente relacionada con la velocidad de crecimiento (47, 93, 310).

Se ha establecido la función reguladora de la respuesta restringida en el inicio de la replicación dependiente de *oriC*, en cromosoma y minicromosomas (117, 214, 232, 381), así como en la replicación de varios plásmidos, ColE1, RSF1010 y R1(117, 125). En trabajos realizados por Guzmán et al. (117, 161) se analizó la replicación cromosómica, del minicromosoma pSY317 y la de pBR322 (ColE1) tras la carencia de aminoácidos requeridos o la adición de cloranfenicol en estirpes restringidas, *Rel*⁺, y relajadas, *Rel*⁻. Los resultados obtenidos indicaron que la replicación dependiente de *oriC* requiere síntesis de proteínas, ya que es

inhibida tras someter al cultivo a la carencia de los aminoácidos requeridos o la adición de cloranfenicol en ambas estirpes. Sin embargo cuando la inhibición de la síntesis de proteínas se llevó a cabo mediante carencia de isoleucina la replicación dependiente de *oriC* no fue inhibida en las estirpes relajadas, por lo tanto la inhibición de la replicación cromosómica y del minicromosoma tras la carencia de isoleucina en estirpes Rel⁺ es atribuida a la respuesta restringida. La replicación de pBR322, que no requiere síntesis de proteínas (48), es reprimida por la carencia de aminoácidos sólo en las estirpes restringidas, luego esta inhibición está también adscrita a la respuesta restringida. La función inhibidora de ppGpp en el inicio de replicación en *oriC* y en los orígenes de replicación de ColE1, RSF1010 y R1 se confirmó utilizando estirpes dobles mutantes *relA relX*, que presentan una reducción del nivel basal de ppGpp de la estirpe silvestre de unas 10 a 15 veces debido a una disminución de su velocidad de síntesis. En la estirpe silvestre y el doble mutante se determinó la concentración de DNA cromosómico y el número de copias de los diferentes replicones y se obtuvo que cultivos creciendo exponencialmente de ambas estirpes presentan un incremento del 70% en la concentración de DNA cromosómico y en el número de copias del minicromosoma pSY317, del 250% en el número de copias de pBR322 (ColE1), del 110% en el número de copias de pKT231 (RSF1010) y del 90% en el número de copias de pKN562 (R1) en el doble mutante, relativo a la cantidad presente en la estirpe silvestre (datos no publicados). Luego bajos niveles de ppGpp determinan una mayor concentración de DNA y este efecto es debido a una bajada de la masa de iniciación que adelanta el momento de la iniciación dentro del ciclo celular, aunque sin alterar el mecanismo de control de la replicación que determina la frecuencia de iniciación de una por ciclo (161).

Este efecto inhibitor de ppGpp sobre la iniciación puede ser debido al control restringido de la transcripción requerida en el inicio de la replicación o, como muestran los resultados de la replicación desde *oriC* tras la carencia de aminoácidos, la del RNA mensajero de una proteína requerida en el inicio de replicación. El control restringido de varios factores que afectan a la regulación de la replicación se indica al tratar de ellos, en los apartados siguientes de esta introducción.

Debido a la correlación inversa entre velocidad de crecimiento y nivel de ppGpp y entre concentración de DNA y nivel de ppGpp, la masa de iniciación debe ser el resultado de una velocidad de crecimiento dada y mantenerse constante a lo largo del crecimiento exponencial sin alterar el control de la replicación. Todo esto sugiere la posibilidad de que ppGpp provea el mecanismo necesario de acoplamiento entre el crecimiento celular y la tasa de iniciación y

lleva a la consideración de la acción de ppGpp como un probable mensajero químico entre los procesos de traducción, transcripción y replicación (55, 117).

1.3.2.2. Estructura y función de *oriC*

Las dos regiones estructurales que se distinguen dentro de *oriC*, a la derecha las secuencias de unión a DnaA y a la izquierda la zona rica en AT, determinan funcionalmente los procesos que tienen lugar durante el inicio de la replicación: el reconocimiento del origen de la replicación y la apertura de la molécula molde de DNA.

Durante la formación del complejo inicial se ha demostrado que las posiciones que ocupan las secuencias de unión de DnaA en *oriC* son importantes para su funcionalidad como origen. Inserciones o deleciones de un giro completo de la hélice en esta región no altera la eficacia de la iniciación, mientras que todas las modificaciones de distancias menores o mayores resultan en una inactivación de *oriC*. Por tanto hay zonas de *oriC* donde la longitud de las regiones espaciadoras debe ser mantenida de forma precisa que en este caso permitirán la interacción correcta entre los distintos monómeros de DnaA, aún cuando la unión inicial de DnaA a las secuencias que reconoce en *oriC* no es impedida, requerida para la formación del complejo inicial (388).

La formación del complejo abierto parece ser el paso llave para la iniciación en *oriC*. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la inestabilidad de la doble hélice en *oriC* para la función del origen ya que esto contribuye a localizar el desenrollamiento durante el inicio de la replicación. La región izquierda de *oriC*, rica en AT, es un elemento genético complejo en el que se solapan dos funciones: el reconocimiento de proteínas y la inestabilidad de la hélice requerida para la función del origen y ha sido denominado **elemento para el desenrollamiento del DNA (DUE)** (189). La doble hélice de la región de los trecémeros presenta una estabilidad reducida en estructuras superenrolladas negativamente *in vitro* por lo que se requiere un coste energético bajo para que la apertura del origen tenga lugar en esas secuencias (189). Estudios realizados *in vivo* han mostrado también la implicación de un cambio estructural de los tres trecémeros ricos en AT durante la iniciación y la formación del complejo abierto como el paso que limita la tasa de iniciación de la replicación (100). El reconocimiento de DnaA es esencial para iniciar el desenrollamiento en el trecémero derecho pero no para propagarlo en esta región ya que la inestabilidad de la hélice en el DUE facilita el desenrollamiento del origen (6, 100, 189). Una vez que el complejo abierto se ha

formado tienen lugar rápidamente la formación del complejo precebador y la síntesis del RNA cebador.

El requerimiento de una zona que facilite la apertura del DNA para el inicio de replicación puede ser general para una variedad de orígenes y recientemente ha sido determinado en levaduras (145, 260). *In vivo* la apertura de la doble hélice de DNA no es alcanzada tan fácilmente como *in vitro* posiblemente debido a un menor nivel de superenrollamiento *in vivo*. La relación encontrada entre el superenrollamiento del DNA y la desnaturalización de *oriC* en la región de los trecémeros ha llevado a formular la hipótesis de que el superenrollamiento podría modular la iniciación vía el DUE, hipótesis consistente con el hecho de que el aumento del superenrollamiento negativo en *oriC* puede suprimir mutantes *dnaA* defectivos en la iniciación (228) y que podría explicar porqué la transcripción activa *in vivo* el inicio de la replicación (15, 204).

La importancia de la formación del complejo abierto es subrayada por la función de la proteína IciA (147). La proteína IciA bloquea la iniciación de la replicación cromosómica *in vitro* mediante su unión a los tres trecémeros de la secuencia de *oriC*, previniendo la acción de la proteína DnaA en la apertura de esta región, sin afectar a la unión de DnaA a los nonámeros (346). La interacción selectiva de las proteínas DnaA e IciA con la región de los trecémeros parece ser un componente del mecanismo que controla el momento del inicio de la replicación (148). Las acciones opuestas de estas dos proteínas reguladoras en la apertura del origen de replicación podrían ser las responsables de la limitada región de apertura *in vivo* y la razón por la que la activación transcripcional es obligatoria (100).

1.3.2.3. Regulación transcripcional

La actividad de la RNA polimerasa es esencial para la iniciación de la replicación cromosómica *in vivo*. Esta necesidad se infirió basándose en la inhibición de nuevos ciclos de replicación tras la adición de rifampicina, inhibidor de la actividad de la RNA polimerasa (204, 250) y en la supresión de mutaciones de *dnaA* por mutaciones en *rpoB*, gen que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa (12).

El requerimiento de la RNA polimerasa *in vitro* para la iniciación en *oriC* depende de las condiciones de la reacción; su actividad es requerida cuando las condiciones de la reacción no son las óptimas para la formación del complejo abierto (15, 33, 91, 274, 325). En diferentes condiciones estudiadas *in vitro* la síntesis de DNA tiene lugar en ausencia de RNA polimerasa mientras que la

acción de la primasa es esencial; esto indica que la acción de la RNA polimerasa en el inicio de la replicación es la activación del origen como único sitio de iniciación, ayudando en la apertura de la hélice a DnaA, para ser primado por la primasa (274, 360). El paso de activación del inicio por la RNA polimerasa es previo e independiente al de la replicación del DNA (15). Una región híbrida RNA-DNA cerca o a cierta distancia de *oriC* es necesaria y suficiente para que tenga lugar la activación transcripcional del inicio de replicación; el híbrido RNA-DNA genera una zona de inestabilidad que, alterando la estructura del DNA, estimula la separación de las cadenas en la zona de los trecémeros de *oriC* durante la formación del complejo abierto (15, 325).

In vivo la actividad de la RNA polimerasa y su relación con la función de la proteína DnaA en el inicio de la replicación y con la topología del DNA de la región del origen son los factores que pueden facilitar la apertura de la doble hélice activando la replicación de forma similar a la situación encontrada *in vitro*. Se ha observado que la transcripción es un importante factor que afecta al superenrollamiento del DNA y genera una disminución del número de enlace detrás del avance de la polimerasa (222, 283, 359, 391). Basándose en este hecho se ha formulado un modelo más atractivo para la activación del inicio de la replicación *in vivo* que sugiere que la disminución del número de enlace creada por la RNA polimerasa al desplazarse por la doble hélice de DNA facilita la apertura de la doble hélice y que explica que la RNA polimerasa suprima mutaciones en el proceso de inicio por alteración de la topología del DNA (6, 15, 86). Varios resultados sugieren que el superenrollamiento negativo introducido de forma local y temporal por la transcripción activa el inicio de la replicación al facilitar la apertura de la doble hélice de la región termodinámicamente inestable de los trecémeros (6, 33, 69, 80, 81, 83, 189, 228).

El papel de la transcripción en el inicio de la replicación en *oriC* es complejo (Fig. 3). Adyacente a *oriC* por la derecha se encuentra el gen *mioC* que codifica una proteína de función desconocida. La transcripción que se inicia en el promotor de *mioC* se dirige hacia *oriC* y aunque la mayoría de los transcritos lo atraviesan (271, 312) algunos de ellos terminan dentro de *oriC*, localizados en los lugares de transición de la síntesis de RNA a DNA (185), lo que sugirió la posibilidad de su uso como cebadores de la síntesis de DNA (299), sin embargo esta transcripción es dispensable. El promotor de *mioC* contiene la secuencia para la unión específica de la proteína DnaA y la transcripción que se inicia en él es regulada negativamente por DnaA *in vivo* (224, 377) e *in vitro* (271). La transcripción desde *mioC* incrementa el número de copias de minicromosomas

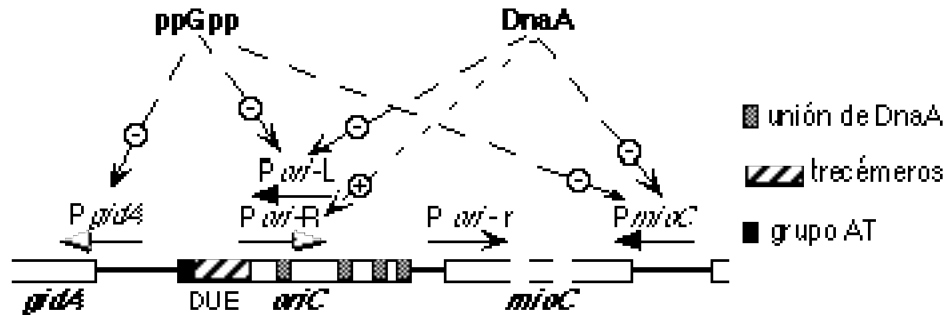


Figura 3. Regulación de la transcripción en la región de *oriC*

(224, 337), aunque no es esencial para su mantenimiento (225, 369). En el lado izquierdo de *oriC* se localiza el gen *gidA* que codifica una proteína que no tiene una función asignada y parece no ser esencial (369). La transcripción de este gen comienza a la izquierda de *oriC* y procede alejándose de él (367). Se ha demostrado que la transcripción que se inicia en este promotor ejerce un efecto estimulador sobre la iniciación de *oriC* en minicromosomas (5, 6, 276) y que la transcripción de *gidA*, acoplada con la transcripción de *mioC*, activa el inicio de la replicación en minicromosomas (276). Los promotores de *mioC* y de *gidA* están bajo el control restringido y ambas transcripciones son inhibidas *in vitro* por ppGpp (276, 299).

A la derecha de *oriC* está identificado el promotor *Pori-r*, cuya transcripción se dirige hacia la derecha (226). Dentro del origen de replicación se han detectado otros inicios de transcripción hacia la izquierda y hacia la derecha de *oriC*. La transcripción hacia la izquierda corresponde a *Pori-L* (5, 226, 271, 312), es reprimida por *DnaA* *in vivo* (5) e *in vitro* (271) y regulada por ppGpp. Hacia la derecha existen varios transcritos, I, III y IV, entre los que el transcrito I es el más abundante y se sintetiza en cantidades similares al transcrito de *gidA*, y corresponden a la transcripción desde *Pori-R* que se inicia en el límite derecho de la región de los trecémeros (5, 164). Aunque las secuencias de unión de *DnaA* a *oriC* se localizan a la derecha del lugar del comienzo de esta transcripción se ha encontrado que estos 3 transcritos son activados por *DnaA* (5).

Se ha demostrado que la transcripción desde el promotor de *gidA* activa el origen en minicromosomas sólo cuando procede hacia fuera de *oriC* y no cuando procede en el sentido opuesto, es decir sólo en la dirección de transcripción en que la polimerasa introduce superenrollamiento negativo en la zona rica en AT

(6). Esto lleva a sugerir que la transcripción que se dirige hacia esa zona de *oriC*, desde el promotor de *mioC* y de *ori-L*, inhibe la apertura de la doble hélice en el DUE y reduce la frecuencia de iniciación de la replicación, lo que explicaría la existencia de la secuencia de unión a DnaA en el promotor de *mioC* y la represión de la síntesis de estos dos transcritos por esta proteína. La acción combinada de la transcripción de *gidA* y la síntesis del transcrito I podría generar superenrollamiento negativo en la zona rica en AT de *oriC*. Esta transcripción activaría la iniciación de la replicación facilitando la acción de la proteína DnaA en la apertura de la doble hélice de la región de los trecémeros. Se ha propuesto que la función de la síntesis de los transcritos III y IV sería reducir el nivel de superenrollamiento positivo generando un superenrollamiento negativo delante del avance de la RNA polimerasa para la síntesis del transcrito I, ya que la reducción de la tensión de la superhélice es necesaria para la posterior traslocación de la RNA polimerasa (5). Se ha sugerido que los transcritos que proveen la activación transcripcional en *oriC* pueden representar el paso sensible a la rifampicina en la iniciación en *oriC* (225).

Por tanto, para conseguir las condiciones óptimas para el inicio de la replicación, la transcripción desde *PmioC* y *Pori-L* debería ser reprimida al mismo tiempo que la síntesis de transcritos desde *Pori-R* y *PgidA* es activada, como ha sido determinado recientemente (344). La estructura creada en *oriC* por la unión de la proteína DnaA puede llevar a la activación de la transcripción desde *Pori-R* y a la represión de la transcripción desde *PmioC* y *Pori-L* al mismo tiempo, posiblemente para alcanzar el nivel favorable para la iniciación, por lo que el nivel de transcripción regulado por DnaA parece ser un factor crítico en la regulación de la iniciación. El control restringido de los promotores *PmioC* y *PgidA* puede ser también un mecanismo implicado *in vivo* en el control de la iniciación de la replicación cromosómica de *E. coli*, ya que la regulación de la síntesis de RNA desde estos promotores podría acoplar la frecuencia de inicios a la velocidad de crecimiento.

1.3.2.4. DnaA

La proteína DnaA es considerada por muchos autores como el factor llave del proceso de iniciación (122, 380). Esta proteína sólo es dispensable en células donde la replicación es iniciada desde lugares cromosómicos distintos a *oriC* (181, 182) o desde algún replicón inserto en el cromosoma (27).

La síntesis de la proteína DnaA, está regulada por dos promotores P1 y P2. El promotor P2 es el promotor desde el que el gen se transcribe mayoritariamente y

P1 es un promotor constitutivo (55, 192, 292). No existe una correlación clara entre producción de DnaA y velocidad de crecimiento, sino que parece ser dependiente de la estirpe que se analice; mientras que en algunos casos la cantidad de DnaA relativa a la de proteína total incrementa al aumentar la velocidad de crecimiento (54), en otros la concentración de la proteína DnaA permanece constante en un amplio rango de velocidades de crecimiento (123). Ambos promotores, pero especialmente P2, parecen estar bajo control restringido aunque puede existir otro mecanismo de regulación de la expresión de *dnaA* independiente de ppGpp (55). Luego esta regulación de la proteína de iniciación DnaA por la velocidad de crecimiento a través de ppGpp sería un modo de coordinar la replicación con el crecimiento celular. Localizado entre P1 y P2 se encuentra un sitio de unión de DnaA (121). La propuesta autorregulación de la síntesis de la proteína DnaA tampoco está clara. El exceso de la proteína bloquea la transcripción de *dnaA in vivo* e *in vitro* (8, 37, 192, 377) y en mutantes *dnaA* termosensibles a alta temperatura y cuando secuencias extras de reconocimiento de esta proteína son introducidas en las células ambos promotores parecen ser desreprimidos (8, 37, 192), lo que indica que el gen es autorregulado. Sin embargo, los estudios realizados a concentraciones fisiológicas parecen dar resultados contradictorios (8, 37) y mutaciones puntuales de la secuencia reconocida por DnaA muestran que, cuando ambos promotores están presentes, P1 puede ser reprimido por DnaA pero el promotor más fuerte, P2, no lo es (292).

Se ha estudiado el efecto de la expresión controlada de la proteína DnaA a distintos niveles sobre la replicación cromosómica. Niveles de DnaA inferiores al fisiológico conducen al incremento de la masa de iniciación y niveles superiores al fisiológico, incluso de hasta 5 veces mayores, adelantan el momento de iniciación dentro del ciclo, reduciendo la masa de iniciación e incrementando el periodo C, de forma que la concentración de DNA por célula y por masa no varía (223). Recientemente se ha establecido la correlación más precisa entre el incremento de la concentración de DnaA, en el rango desde el nivel fisiológico hasta 4 veces superior, y la regulación de la replicación cromosómica y se ha observado que diferentes intervalos del incremento de la concentración de DnaA inducen diferentes condiciones de replicación (9). El incremento de hasta 1,5 veces la concentración de DnaA lleva a aproximadamente un aumento proporcional de la concentración de orígenes y de DNA por masa; el incremento entre 1,5 y 3 veces conduce al aumento en la concentración de orígenes, mientras que la relación DNA/masa permanece constante al disminuir la velocidad de replicación, especialmente en la zona cercana al origen e incrementos superiores de la concentración de DnaA no conducen al aumento de orígenes/masa. Por lo tanto aunque la masa de iniciación, o el momento de la iniciación dentro del ciclo,

puede ser determinada por la concentración de DnaA desde su nivel fisiológico, o menor, hasta aproximadamente un nivel del doble, el incremento superior no conduce al aumento de la concentración de DNA sino al alargamiento del periodo C. Estos resultados indican que esta proteína es un factor requerido para la iniciación pero que debe existir otro factor limitante que genere la señal cíclica de la iniciación cuando DnaA se encuentra en exceso.

La variación de la concentración de DnaA hasta un nivel 3 veces superior al fisiológico no altera significativamente la sincronía de las iniciaciones dentro de la célula, aunque la sincronía es afectada con niveles superiores (9, 223).

Aunque los datos que se conocen sobre DnaA, referentes a la regulación de su síntesis y sus efectos sobre la replicación, son controvertidos, el hecho de su intervención en la primera etapa del inicio de la replicación ha llevado a formular modelos de control basados en la idea de que DnaA es el mayor, o quizá el único, determinante de la actividad cíclica de la iniciación. Los modelos propuestos por J. M. Mahaffey y J. W. Zyskind (237) y por F. G. Hansen et al. (120) asumen que la iniciación tiene lugar tras la acumulación de un cierto número de monómeros de DnaA en *oriC*, y tras el inicio al reducirse la relación DnaA/*oriC* a la mitad da comienzo un nuevo ciclo. El hecho de intentar explicar la actuación de DnaA en *oriC* argumentando un modelo positivo de control de la iniciación constituye un polémico tema en la actualidad sobre el control de la replicación cromosómica en *E. coli* y da lugar a la consideración de otros modelos alternativos que, apoyados en hechos experimentales, supongan una alternativa a los propuestos.

1.3.2.5. PinO

La inhibición de la síntesis de proteínas de un cultivo bacteriano, mediante la carencia de aminoácidos requeridos o por tratamiento con cloranfenicol, impide los inicios de nuevas rondas de replicación permitiendo que los procesos de elongación y terminación de las ya iniciadas continúen (206, 233, 294, 324).

Los resultados obtenidos por Guzmán et al. (117) descritos en el apartado 1.3.2.1 de esta introducción sugieren que la respuesta restringida inducida por la carencia de aminoácidos en estirpes silvestres podría inhibir la iniciación incluso sin ser requerida la síntesis de proteínas. La carencia de isoleucina, a diferencia de los resultados obtenidos tras la carencia de otros aminoácidos o la adición de cloranfenicol, no inhibe la replicación en estirpes relajadas, aunque sí en estirpes silvestres, debido a la inducción de la respuesta restringida. Estos resultados indican que es necesaria la síntesis de proteína(s) para iniciar la replicación y que la(s) proteína(s) cuya síntesis es requerida no contiene(n) isoleucina.

El análisis de la síntesis de proteínas en estirpes silvestres y relajadas tras la carencia de isoleucina mediante electroforesis mostró que una única banda de proteína, de aproximadamente 11 kDa, era sintetizada y sólo en las estirpes Rel⁻. La búsqueda en el banco de datos de EMBL de una proteína que se ajustara a las características encontradas, no contener isoleucina y tener un peso molecular aproximado a 11 kDa, llevó a localizar una secuencia de lectura, en el minuto 73 del mapa genético de *E. coli* (118), que de traducirse sintetizaría un polipéptido de 11,6 kDa, sin isoleucina y cuya secuencia promotora estaría bajo control restringido por ppGpp, por lo que sólo se sintetizaría tras la carencia de isoleucina en las estirpes relajadas. Esta proteína ha sido denominada **PinO** (proteína de iniciación en *oriC*) (115,118).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de esta proteína reveló una similitud con las calmodulinas de eucariontes(173.a) y la proteína similar a calmodulinas encontrada en *B. subtilis* (87.a). La posibilidad de que esta proteína pueda unir calcio implica un probable papel del calcio en la regulación de la replicación cromosómica extendiendo a bacterias la función reguladora del calcio en el ciclo celular de eucariontes . La posibilidad del calcio como elemento regulador del ciclo celular en bacterias está siendo discutida actualmente. La existencia de un paralelismo de los elementos que intervienen en el control del ciclo celular de eucariontes es sugerida en las células bacterianas y se propone la existencia de un citoesqueleto proteico que sería regulado por la acción de kinasas activadas por flujos de calcio celulares mediados por calmodulinas (268, 269).

La proteína PinO parece ser, por tanto, la única cuya síntesis *de novo* es requerida para el inicio de la replicación en *oriC*. Actualmente se está estudiando su requerimiento en la iniciación y su propiedad de unión a calcio.

1.3.2.6. Asociación de *oriC* a la membrana celular

El mecanismo que controla el inicio de la replicación debe asegurar que todos los orígenes presentes en una célula inicien una vez, y sólo una vez, en cada ciclo celular, de forma que tras la división celular las dos células originadas posean un contenido genético igual a la célula de la que proceden. Por lo tanto debe existir un elemento de control que impida que los orígenes que han iniciado la replicación en un ciclo puedan volver a hacerlo antes de que tenga lugar la siguiente división celular.

En *E. coli* la metilasa Dam cataliza la transferencia de un grupo metilo desde S-adenosil-metionina al grupo amino N6 de la adenina en la secuencia 5'-GATC-

3' tras la síntesis de una nueva cadena de DNA (96), secuencia que *oriC* contiene estadísticamente en un número alto (248, 280). El estado de hemimetilación de los orígenes tras el inicio de la replicación es utilizado por la célula para discriminar entre un origen antes de la replicación de otro recientemente replicado y poder así limitar el número de iniciaciones a una por origen y por ciclo. *oriC* no puede ser iniciado cuando está hemimetilado, mientras que el estado de no metilación del DNA que se da en mutantes *Dam*⁻ no impide la iniciación (241, 302). Este mecanismo implica que el tiempo de interiniciación puede ser explicado parcialmente por la tasa de remetilación; como ha sido propuesto recientemente, al tiempo requerido para la metilación del origen se puede sumar el tiempo requerido para acabar la transcripción de *mioC* para dar cuenta del intervalo total entre sucesivas iniciaciones (344).

Cuando dos o más copias de *oriC* están presentes en una célula todos los orígenes son iniciados simultáneamente (324). El grado de sincronía depende estrechamente del nivel de DNA adenina metiltransferasa cuando es controlado exógenamente y esta sincronía se pierde en las células que carecen de la actividad metilasa (19, 32, 230).

Estudios realizados de la cinética de remetilación en cultivos sincrónicos muestran que la persistencia del estado hemimetilado del DNA en *oriC* tras la iniciación es debida a la inaccesibilidad de esta región (45). Las secuencias GATC de otros lugares del genoma son inmediatamente metiladas tras su replicación, en 1 o 2 minutos, mientras que las secuencias analizadas de *oriC* permanecen hemimetiladas durante un tiempo que varía coordinadamente con la longitud del ciclo celular. El tiempo requerido para la remetilación de estas secuencias en *oriC* es del 30% al 40% del tiempo de un ciclo celular, independientemente de la velocidad de crecimiento y tras este tiempo son metiladas (45, 277).

En contraste con la inhibición *in vivo* del inicio en orígenes hemimetilados, se encontró que estos eran buenos sustratos para la iniciación *in vitro*, lo que implica que debe existir un factor, no presente en los ensayos *in vitro*, que específicamente inhiba la iniciación de los *oriC* hemimetilados (30, 202). Este factor, no identificado aún, se localiza o en una fracción de la membrana externa que presenta alta afinidad por el DNA de *oriC* hemimetilado y que inhibe su iniciación *in vitro* (201, 277), o recientemente ha sido localizada una fracción, diferente a la de la membrana interna y externa con una actividad de unión a *oriC* hemimetilado unas 5 veces superior a la de la fracción de membrana externa, y cuya localización exacta no se ha establecido (53).

La formación cíclica del complejo *oriC*-membrana externa ha sido verificada *in vivo* experimentalmente, y se ha mostrado que no sólo *oriC* hemimetilado puede unirse a la membrana, sino que la región de *oriC* puede formar el complejo antes de replicarse, ya que el complejo *oriC*-membrana se detectó en las células justo antes de la iniciación y su cantidad alcanzó el máximo valor en el momento de la iniciación (95). La unión periódica de *oriC* a la membrana externa parece ser un proceso demasiado complejo, y podría no ser la situación que se da *in vivo*, y que en células intactas el sitio de unión de *oriC* a la envuelta celular sea la fracción de membrana no localizada (53); alternativamente esta asociación podría tener lugar en las estructuras denominadas anillos periseptales (31, 377). Estos datos sugieren que la frecuencia de iniciación de la replicación cromosómica podría estar regulada por un mecanismo biológico que dirija la formación y degradación del complejo de *oriC* con la membrana.

En la formación del complejo *oriC*-membrana y su influencia sobre la regulación de la iniciación se ha atribuido también un papel a la función de DnaA. Se ha encontrado que esta fracción de membrana inhibe la iniciación de *oriC* hemimetilado *in vitro* solamente cuando es añadida al sistema antes de la proteína DnaA, lo que indica que su función es retrasar el acceso de DnaA a *oriC* (201). El nivel de la proteína DnaA depende también del nivel de la metilasa Dam, pero esto no tiene ningún efecto sobre el grado de sincronía de la iniciación (32). En la región promotora P2 de *dnaA* se ha localizado una secuencia GATC que presenta una cinética de remetilación similar a la de *oriC*; dado que la metilación de esta secuencia activa la transcripción de la proteína, la expresión de *dnaA* se reduce tras la replicación de su gen (35, 45). Esta regulación de la expresión de DnaA por la hemimetilación puede explicar que la bajada de su actividad sugerida tras el inicio de la replicación se mantenga a un bajo nivel durante el 30% al 40% del periodo de un ciclo celular (237). Esta represión transitoria de la proteína DnaA ayudaría a prevenir iniciaciones prematuras. Esto implica que tanto la función de *oriC* como la síntesis de DnaA están sujetos a la regulación temporal y negativa de la unión a membrana tras el inicio de la replicación.

El concepto de la unión del cromosoma a la membrana celular ha sido discutido desde la aparición de la hipótesis del replicón, originalmente descrito para explicar la segregación cromosómica (154). Los datos presentados en este apartado han sido utilizados por varios autores en modelos de control negativos del inicio de replicación que intentan explicar el mecanismo que impide reiniciaciones prematuras de orígenes y también el mecanismo que asegura la correcta segregación de los cromosomas unidos a la membrana antes de la división (34, 45, 95, 201, 267). Que los orígenes estén en el citoplasma (31, 45,

201) o unidos a membrana en el momento de la iniciación (95) no está claro, pero no afecta al mecanismo de control propuesto para evitar las reiniciaciones prematuras. Sin embargo si antes del inicio el cromosoma se une a la membrana esto sugiere que debe existir un factor que tenga afinidad por el DNA metilado que localice a *oriC* en la membrana antes del inicio y sería su mecanismo de acción el que determinaría el momento de la iniciación dentro del ciclo (95).

1.3.3. Replicación estable

La replicación cromosómica en *E. coli* se inicia en condiciones normales en un único lugar, *oriC*, y depende de la interacción específica entre *oriC* y la proteína *DnaA*; esta iniciación requiere la actividad de la RNA polimerasa y la síntesis de proteínas *de novo* (apartados anteriores de esta Introducción). Sin embargo, se pueden observar sucesivos ciclos de replicación en ausencia de síntesis de proteínas bajo ciertas circunstancias. Este tipo de replicación ha sido descrita por T. Kogoma (178, 179), y es el modo alternativo que presentan los mutantes *rnh*, defectivos en la actividad de la enzima RNasa HI, y que también puede ser inducida en estirpes silvestres, por tratamientos que dañan al DNA o que temporalmente inhiben la replicación o por desequilibrios fisiológicos tales como un cambio rápido de medio mínimo a medio rico, y han sido denominados **replicación estable constitutiva** (176, 273) y **replicación estable inducida** (183) respectivamente.

En los mutantes *rnh* la síntesis de DNA continúa tras la adición de cloranfenicol durante varios ciclos de replicación aunque con una velocidad de síntesis reducida. Tras la carencia de aminoácidos este modo de iniciación es inhibido en estirpes restringidas, *Rel*⁺, pero no en mutantes *relA1*, lo que indica su sensibilidad a ppGpp y sugiere la regulación de esta replicación por el acoplamiento a la biosíntesis ribosómica (368). Esta replicación requiere la actividad de la RNA polimerasa y es independiente de la replicación desde *oriC* ya que el mutante *rnh* permite la inactivación de *dnaA* y la delección de *oriC*, letal en estirpes *Rnh*⁺ (181). La replicación estable, tanto la constitutiva como la inducible, presenta el requerimiento de la proteína RecA. En un mutante *rnh* la replicación estable no tiene lugar cuando RecA es inactivada, sin llegar a ser letal, sin embargo la proteína RecA llega a ser esencial para la síntesis de DNA y la viabilidad celular cuando el mutante *rnh* no puede utilizar *oriC* para iniciar la replicación (180, 182, 353). Se han localizado al menos cuatro lugares cromosómicos desde donde puede ser iniciada la replicación en ausencia de RNasa HI y de *oriC*, que se han denominado colectivamente ***oriK*** y se localizan

en los minutos 30,5, 32,5, 95 y 45 y probablemente en los alrededores del 20 en el mapa genético de *E. coli*. Cuando en el mutante *rnh* está presente *oriC* la replicación se inicia mayoritariamente en esta secuencia pero se observa también en una frecuencia mayor de la esperada para los anteriores marcadores funcionando ambos sistemas de replicación en paralelo (243, 368). Por lo tanto los mutantes *rnh* no son defectivos para el sistema normal de replicación, sino que permiten la expresión de mecanismos alternativos (144). Los inicios desde *oriK* son al azar tanto con respecto al tiempo como a la localización del origen, por lo que masa celular a la que inician y la distribución de DNA es muy heterogénea (368).

La replicación estable constitutiva permite, en ausencia del sistema de replicación normal, una velocidad de crecimiento reducida en un 30 al 40% y una concentración de DNA por célula de aproximadamente la mitad (368). Otro fenotipo de los mutantes *rnh* es la sensibilidad a medio rico (*Smr*⁻) a 30°C asociado con la mutación (352), probablemente debida a la imposibilidad de acoplar su velocidad de replicación a la velocidad de crecimiento rápida impuesta por el medio rico.

El modelo descrito para el inicio de la replicación estable constitutiva se basa en la interacción de la proteína RecA con un transcrito, producto de la actividad de la RNA polimerasa, que lleva a la formación de un híbrido RNA-DNA en ausencia de la RNasa HI en los sitios *oriK*. Es posible que la formación RNA-DNA desplace a una cadena sencilla de DNA y que su estabilización por RecA provea la estructura para que tenga lugar la iniciación (46, 180, 368).

En células de estirpes silvestres inducidas a expresar la respuesta SOS se lleva a cabo la replicación estable inducida como una respuesta SOS (178). Esta replicación es más resistente a la luz UV que la replicación normal (183) y parece ser mutagénica (205). Esta replicación no requiere la actividad de transcripción de la RNA polimerasa (235). La replicación estable inducida requiere la forma activa de la proteína RecA (387) y se ha demostrado que la desrepresión del gen *recA* y la activación de la proteína RecA son las condiciones necesarias y suficientes para la inducción de la replicación estable inducida (236). Esta replicación presenta también el requerimiento de la actividad recombinasa de RecA y para esta inducción es esencial la actividad helicasa de RecBCD (236). Tras la inducción de esta replicación los inicios tienen lugar mayoritariamente en la región de *oriC*, en ausencia de transcripción y traducción y sin requerir la participación de la proteína DnaA, y en la región del término; cuando *oriC* está deletado se

observa la activación de otros sitios, minutos 70 y 100, además del de la región del término.

El modelo propuesto para el mecanismo de iniciación de la replicación estable inducida sugiere que la respuesta SOS induce alguna proteína que reconoce los orígenes para la replicación estable inducida e introduce en estos lugares, o en sus proximidades, un corte en ambas cadenas de DNA. La enzima RecBCD unida a los extremos producidos en la molécula puede desenrollar la doble hélice y generar cadenas sencillas. Los extremos 3'-OH de las cadenas sencillas de DNA pueden invadir regiones homólogas de otra molécula circular por acción de la proteína RecA, generando una estructura en lazo de DNA (327, 366) que puede no ser sólo utilizada en recombinación sino también como lugar de inicio de la replicación. La replicación de la molécula circular podría ser iniciada utilizando los extremos 3'-OH de las cadenas sencillas como cebadores. El producto final de esta replicación son moléculas circulares covalentemente cerradas replicadas de forma semiconservativa (5.a). La resolución de la estructura del lazo de DNA se llevaría a cabo por una endonucleasa u otros modos alternativos de resolución (5.a).

El prerrequisito de la apertura de la doble hélice de DNA para el inicio de replicación estable puede ser generado por distintos mecanismos. La apertura en *oriC* durante el inicio de la replicación normal se lleva a cabo mediante la acción de DnaA y el proceso de transcripción que altera la estructura de la superhélice. La replicación estable constitutiva consigue esta estructura estabilizando los híbridos RNA-DNA, generados fuera de *oriC* en ausencia de RNasa HI y estabilizadas por RecA, y en la replicación estable inducida por la formación de estructuras híbridas DNA-DNA.

Aunque ambos tipos de replicación estable pueden ser caracterizados por su independencia de la síntesis continua de proteínas para la iniciación y el requerimiento de la proteína RecA funcional para llevar a cabo la replicación, las diferencias encontradas en las características de los dos modos de replicación estable sugieren que estas dos actividades de replicación, aparentemente similares, se establecen como modos alternativos de replicación por distintos tipos de alteraciones del sistema normal de replicación de *E. coli*. No se puede considerar a la replicación estable constitutiva como la expresión por mutación de un sistema inducible de replicación. La alteración que conduce a la replicación estable constitutiva parece ser debida a la estructura de la molécula de DNA, por ausencia de RNasa HI que estabiliza híbridos RNA-DNA, y no a cambios de la maquinaria de replicación necesariamente. El establecimiento de la replicación

estable inducida parece ser debido a cambios en la estructura del complejo de replicación, siendo probablemente responsable RecA directa o indirectamente. Mientras que es posible que la replicación estable constitutiva pueda ser un artefacto genético manifestado en ausencia de RNasa HI, eliminando la especificidad de la replicación desde *oriC*, o corresponder a un sistema primitivo de replicación, la replicación estable inducida puede representar un sistema alternativo de replicación del sistema *oriC dnaA* dependiente (177).

2. RESPUESTA DE *Escherichia coli* A LA TEMPERATURA

2.1. METABOLISMO CELULAR

La respuesta de *Escherichia coli* a las condiciones físicas de su entorno ha llevado a clasificarla como una bacteria mesófila con respecto a su temperatura de crecimiento (330). Puede mantener un crecimiento equilibrado entre aproximadamente 10°C y 49°C, dependiendo de los nutrientes presentes en el medio. En el rango entre 20°C y 37°C la velocidad de crecimiento varía en función de la temperatura siguiendo una sencilla ecuación (modificada de la de Arrhenius) y ha sido definido como el **rango normal o de Arrhenius** (151). Dentro de este rango los cambios de temperatura llevan a un ajuste casi instantáneo a la velocidad de crecimiento característica de la nueva temperatura sin tener lugar cambios importantes en la composición celular (131, 211, 261).

Aunque la composición macromolecular durante el crecimiento exponencial a diferentes temperaturas fisiológicas permanece inalterada, las subidas o bajadas rápidas de la temperatura de crecimiento se acompañan en los primeros minutos de grandes cambios de la tasa de síntesis de proteínas, RNA y de lípidos de membrana en *E. coli* (211, revisado en 261). En general, cuanto mayor es el cambio de temperatura mayor es la respuesta celular (211). Los cambios desde el rango normal a temperatura baja causan normalmente periodos de retraso del crecimiento seguidos por un periodo de crecimiento rápido antes de ajustarse a las nuevas características. Sin embargo, tras el cambio a temperatura alta las inducciones y represiones transitorias de la tasa de síntesis de las diferentes macromoléculas ajustan el contenido celular rápidamente a los nuevos niveles basales, mayores o menores a los anteriores al cambio (261).

En la modulación de la composición celular tras un cambio a temperatura alta o baja está implicada la alteración del control de la síntesis de RNA. La actividad y especificidad de la RNA polimerasa en estas condiciones depende de factores asociados directamente al cambio de temperatura y de los niveles de ppGpp (163, 234, 303, 304). Inmediatamente tras el cambio a temperatura alta o baja la tasa de síntesis de RNA incrementa o decrece, respectivamente, debido al efecto directo de la temperatura sobre la velocidad del proceso. Posteriormente se produce un cambio en la tasa de síntesis de RNA total que se correlaciona inversamente con el cambio del contenido de ppGpp en función del cambio de temperatura, dependiente de las actividades de las ppGpp sintetasas I y II. El contenido celular de ppGpp aumenta tras una subida de la temperatura y las células muestran síntomas de carencia de aminoácidos e, inversamente, disminuye al bajar la temperatura y el patrón de la síntesis de proteínas en estas condiciones es semejante al que sigue al cambio de nutrientes que incrementan la velocidad de crecimiento. Esta respuesta es más rápida y pronunciada en las estirpes silvestres pero claramente existe una regulación de la síntesis de ppGpp en función del cambio de temperatura independiente de *relA* (234). La regulación por ppGpp de los niveles de transcripción durante los cambios de temperatura hace posible el ajuste de la tasa de síntesis de RNA tras un cambio de temperatura a los nuevos niveles de RNA y específicamente al tipo de RNA transcrito. La variación del contenido de ppGpp tras los cambios de temperatura también tendrá un efecto regulador sobre la replicación, debido a la función inhibidora de ppGpp en la iniciación (117, 214, 232, 381).

La modulación de la fluidez de la membrana es otro de los parámetros que debe ser controlado en función de la temperatura (revisado en 152). La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana cambia marcadamente en función de la temperatura a la que son sintetizados, aumentando la fracción de ácidos grasos insaturados al disminuir la temperatura, y tras cambios de temperatura la regulación de su síntesis es muy rápida para adaptarse a las nuevas condiciones. El mantenimiento de la fluidez de membrana es un factor requerido para un funcionamiento normal que puede llegar a ser crítico para el crecimiento y la supervivencia celulares; la alteración de la composición de fosfolípidos de membrana que afecta a la fluidez puede llegar a detener el crecimiento celular por impedir el inicio de la replicación. En la interacción de la proteína DnaA con los fosfolípidos de membrana se ha observado que la liberación del ADP fuertemente unido a DnaA es llevado a cabo por ciertos fosfolípidos de membrana y este proceso es facilitado al aumentar la fluidez de membrana, alterando su composición o por el aumento de temperatura, lo que favorece la unión de DnaA a ATP para su función en la iniciación (317, 398). Aún cuando la cantidad de

DnaA relativa al total de proteínas disminuye 6 veces al aumentar la temperatura de 30°C a 42°C (32), es en esta variación de temperatura donde su activación es mayor.

El efecto de la temperatura sobre el contenido en proteínas dentro del rango normal de temperatura es inapreciable. Sin embargo, durante el crecimiento equilibrado a temperaturas extremas, 13°C o 46°C, en general las proteínas relacionadas con los procesos de transcripción o traducción y bajo control restringido están presentes a niveles reducidos y las proteínas que participan en el metabolismo energético presentan la respuesta contraria y se encuentran en niveles elevados (131). Tras un cambio de temperatura hay un gradiente de respuesta en la síntesis de proteínas, algunas son hiperinducidas transitoriamente y de otras es inhibida su síntesis (211). Entre las proteínas que son hiperinducidas por el cambio a alta temperatura se encuentran las **proteínas de choque térmico**.

2.2. LA RESPUESTA DE CHOQUE TERMICO

Las células de *E. coli* responden a una subida rápida de la temperatura de crecimiento, de 30°C a 42°C, induciendo la síntesis de un conjunto de proteínas, conocidas como las proteínas de choque térmico de *E. coli* (212, 395). La velocidad de síntesis de estas proteínas aumenta rápidamente, puede ser desde 3 a 4 veces hasta 100 veces más rápida que la de 30°C, se alcanza el máximo nivel entre los 5 a 10 minutos tras el aumento de temperatura y posteriormente disminuye y se estabiliza en un nuevo nivel, dos o tres veces mayor que a 30°C. La magnitud de la respuesta y su duración dependen del rango de la subida de temperatura (212, 395).

La inducción de la síntesis de las proteínas de choque térmico se lleva a cabo primariamente a nivel de transcripción. Esta transcripción es regulada por la subunidad σ^{32} de la RNA polimerasa, el producto del gen *rpoH*, que reconoce la secuencia consenso -35:TCTCNCCCTTGAA -10:CCCCATNTA de los promotores de los genes de choque térmico (51, 111, 200, 343, 402). La subunidad σ^{32} no sólo es esencial para la transcripción desde los promotores de choque térmico, sino que está activamente implicada en la regulación de la respuesta de choque térmico (110, 333). Esta respuesta es modulada también por un mecanismo de autorregulación, a través de algunas proteínas de choque térmico que regulan negativamente la tasa de síntesis de todas la proteínas de choque térmico mediante su unión a σ^{32} (52, 94, 216, 349).

La respuesta de choque térmico es el mecanismo celular conocido más universal, desde bacterias al hombre, y las proteínas de choque térmico o proteínas de estrés las evolutivamente más conservadas. Ha sido sugerido recientemente que los mecanismos celulares que detectan la subida de temperatura pueden también estar conservados (52, 97, 220, 270, 313, 399).

Se ha observado en *E. coli* una regulación en la dirección opuesta, es decir tras la bajada de temperatura de incubación (342). Se ha encontrado que un cambio de temperatura desde 37°C a 24°C reprime marcadamente la síntesis de las proteínas de choque térmico mayoritarias. Esta represión es transitoria y tras 60 u 80 minutos se ajusta a un nuevo nivel. Esta regulación denominada **respuesta de choque térmico inversa** se realiza a nivel de transcripción por un mecanismo diferente que implica la inactivación de σ^{32} por la bajada de temperatura (336, 342).

2.2.1. Las proteínas de choque térmico

Los más de 20 genes cuya expresión es controlada por σ^{32} se encuentran distribuidos por todo el cromosoma de *E. coli* y se expresan coordinada y simultáneamente, constituyendo una unidad funcional que ha sido definida como **regulón de choque térmico** (261). Recientemente han sido caracterizados 26 nuevos genes cuya expresión se induce en respuesta al choque térmico en *E. coli*, que podrían formar parte de este regulón (56.a).

La mayoría de las proteínas de choque térmico se sintetizan continuamente a temperatura baja; durante la respuesta de choque térmico su tasa de síntesis aumenta, mientras que la mayoría de las proteínas de *E. coli* se sintetizan a una tasa más reducida (98, 261). Las proteínas sintetizadas por este regulón tienen funciones vitales en el metabolismo, tanto de las células no estresadas como tras el estrés. Parecen estar implicadas en todos los procesos relacionados con el crecimiento celular: síntesis de DNA, transcripción y traducción; plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas; división celular y en la funcionalidad de las membranas (42, 43, 77, 284). En situaciones de choque térmico estas proteínas intervienen en estos procesos actuando como carabinas que protegen a las proteínas de la desnaturalización térmica, o como proteasas, que degradan las proteínas dañadas en la célula.

La correlación establecida entre la expresión de las proteínas de choque térmico y la capacidad de *E. coli* para sobrevivir a temperaturas letales o **termotolerancia** (394) se ha mostrado en estudios posteriores no ser cierta e incluso mutantes que

no inducen la respuesta de choque térmico pueden desarrollar el mecanismo para la termotolerancia (60, 158, 362). En este sentido, se ha identificado un conjunto de genes, *htrA*, *htrC* y *htrM*, que requiere alta temperatura para su expresión y no es dependiente necesariamente de σ^{32} , que podría contribuir a la termotolerancia observada a 50°C (221, 296, 297).

2.2.1.1. Carabinas

Para asegurar, en contraste con la hipótesis del autoensamblaje (2), el correcto plegamiento, oligomerización y transporte de proteínas en la célula se ha propuesto el mecanismo molecular que desarrollan un conjunto de proteínas colectivamente denominadas **carabinas**. Este término define a una familia de diferentes clases de proteínas no relacionadas que median el correcto ensamblaje de otros polipéptidos, sin modificarlos covalentemente, y que no son componentes funcionales de las estructuras una vez ensambladas (72). Estas proteínas actúan generalmente formando complejos en los que la **carabina principal** es la que se une a la cadena del polipéptido naciente, no plegado o mal plegado o a agregados del polipéptido, y las **carabinas auxiliares** aumentan la eficacia y aseguran el reciclamiento de la carabina principal mediante su interacción funcional. Algunas carabinas, aunque no todas, son proteínas antiestrés y es posible que todas las proteínas antiestrés actúen como carabinas (para una revisión consultar 73).

Entre las proteínas de choque térmico de *E. coli* que actúan como carabinas se encuentran GroEL y GroES en la clase **Hsp60**, las proteínas DnaK, DnaJ y GrpE que forman la clase **Hsp70** y HtpG en la clase de carabinas **Hsp90**.

GroEL y **GroES** fueron originalmente identificadas por su requerimiento para los ensamblajes de los bacteriófagos λ , T4 y T5 (87, 349.a). Los genes *groEL* y *groES* constituyen un único operón cuya transcripción es regulada desde dos promotores, el más activo reconocido por σ^{32} y otro, utilizado en condiciones fisiológicas normales, reconocido por σ^{70} (51, 402). GroEL y GroES son esenciales para el crecimiento a todas las temperaturas (77), siendo GroEL una de las proteínas más abundantes en *E. coli* (132). El complejo formado por estas proteínas consiste en 14 subunidades de GroEL y 7 de GroES. GroEL promueve el correcto plegamiento de proteínas así como la asociación de oligómeros (73, 217). GroES ayuda al correcto y preciso reciclaje de GroEL modulando su actividad ATPásica (97).

En la fisiología celular de *E. coli*, GroEL y GroES están implicadas en el control de la división (254), en procesos de mutagénesis inducidos por luz UV

(64), en el transporte de algunas proteínas al exterior (196, 289), interaccionan con la RNA polimerasa (371) y suprimen mutantes en la proteína SSB (300). La sobreproducción de estas proteínas permite el crecimiento de mutantes con el gen *rpoH* delecionado hasta 40°C (195) y suprime la termosensibilidad de ciertos mutantes en *dnaA*, lo que sugiere que tengan alguna función en la replicación (76, 157, 170). Su intervención en estos procesos puede ser interpretada de forma consistente con el modelo de actuación como carabinas; así en los mutantes *dnaA* estudiados se ha sugerido que la función de estas proteínas es permitir un ensamblaje funcional de DnaA en *oriC* a la temperatura no permisiva (98, 170).

Los genes *dnaK*, *dnaJ* y *grpE* se identificaron porque mutantes en estos genes bloquean la replicación del bacteriófago λ (87, 97, 261, 263). Los genes *dnaK* y *dnaJ* forman un operón que puede ser delecionado con consecuencias fisiológicas muy severas a 30°C, que a temperaturas intermedias frecuentemente conducen a mutaciones secundarias en *rpoH* y que a bajas y altas temperaturas son inviables (42, 43, 44, 278). La proteína DnaK es una de las más abundantes proteínas de *E. coli* en todas las condiciones de crecimiento. Los mutantes en *dnaK* reducen su viabilidad en condiciones de carencia de la fuente de carbono (329) y de estrés osmótico (253). GrpE, cuya síntesis es regulada por σ^{32} y σ^{70} , es esencial para la viabilidad celular a todas las temperaturas y sólo es posible su deleción en ciertos mutantes en *dnaK* (3, 59).

La interacción de estas tres proteínas se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (94, 162, 216). En este complejo la carabina principal, DnaK, es la que se une a los sustratos y su liberación dependiente de ATP es controlada por los cofactores DnaJ y GrpE que estimulan la débil actividad ATPásica de DnaK (97, 217). La proteína DnaJ puede mediar la especificidad de unión de DnaK, ya que DnaJ puede unirse a diferentes sustratos de forma independiente a DnaK (94, 218, 316, 328), y GrpE se cree que facilita la interconversión de DnaK de la forma inactiva a la activa (215). A diferencia de las carabinas de la clase Hsp60, esta clase puede unirse a proteínas desnaturalizadas por calor o dañadas por otros agentes y prevenir su agregación, de forma que las proteínas mantengan su funcionalidad, o una vez que ha ocurrido la agregación de la proteína facilitar su disociación y reactivación (150, 316, 326). Posiblemente en la célula las clases Hsp60 y Hsp70 funcionen sinérgicamente en el procesamiento de los polipéptidos desplegados (203).

Los mutantes en estos genes presentan efectos pleiotrópicos en el metabolismo celular a todas las temperaturas: afectan a la síntesis de DNA durante el inicio de la replicación, a través de la modulación de la actividad de DnaA y otras

proteínas, (85, 150, 238, 306) y RNA (326, 373), la segregación cromosómica, a la replicación y el mantenimiento de plásmidos (43, 74, 101, 328), la división celular (42), la reparación de daños en el DNA (85), la producción de las proteínas de choque térmico (44, 52, 94, 349) y al transporte de proteínas (289). La sobreproducción de DnaK resulta en la inestabilidad de plásmidos y en filamentación celular y cuando se alcanza la fase estacionaria esta sobreproducción llega a tener efectos tóxicos, alteraciones que se suprimen al sobreproducir DnaJ junto con DnaK (28). Estos resultados sugieren que estas proteínas llevan a cabo funciones importantes aún en condiciones de no estrés. Muchos de estos hechos se han explicado ya en base al funcionamiento como carabinas de estas proteínas (28, 94, 97, 150, 289, 326).

La clase Hsp90 ha sido detectada difícilmente en *E. coli* debido a que el gen *htpG* permite ser deletado sin ningún efecto en el crecimiento de fagos y en la fisiología celular (23). La proteína HtpG es una fosfoproteína cuya función como carabina no está muy establecida aún.

En *E. coli* están descritas otros dos sistemas de carabinas: el TF55 que se cree que es similar a GroES y el constituido por la proteína principal SecB y sus auxiliares SecA, SecY y SecE que son proteínas que interactúan con los polipéptidos que son secretados (para una revisión consultar 384).

2.2.1.2. Proteasas

La degradación de proteínas o proteólisis se usa como mecanismo regulador para modular niveles de enzimas y para eliminar proteínas dañadas o anormales. Numerosas rutas metabólicas están reguladas por proteínas inestables presentes en cantidades limitantes en la célula y que responden rápidamente a los cambios en su tasa de síntesis, dependiendo del balance entre síntesis y degradación, y es en estos casos donde se favorece el mecanismo regulador por proteólisis con respecto a otras alternativas. En las etapas que controlan el ciclo celular o en las respuestas de estrés intervienen proteínas inestables donde una modificación reversible de la proteína no supone ninguna ventaja por lo que se favorece el mecanismo de proteólisis. Este mecanismo también es utilizado como un nivel de control en procesos que son redundantes en regulación, como es el control de los niveles de σ^{32} en *E. coli* (para una revisión sobre proteólisis consultar 107, 108, 247).

El proceso de degradación de proteínas anormales o inestables parece estar unido a la respuesta de choque térmico en varios aspectos y fue originalmente identificado porque mutantes en *rpoH* mostraron una reducida capacidad en este

proceso (14, 104). Entre las proteínas de choque térmico de *E. coli* se encuentran dos de los mejor caracterizados sistemas proteolíticos, la proteasa Lon y la Clp, y también funciona como proteasa la proteína de choque térmico HtrC. Los tres sistemas de degradación son dependientes de ATP.

Lon es una endoproteasa que degrada ciertos polipéptidos anormales y proteínas reguladoras (257, 322, 351). El gen *lon* no es absolutamente esencial para el crecimiento bacteriano pero estirpes mutantes presentan varios fenotipos anormales (290). Uno de los sustratos de Lon es el inhibidor de la división celular Sula y, como consecuencia de esto, los mutantes *lon* tienden a filamentar y en ellos la inducción de la respuesta SOS es letal (315).

La proteasa **Clp** está constituida por dos componentes funcionalmente distintos: ClpA con actividad ATPásica y la proteína de choque térmico ClpP con actividad proteolítica (146, 171). Mutantes en ClpA no presentan ningún fenotipo claro, por lo que su función concreta *in vivo* no es conocida (171, 190).

La proteína **HtrC** sólo es requerida a altas temperaturas aunque su inactivación resulta en filamentación a temperaturas intermedias, lisis celular a temperaturas mayores a 42°C, sobreproducción de las proteínas de choque térmico, probablemente por una estabilización de σ^{32} , sobreproducción de algunos polipéptidos y disminución de muchos, y un defecto general en división celular y proteólisis a todas las temperaturas y adicionalmente elimina la sensibilidad a la luz UV de los mutantes *lon* (296).

Estos sistemas de degradación de proteínas son dependientes de la función de las carabinas. Mutaciones que afectan a varias proteínas de choque térmico, entre ellas GroEL, DnaK, DnaJ y GrpE, reducen o anulan esta degradación o pueden activarla y se han detectado agregados de las dos clases de carabinas Hsp60 y Hsp70 con proteínas que son degradadas rápidamente (172, 320, 321, 334). El mecanismo por el que estas proteínas de choque térmico promueven la proteólisis intracelular es incierto, pero se ha sugerido la posibilidad de que la asociación de las carabinas con las proteínas desnaturalizadas ayude a la función de las proteasas facilitando el reconocimiento del sustrato (321). La actividad de Lon es parcialmente dependiente de DnaK y DnaJ y en la proteasa Clp el componente ClpP requiere ATP y a ClpA para acceder al sustrato por lo que ClpA parece actuar como una carabina que promueve cambios conformacionales en las proteínas sustratos (172, 321, 334).

2.2.1.3. Otras proteínas

Uno de los genes que pertenecen al regulón de choque térmico es *rpoD*, que codifica a la subunidad constitutiva σ^{70} de la RNA polimerasa. En condiciones de choque térmico *rpoD* es transcrito a partir del promotor reconocido por σ^{32} (51). Este mecanismo puede ser el responsable de acelerar el proceso de recuperación celular a unas condiciones más fisiológicas, ya que las dos subunidades σ competirán por su unión a la RNA polimerasa (109, 113, 282, 393, 394, 403).

La proteína **LysU** es una de las dos lisina-tRNA sintetetas celulares (364). Aunque este gen no es esencial para el crecimiento en *E. coli*, su producto es utilizado eficientemente en la síntesis del alarmón celular AppppA que se ha postulado como parte de la señal que activa la respuesta de choque térmico (210, 363).

2.2.2. Regulación de la respuesta de choque térmico

La inducción de las proteínas de choque térmico es muy rápida e intensa. Para conseguir esta respuesta al estrés que la ha provocado, tan rápidamente como sea posible, se emplean mecanismos reguladores precisos. Ya que σ^{32} está presente en cantidades limitantes en la célula, su incremento transitorio tras la subida de la temperatura lleva al incremento proporcionado de la tasa de síntesis de las proteínas de choque térmico (110, 333). La regulación de la concentración de σ^{32} es muy compleja, se emplean para ello mecanismos de transcripción, traducción y postraduccionales. La respuesta de choque térmico está también autorregulada negativamente, ya que mutantes en *dnaK*, *dnaJ* y *ygrpE* llevan a la sobreproducción de proteínas de choque térmico (52, 216).

2.2.2.1. Regulación de σ^{32}

Durante el crecimiento equilibrado a 30°C el gen *rpoH* es transcrito constitutivamente por la RNA polimerasa unida a la subunidad σ^{70} y se encuentra en bajos niveles. El mantenimiento de σ^{32} a bajos niveles es debido a su corta vida media, está entre las proteínas más inestables de *E. coli*, (110, 333, 348) y a la represión de su expresión a nivel de traducción (169, 401). El aumento rápido de sus niveles como respuesta al cambio de temperatura se alcanza mediante un incremento transitorio de la síntesis, que ocurre primariamente a nivel de traducción, y de la estabilización de la proteína σ^{32} (169, 333, 347, 401).

El gen *rpoH* puede ser deletado del cromosoma pero es esencial a temperaturas superiores a 20°C (402). El estudio de este mutante ha permitido identificar el mecanismo de transcripción de algunos genes de choque térmico. Algunos de estos genes tienen varios promotores dependientes de σ^{32} , como es el caso de *dnaK*, mientras que otros tienen sólo uno, como *groE* y *grpE*, pero de los que se han identificado también promotores adicionales que son reconocidos por σ^{70} . La inducción por otros agentes que inducen respuestas de estrés de algunos de estos genes sugiere que tienen también regulaciones adicionales de su transcripción (402).

El gen *rpoH* es transcrito desde al menos 4 promotores con diferente regulación (88, 259, 378). El promotor más distal, P1, es el más fuerte y se transcribe en la mayoría de las condiciones fisiológicas, mientras que los promotores proximales P4, P3 y P5, más débiles, son los que ajustan los niveles de σ^{32} en diferentes condiciones de crecimiento. P1 es reconocido por la RNA polimerasa unida a σ^{70} y responsable de los niveles basales de σ^{32} y su nivel de transcripción no es afectado por el cambio de temperatura. El promotor P4 también es reconocido por la RNA polimerasa unida a σ^{70} y la síntesis de los RNA mensajeros desde este promotor es inducida por el cambio de temperatura. Los transcritos desde P1 y P4 representan el 90% del total de RNA mensajero de *rpoH* a 30°C. La transcripción desde el promotor P3 es mediada por la RNA polimerasa unida a σ^{24} y estos transcritos son los que más aumentan tras una subida de la temperatura de crecimiento y son los más abundantes a 50°C. El promotor P5 es un promotor sensible a catabolitos y la transcripción desde él es llevada a cabo por la RNA polimerasa unida a σ^{70} sólo en presencia de cAMP y de su proteína receptora. El promotor P2 está descrito como específico para ciertas estirpes y sus transcritos aumentan considerablemente tras la subida de la temperatura. La transcripción de *rpoH* está también regulada por la proteína DnaA. La unión de DnaA a sus dos secuencias de unión en la región promotora de *rpoH* reprime *in vitro* e *in vivo* la transcripción desde los promotores P3 y P4. Esta influencia indirecta de DnaA en la expresión de los genes controlados por σ^{32} y los defectos de mutantes *rpoH* en el proceso de división celular han llevado a sugerir un mecanismo regulatorio donde la proteína DnaA puede coordinar el inicio de la replicación con la división celular (379).

Cuando las células son expuestas a altas temperaturas la síntesis de σ^{32} es aumentada principalmente a nivel de traducción. En condiciones de crecimiento equilibrado *rpoH* es eficientemente transcrito pero no traducido. Existen secuencias en la región codificadora de *rpoH* que determinan la estructura secundaria de los mRNA y regulan su traducción en condiciones de crecimiento

equilibrado y tras el aumento de temperatura (110, 169, 333, 401)). La síntesis de σ^{32} aumenta unas 11 veces durante los 3 o 4 minutos siguientes al cambio de temperatura y posteriormente disminuye hasta mantener una tasa de síntesis 6 veces superior a la de 30°C (333).

La extrema inestabilidad de σ^{32} a 30°C es la que permite el rápido ajuste de su concentración para regular la respuesta de choque térmico. σ^{32} es rápidamente degradada durante el crecimiento equilibrado a 30°C o a 42°C, con una vida media de 1 minuto, pero durante los primeros minutos tras el cambio a 42°C aumenta su estabilidad al menos 8 veces (110, 333, 348). Esta estabilización de σ^{32} tras el aumento de temperatura puede ser explicada porque la proteasa que degrada a σ^{32} fuera saturada por la aparición de las proteínas inestables o por una modificación reversible de σ^{32} o de la proteasa que la degrada tras el cambio de temperatura (333).

Por tanto el control transcripcional es el responsable de los niveles de σ^{32} en condiciones de crecimiento equilibrado mientras que el control traduccional es el responsable del rápido ajuste de los niveles de σ^{32} en los cambios de las condiciones de crecimiento. El control de la concentración de σ^{32} a los tres niveles, transcripción, traducción y postraduccional, permite una mayor sensibilidad para detectar diferentes tipos de estímulos y una modulación precisa de los niveles de la proteína. Esta precisa regulación de σ^{32} es importante para la viabilidad celular, ya que la sobreproducción de proteínas de choque térmico o mutaciones en genes de choque térmico tienen efectos deletéreos para el crecimiento (13, 336, 348).

El incremento transitorio de la estabilidad y síntesis de σ^{32} que sigue al cambio de 30°C a 42°C, que lleva al incremento de su concentración, es suficiente para explicar la regulación de la síntesis de las proteínas de choque térmico en estas condiciones (110, 333). La concentración de σ^{32} durante el crecimiento equilibrado limita la expresión de los genes de choque térmico, pero se ha determinado que simplemente el aumento de la tasa de síntesis de σ^{32} , desde un promotor inducible exógenamente aún en ausencia del cambio de la temperatura de incubación, es suficiente para aumentar la expresión de los genes de choque térmico (110, en este trabajo apartado 2.2.1 de Resultados). Por tanto, el incremento de la tasa de síntesis de σ^{32} es suficiente para causar el aumento de la síntesis de las proteínas de choque térmico a baja o alta temperatura (110, 333, 348). La síntesis de proteínas de choque térmico que sigue a la inducción de la sobreproducción de σ^{32} desde un promotor inducible es sólo transitoria a pesar de que los niveles de σ^{32} permanecen elevados. Cuando la sobreproducción de σ^{32} es

constitutiva también se encuentra esta falta de incremento proporcionado entre cantidad de σ^{32} y la expresión de genes de choque térmico. Este efecto es consecuencia de la reducción del inicio de la transcripción desde los promotores de choque térmico y es debido a la disminución de la cantidad de σ^{32} activa en las condiciones de aparente exceso de síntesis de las proteínas de choque térmico (336). Aunque el nivel de σ^{32} sea de 15 a 20 veces más elevado y que su vida media química aumente unas 10 veces en las condiciones de sobreproducción de σ^{32} , se ha determinado que el nivel de transcripción de los genes de choque térmico sólo aumenta ligeramente, unas 2 veces, y la vida media funcional de σ^{32} en estas condiciones es similar a la de la estirpe silvestre. Aunque estas observaciones no se contradicen con los anteriores hechos resulta sorprendente encontrar situaciones donde los cambios de los niveles de σ^{32} no se acompañen de cambios de la expresión de los genes de choque térmico. Se ha propuesto un mecanismo que podría explicar la regulación de la expresión de los genes de choque térmico en condiciones de sobreproducción de σ^{32} , las situaciones en las que la expresión de los genes de choque térmico sería regulada por cambios en la actividad de σ^{32} y no de su concentración, en el que la formación o actividad de la RNA polimerasa unida a σ^{32} es inhibida en condiciones de altos niveles constitutivos de σ^{32} por la intervención de otras proteínas de choque térmico como DnaK, DnaJ y GrpE (216, 336).

2.2.2.2. Autorregulación de la respuesta de choque térmico

Hay evidencias genéticas que indican que las proteínas de choque térmico DnaK, DnaJ y GrpE están implicadas en la regulación de la respuesta de choque térmico. Las mutaciones en estos genes causan una parcial estabilización de σ^{32} , que lleva al aumento de la expresión de los genes de choque térmico a 30°C y a una expresión alta prolongada tras el cambio a 42°C (335, 348, 349), la pérdida de la represión de la síntesis de las proteínas de choque térmico tras la bajada de la temperatura de incubación (336, 342) y deficiencias en la regulación postranscripcional de la síntesis de σ^{32} (110, 335). Células que sobreexpresan la proteína DnaK son deficientes en la inducción de la respuesta de choque térmico tras el cambio de temperatura (349). DnaK, DnaJ y GrpE regulan negativamente a σ^{32} en los niveles de síntesis, actividad y degradación, por tanto los niveles de estas proteínas son importantes para determinar la magnitud y duración de la respuesta de choque térmico y juntas actúan como reguladores negativos de la expresión de los genes de choque térmico (216, 335, 348). Se ha demostrado la asociación física de σ^{32} con estas proteínas *in vivo* y se ha propuesto que el mecanismo de regulación de σ^{32} por estas proteínas estaría relacionado con su actividad como carabinas (44, 94, 216).

En el modelo propuesto para la autorregulación de la respuesta de choque térmico un aumento de temperatura llevaría al incremento de la concentración de las proteínas que deben interactuar con estas carabinas por lo que disminuirá su intervención en la regulación de la síntesis, actividad y degradación de σ^{32} . Esta respuesta sería autolimitante ya que la sobreproducción de las proteínas de choque térmico llevarían a restablecer los niveles necesarios de estas carabinas y a la regulación correcta de σ^{32} (52). Por tanto el mecanismo que traduciría el efecto del cambio de temperatura en una señal para la regulación de la respuesta de choque térmico podría ser que durante el crecimiento equilibrado la unión de σ^{32} a DnaK facilitara su degradación y que tras el cambio de temperatura la reducción de DnaK libre liberara a σ^{32} y previniera así su degradación o/y alternativamente alterar su unión a la RNA polimerasa (216).

2.2.3. Choque térmico y otras respuestas de estrés

Un nombre más apropiado para las proteínas de choque térmico sería el de proteínas de estrés, nombre con el que comienzan a ser denominadas, debido a que su inducción puede ser debida a agentes tóxicos tan diversos como etanol, metales pesados, peróxido de hidrógeno, agentes que dañan al DNA, subidas de pH, carencia de aminoácidos, presencia de polipéptidos anormales e infección por bacteriófagos (66, 112, 175, 286, 340, 348, 363, 385).

Otras respuestas de estrés como son la respuesta SOS (345, 374), la respuesta al aumento de la presión hidrostática (383), el estrés oxidativo (75, 375) y la acumulación de nucleótidos como ppGpp (47) o de nucleótidos adenilados (365), parecen también estar relacionadas con la respuesta de choque térmico y entre ellas, en el sentido de responder a los mismos estímulos ambientales, de inducir la expresión de genes comunes o de que las proteínas que se sintetizan durante ellos interaccionan (56, 75, 103, 112, 158, 159, 191, 210, 246, 253, 257, 329, 363). Estas relaciones podrían ser el resultado de la interacción entre diferentes mecanismos reguladores, con uno o varios sensores de los estímulos; así la compleja regulación de *rpoH* hace que σ^{32} pueda regular los estímulos provocados por diferentes agentes (158, 258, 259, 361). Esta interacción entre las distintas respuestas de estrés requiere un estudio más extenso del hasta ahora realizado para ser explicada.

Debido a la variedad de condiciones de estrés que inducen la respuesta de choque térmico se ha pensado que puede haber varios sensores celulares que generen la señal inductora (261). Sin embargo sólo las condiciones de estrés que

alteran la capacidad de traducción de la célula inducen en *E. coli* la respuesta de choque térmico exclusivamente y con las mismas características que el cambio de temperatura (29, 363). Este hecho ha llevado a establecer a los ribosomas como los sensores primarios de la temperatura para inducir la respuesta de choque térmico, así como para la respuesta de choque frío (106). En este modelo el estado físico del ribosoma o algún producto producido por él sería la señal que uniera el estímulo al incremento de la síntesis de las proteínas de choque térmico y la función celular de la respuesta de choque térmico sería corregir la disfunción impuesta por la temperatura, o por el estímulo que provoque esta respuesta, en la traducción. Aunque la inducción de la respuesta restringida en algunas condiciones induzca la respuesta de choque térmico y el nivel de ppGpp incrementa tras un aumento de temperatura, se ha demostrado que este nucleótido no es necesario ni suficiente para inducir la respuesta de choque térmico, aunque sí para ayudar a la fisiología celular a responder a los cambios rápidos de temperatura (234, 304), y que los requerimientos para la llamada **inducción restringida** de las proteínas de choque térmico son diferentes de los de la inducción por el cambio de temperatura (106, 112, 361, 363). Aunque ppGpp y los nucleótidos adenilados que se acumulan en las células estresadas no son la señal que desencadena la respuesta de choque térmico pueden modularla afectando a la función de DnaK (75). El estado del ribosoma por sí mismo podría ser la señal celular para la inducción si con ello se alterase la regulación postranscripcional para la síntesis de σ^{32} . Otra posibilidad propuesta es que la señal generada por los ribosomas sería la naturaleza de las proteínas erróneas que produce; el aumento de temperatura o de ciertas drogas llevaría al aumento de la velocidad del funcionamiento de los ribosomas que conduciría a una disminución de la exactitud del proceso. Esta idea unifica muchos hechos conocidos de la respuesta de choque térmico como son la inducción por análogos de aminoácidos o por proteínas extrañas o desnaturalizadas (103, 286, 385) y la función de las proteínas de choque térmico como carabinas moleculares o proteínas de unión a polipéptidos. Ya que las carabinas Hsp70 actúan como autorreguladores de la respuesta de choque térmico (52, 94, 216, 335), se ha sugerido como mecanismo para la inducción de la respuesta de choque térmico que la presencia de proteínas anormales, sustrato para estas carabinas, suprime la acción de DnaK, DnaJ y GrpE sobre σ^{32} lo que llevará a la producción de proteínas de choque térmico (66, 385).

2.3. ESTRUCTURA DEL DNA

En las células bacterianas las moléculas circulares de DNA están superenrolladas negativamente. Este estado es una forma de almacenar energía libre en la molécula que favorece energéticamente los procesos que requieren la separación de las cadenas de DNA como son la replicación, la transcripción, la recombinación y la transposición. Fisiológicamente la densidad de la superhélice es determinada por las acciones opuestas de dos enzimas: la girasa, que introduce superenrollamiento negativo, y la topoisomerasa I, que lo elimina (revisado en 67, 68, 376). El superenrollamiento varía en respuesta a estímulos ambientales y estos cambios influyen en la fisiología celular (138, 258). El número de enlace varía en plásmidos purificados a partir de células creciendo bajo diferentes condiciones de osmolaridad (137), disponibilidad de oxígeno (65), fase de crecimiento (65), medio de crecimiento (20) y temperatura (70, 105, 258). Esto indica que el nivel de superenrollamiento del DNA celular parece ser un estado altamente dinámico que varía en respuesta a influencias ambientales, aunque el nivel de torsión de la molécula finalmente se mantiene constante *in vivo* debido a la acción de las proteínas que interactúan con el DNA (20, 105, 138). Así tras un cambio a temperatura alta, el superenrollamiento negativo del DNA se relaja pero el grado inicial de superhélice se restaura rápidamente (258). Para ayudar al restablecimiento de la energía de la superhélice tras su alteración por diferentes estímulos, está descrito el aumento de la expresión de los genes que codifican la girasa cuando disminuye la densidad de la superhélice (249) y el control de la expresión de la topoisomerasa I por un promotor de choque térmico para mantener constante sus niveles durante la respuesta de choque térmico (213).

Estos cambios inducidos externamente en el superenrollamiento del DNA han sido propuestos como un mecanismo regulador de la expresión de genes comunes a diferentes respuestas de estrés (138). En el caso de la respuesta de choque térmico, se ha determinado que la relajación transitoria del superenrollamiento del DNA tras el cambio de temperatura o por agentes químicos está asociada a la inducción de las proteínas de choque térmico; si bien esta relajación del DNA tras los diferentes tratamientos no es dependiente de las proteínas de choque térmico ya que tiene lugar también en mutantes *rpoH* (258). Otros modos de inducción de la respuesta de choque térmico no conllevan la alteración del nivel de superenrollamiento, por lo que debe existir más de un mecanismo para la inducción de la expresión de los genes de choque térmico, que podría corresponder al mecanismo de inducción descrito en los apartados anteriores de esta introducción (52, 258, 385).

La energía requerida para modificar la estructura del DNA es menor a mayor temperatura y el desenrollamiento del DNA y la apertura de las secuencias ricas en AT, que son menos estables, es facilitado a alta temperatura (70). Respecto a la influencia del cambio de temperatura sobre la replicación, está descrito *in vitro* que durante el proceso del inicio de la replicación el paso esencial de la apertura de la región de *oriC* en la zona de los trecémeros ricos en AT, dependiente estrictamente de DNA superenrollado negativamente, requiere una temperatura mínima y es facilitado por el aumento de la temperatura de la reacción (33, 34, 100, 325). La temperatura requerida para la iniciación puede ser reducida por la presencia de cantidades estimulantes para este proceso de las proteínas HU o IHF y por la formación de híbridos RNA-DNA durante la activación transcripcional (325). El requerimiento de estas pequeñas proteínas puede deberse a que su unión al DNA altere la distribución del superenrollamiento en *oriC* y al doblar el DNA en una conformación favorable se reduzca la energía requerida para la apertura de *oriC*, requerimiento que probablemente es eliminado por el aumento de la temperatura (99). La acción de la RNA polimerasa en el inicio también es alterar la topología de la región facilitando la apertura de *oriC* (6, 15, 86, 325). Todo esto muestra la sensibilidad de *oriC* durante la iniciación a cambios ligeros de la estructura del DNA (15, 325). En este trabajo se analiza *in vivo* el efecto que tiene un cambio de temperatura brusco sobre el inicio de la replicación y se considera la posibilidad de que el estrés térmico pueda suplir los requerimientos fisiológicos de la apertura de la doble hélice, paso esencial en el inicio de la replicación cromosómica.

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes de *Escherichia coli* K-12 utilizadas en este trabajo se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de *E. coli* K-12.

Estirpe	Genotipo	Referencia
NF859	<i>metB argA pro</i>	285
NF1035	<i>relA2 relX metB</i>	285
MC4100	F ⁻ <i>relA1</i> Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>araD139</i> <i>rpsL150 flbB301 deoC1 ptsF25 rpsR</i>	370
MC4100::λpF13-(PgroE-lacZ)	MC4100::λpF13-(PgroE-lacZ)	397
KY1601	MC4100 Δ <i>rpoH30/Km zhf50::Tn10</i> λpF12 (<i>PrpoD</i> ^{hs} - <i>lacZ</i>)	397
KY1429	MC4100 <i>rpoH6(am) zhf50::Tn10</i>	370
KY1436	MC4100 <i>rpoH165(am) zhf50::Tn10</i>	370
CAG2015	<i>rpoH165 (am) supCts</i> λ ⁺ Δ(<i>pro lac</i>) <i>trp thi</i> <i>ara rpsL zhg::Tn10</i>	111
LE234	<i>metB argH ilv thi rpsL tna supE xyl mtl</i>	281
AQ4241	F ⁻ <i>thyA deoB(C) trp his metE thi ara galK</i> <i>mtl rbs⁺ rpsL tonA T6^r sup-38</i>	235
AQ5441	AQ4241 <i>rnhA224</i>	235
AQ5496	AQ4241 <i>rnhA224 dnaA858::Tn10</i>	235
AQ5500	AQ4241 <i>rnhA224 oriCΔI071</i>	235
IC401	F ⁻ λ <i>rac⁻ thr-1 ara-14 leuB6</i> Δ(<i>gpt-proA</i>)62 <i>lacY1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4(Oc) rfbD1</i> <i>mgl-51 rpsL31 kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3</i> <i>thi-1</i>	4
IC400	IC401 <i>recA430</i>	4
JM83	<i>rpsL ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) φ80 <i>lacZΔM15</i>	396
W3110	F ⁻ λ IN (<i>rrnD-rrnE</i>)1	11

Las estirpes MC4100, MC4100:: λ pF13-(PgroE-lacZ), KY1601, KY1429 y KY1436 fueron enviadas por el Dr. T. Yura, Instituto para la Investigación de Virus, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón. La estirpe CAG2015 fue enviada por la Dra. C. A. Gross, Departamento de Bacteriología, Universidad de Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, EE. UU. Las estirpes AQ4241, AQ5441, AQ5496 y AQ5500 se recibieron del Dr. T. Kogoma, Departamento de Biología, Universidad de New Mexico, Albuquerque, New Mexico, EE. UU. Las estirpes IC401 e IC400 fueron enviadas por la Dra. M. E. Armengod, Instituto de Investigaciones Citológicas, Valencia. La estirpe JM83 fue suministrada por Boehringer Mannheim. La estirpe W3110 fue enviada por el Dr. R. Díaz-Orejas, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.

2. PLASMIDOS Y FAGOS

El plásmido pFN97 fue enviado por la Dra. R. A. VanBogelen, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Michigan, Ann Arbor, Michigan, EE. UU. (262). Es un derivado de ColE1 y contiene el gen *rpoH*.

El plásmido pUC18 fue suministrado por Boehringer Mannheim y se utilizó como vector de clonación (Fig. 4). Este plásmido contiene el origen de replicación y el gen que codifica la enzima β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina, del plásmido pBR322 y el promotor del operón lactosa seguido de la secuencia del gen *lacZ* que codifica los primeros 146 aminoácidos de la enzima β -galactosidasa del fago M13mp19. En esta región codificadora de *lacZ* está insertada la secuencia sintética de clonación múltiple de M13mp19, que sólo causa la interpolación de un pequeño número de aminoácidos en el fragmento amino-terminal de la β -galactosidasa sin alterar la fase de lectura de *lacZ*. El fragmento de la β -galactosidasa codificado permite la complementación intralélica α cuando se transforma con este plásmido a una célula que codifica la porción carboxilo-terminal de la β -galactosidasa. La inserción de un fragmento en el sitio de clonación lleva a la pérdida de la actividad β -galactosidásica al transformar con el plásmido recombinante la estirpe indicadora (252, 266, 396).

El plásmido pALO15 fue enviado por el Dr. E. Boye, Departamento de Biofísica, Instituto para la Investigación del Cáncer, Hospital Radium, Oslo, Noruega (223). Es un derivado del miniplásmido críptico p15A, compatible con

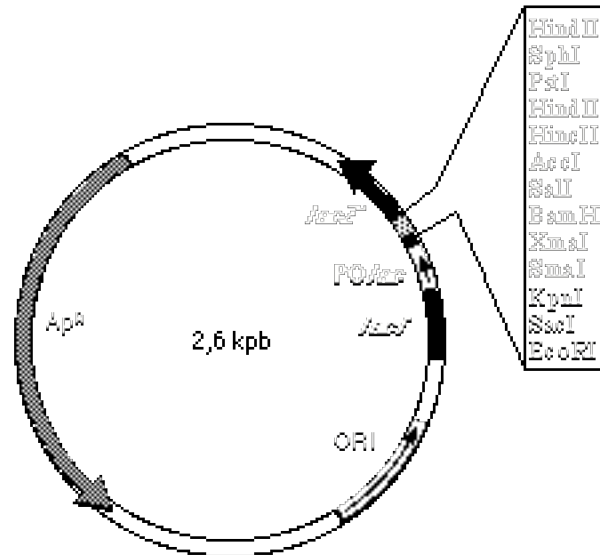


Figura 4. Plásmido pUC18.

ColE1, que contiene el gen *lacI*. Confiere resistencia a tetraciclina y cloranfenicol.

Los plásmidos pK5, pDR2000, pJPB61, pBS4, pHA11 y pSE301 fueron enviados por la Dra. J. Louarn, Centro de Investigación de Bioquímica y Genética Celulares, Centro Nacional de Investigación Científica, Toulouse Cedex, Francia. Son plásmidos híbridos que contienen diferentes fragmentos cromosómicos y fueron utilizados como DNA sonda en el experimento de hibridación. En la tabla 2 se detallan sus características de interés para este trabajo.

Los fagos λ de los clones 4F4 y 11G8 de la genoteca de Kohara se utilizaron para aislar los fragmentos *Bam* HI de 3,7 y 1,1 kpb, que contienen la región cromosómica de *oriC*, y de 4 kpb, que contiene el minuto 26,6 del mapa genético de *E. coli*, respectivamente que se usaron como DNA sonda en el experimento de hibridación (184, 301).

Tabla 2. Plásmidos usados como DNA sonda para hibridación.

Plásmido	tamaño (kpb)	secuencia insertada (min)	tamaño del inserto (kpb)	resistencia (*)	referencia
pK5	22	34,7	15	Tc	168
pDR2000	14	92	9	Tc	309
pJPB61	11	29,2	5	Cm	242
pBS4	18	31,2	12	Tc	26
pSE301	8,8	54,1	4,5	Ap	71
pHA11	16,4	69	10	Ap	291

(*) Resistencia: Tc: tetraciclina, Cm: cloranfenicol y Ap: ampicilina.

3. PRODUCTOS QUIMICOS

Todos los productos químicos utilizados se obtuvieron de la compañía Sigma Chemical excepto las sales y los azúcares que se obtuvieron de Panreac y los productos radiactivos que fueron suministrados por ICN Radiochemicals y Amersham.

3.1. ANTIBIOTICOS

Ampicilina (Ap). Preparada a 50 mg/ml en agua y conservada a -20°C. Se utilizó a 50 o 100 µg/ml en medio rico y a 10 µg/ml en medio mínimo.

Cloranfenicol (Cm). Preparado a 30 mg/ml en etanol y conservado a -20°C. Se utilizó a 30 µg/ml en medio rico y a 10 µg/ml en medio mínimo para seleccionar estirpes resistentes o a 200 µg/ml para inhibir la síntesis de proteínas.

Kanamicina (Km). Preparada a 25 mg/ml en agua y conservada a -20°C. Se utilizó a 25 µg/ml en medio rico y a 10 µg/ml en medio mínimo.

Rifampicina. Preparada a 50 mg/ml en K₂CO₃ 0,1 M:etanol (1:1) y conservada a -20°C. Se utilizó a 150 o a 200 µg/ml para inhibir el inicio de la replicación cromosómica y a 5 µg/ml para inhibir parcialmente la actividad de la RNA polimerasa.

Tetraciclina (Tc). Preparada a 10 mg/ml en etanol:agua (1:1) y conservada a -20°C. Se utilizó a 50 µg/ml en medio rico y a 10 µg/ml en medio mínimo.

3.2. PRODUCTOS RADIATIVOS

Timidina-(metil-³H) (³H-TdR). Suministrada con una actividad específica de 50 Ci/mmol y a una concentración de 1 mCi/ml, en solución etanol:agua (7:3).

Deoxicitidina-5'-trifosfato-(α -³²P) (α -³²P-dCTP). Suministrada con una actividad específica de 3.000 Ci/mmol y a una concentración de 10 mCi/ml, en solución acuosa.

Deoxicitidina-5'-trifosfato-(5-³H) sal de amonio (³H-dCTP). Suministrada con una actividad específica de 17,3 Ci/mmol y a una concentración de 1 mCi/ml, en solución etanol:agua (1:1). Para ser utilizada fue necesario evaporar el etanol del volumen de ³H-dCTP a usar dirigiendo una corriente suave de nitrógeno sobre su superficie y recuperando el volumen inicial adicionando agua.

4. TAMPONES Y SOLUCIONES

Tampón M9 (TM9). Se preparó mezclando 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,01 M, 10 ml de MgSO₄ 0,1 M y 880 ml de agua destilada, esterilizadas por separado y mezcladas en el momento de su utilización.

La solución salina M9 se preparó disolviendo 60 g de HNa₂PO₄, 30 g de H₂KPO₄, 5 g de NaCl y 10 g de NH₄Cl, en este orden, en un volumen final de agua destilada de 1000 ml (256). Se ajustó su pH a 7,2 y se esterilizó, dividida en volúmenes de 200 ml.

Tampón TE. Tris HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1mM (pH 8,0) en agua destilada (307).

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

Tampón SSC. NaCl 150 mM y NA₃Citrato 17 mM en agua destilada y ajustado a pH 7,0 (307).

Tampón SM. NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris HCl 50 mM (pH 7,5), gelatina 0,01% (p/v) en agua destilada hasta 1000 ml (307).

Tampón Z. Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM en agua destilada y ajustado a pH 7,0. Se hirvió 5 minutos, por no poder autoclavarse. Inmediatamente antes de ser utilizado, se añadió β -mercapto-etanol hasta una concentración de 50 mM (256).

Tampón Tris-borato (TBE). Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM en agua destilada y ajustado a pH 8,0 (307).

Tampón Tris-acetato (TAE). Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM en agua destilada y ajustado a pH 8,0 (307).

Solución BBF. Azul de bromofenol 0,25% (p/v) y sacarosa 40% (p/v) en agua destilada.

Solución Boiling. Tris HCl 10 mM, EDTA 50 mM, sacarosa 8% (p/v) y Tritón X-100 0,5% (p/v) en agua destilada a pH 8,0 (142, 307).

Solución Brij. Tris HCl 50 mM, EDTA 63 mM, deoxicolato sódico 0,4% y Brij-58 1% a pH 8,0 (332). Se mezclaron las soluciones de Tris HCl y EDTA estériles con el volumen de agua destilada estéril necesario para ajustar las concentraciones finales y posteriormente se añadió el deoxicolato sódico, se ajustó el pH a 8,0 y finalmente se añadió el Brij-58.

Solución de CsCl y bromuro de etidio. Se preparó disolviendo 80 g de CsCl en 52 ml de TES, a 30°C, y posteriormente se adicionaron 8 ml de bromuro de etidio (5 mg/ ml de TES). Una vez mezclada la solución, se filtró a través de un filtro Millipore HA de 0,45 μm de diámetro de poro. Se ajustó el índice de refracción a 1,402 y se almacenó en oscuridad.

Mezcla de fenol. Se preparó mezclando fenol:cloroformo:isoamil alcohol en la proporción 25:24:1 y 50 mg/100 ml de 8-hidroxiquinoleina. Esta mezcla se equilibró a pH 7,8-8,0 añadiendo Tris HCl 100 mM (pH 8,0) hasta alcanzar, tras agitar y permitir la separación de la fase orgánica y acuosa, el pH deseado en la fase acuosa. Esta solución se conservó en oscuridad a 4°C (307).

Mezcla de centelleo. Se disolvieron 4 g de PPO y 100 mg de POPOP, en este orden, en 1000 ml de tolueno en oscuridad y a 4°C, condiciones en las que se almacenó.

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 CaCl_2 0,01 M, 10 ml de MgSO_4 0,1 M, 10 ml de una solución de los aminoácidos requeridos por la estirpe a 2 mg/ ml y 10 ml de una solución de tiamina a 0,2 mg/ ml a 860 ml de agua destilada que contenían 4 g de glucosa o glicerol. Todas las soluciones se esterilizaron previamente por separado. Este medio se enriqueció en algunos casos con una solución de caseína hidrolizada (casaminoácidos) hasta una concentración del 0,2% (p/v) final. Los resultados presentados en esta memoria se obtuvieron con cultivos crecidos en medio mínimo con glucosa como fuente de energía cuando no se especifica que se utilizó glicerol.

Medio rico Nutrient Broth (NB). Se disolvieron 13 g de caldo nutritivo Nutrient Broth (Oxoid) en 1000 ml de agua destilada, se ajustó el pH entre 7,2 y 7,4 y se esterilizó en autoclave.

Medio rico Luria-Bertani (LB). Se disolvieron 10 g de bacto triptona (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid) y 10 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada, el pH de la solución se ajustó entre 7,2 y 7,4 y se autoclavó (256).

Estos medios se utilizaron para el crecimiento de las estirpes bacterianas tanto en líquido como en placa. Para solidificar los medios se añadieron 20 g de agar (Panreac) a 1000 ml del medio líquido antes de esterilizar, denominándose cuando son sólidos NA el medio Nutrient Broth y LA el Luria-Bertani.

5.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA EL FAGO λ

Agar de cobertera. Se preparó añadiendo 6 g de agar a 1000 ml de LB y una vez estéril se añadió MgSO_4 hasta una concentración final 10 mM.

NA10. Se preparó añadiendo 10 g de agar a 1000 ml de NB, antes de su esterilización. Se utilizó para titular las suspensiones del fago.

Medio específico para el fago λ . Compuesto por LB, esterilizado tras añadir 10 g de agar a 1000 ml de medio, glucosa 0,3% (p/v), CaCl_2 0,075 mM, FeCl_3 0,004 mM y MgSO_4 2 mM. Se utilizó para aumentar el título de las suspensiones del fago.

6. ENZIMAS Y SISTEMAS DE CLONACION Y MARCAJE

DNasa I pancreática. Se preparó en solución a 2mg/ml en acetato sódico 5 mM (pH 5,0), CaCl₂ 1 mM y glicerol al 50% (p/v). Se almacenó a -20°C. Suministrada por Pharmacia.

RNasa II-A pancreática. Se preparó a 2mg/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.

Lisozima. Se utilizaron soluciones recién preparadas a 10 mg/ml en TES (pH 8,0), que se mantuvieron a 0°C hasta 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.

Enzimas de restricción. Se utilizaron las siguientes: *Eco* RV, *Hind* II, *Eco* RI y *Bam* HI y sus tampones que fueron suministrados por Boehringer Mannheim o BioLabs New England.

Sistema de clonación en pUC. Contenía el plásmido pUC18, la estirpe indicadora JM83, la enzima DNA ligasa del fago T4 y el tampón para la reacción de ligamiento. Se utilizó para construir el plásmido pRPH184. Se obtuvo de Boehringer Mannheim.

Sistema de marcaje de DNA por extensión de cebadores. Compuesto por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, una solución de desoxinucleótidos trifosfatos, excepto dCTP, y una solución de los cebadores en el tampón para la reacción de síntesis de DNA. Utilizado para obtener fragmentos de DNA cromosómico marcados radiactivamente. Fue suministrado por NEN research products, Dupont.

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO

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

El **crecimiento en masa** de un cultivo líquido se determinó por aumento de la absorbencia en un espectrofotómetro Spectronic 20 de Bausch & Lomb, generalmente a 450 nm de longitud cuando el cultivo creció en medio mínimo, sin o con casaminoácidos, y a 600nm cuando creció en medio rico o con rifampicina a 5 µg/ml, con el fin de corregir el aumento de la absorbencia debido al color del medio. Para realizar la medida se utilizaron tubos de 1 cm de paso de luz previamente precalentados a la temperatura de crecimiento del cultivo. El volumen utilizado para realizar la medida se devolvió al cultivo de donde se tomó.

El **crecimiento en medio sólido** se requirió en distintas situaciones experimentales, para la selección de nuevas estirpes 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 sobre el medio sólido adecuado para cada objetivo, selectivo o no, en placas Petri y se incubaron en estufas, en posición invertida generalmente, a la temperatura deseada.

2. CAMBIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

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

El **cambio de la temperatura de incubación** de un cultivo creciendo exponencialmente se realizó cuando alcanzó una densidad óptica entre 0,08 y 0,1 unidades de absorbencia medida a 450nm, o entre 0,05 y 0,08 unidades mediada a 600 nm.

El **tratamiento con rifampicina** se llevó a cabo añadiendo la droga al cultivo creciendo exponencialmente cuando alcanzó una densidad óptica entre 0,08 y 0,1 unidades de absorbencia medidas a 450nm o entre 0,05 y 0,08 unidades a 600 nm. Se utilizó a una concentración final de 150 µg/ml para inhibir posteriores inicios de replicación, excepto cuando se indique algo diferente, y a 5 µg/ml para reducir la actividad de la RNA polimerasa. Cuando se realizó el tratamiento simultáneo de cambio de la temperatura de incubación y adición de rifampicina se procedió en primer lugar al cambio de temperatura y tras 30 segundos a la adición de rifampicina, si no se especifica algo diferente. El momento de la adición de la rifampicina fue el tiempo cero de este tratamiento.

La **carencia de los aminoácidos requeridos** se realizó por filtración del cultivo, cuando alcanzó de 1 a 1,5 unidades de absorbencia, a través de un filtro de nitrato celulosa, Millipore HA WPO4700, de 47 mm de diámetro total y 0,45 µm de diámetro de poro. La filtración se ayudó succionando con una bomba de vacío Millipore. Este método permite trabajar con una gran rapidez y en condiciones de esterilidad. Para lavar las células se vertió sobre el filtro, continuando con la succión, un volumen del mismo medio sin los aminoácidos aproximadamente 5 veces superior al volumen de cultivo filtrado. Las bacterias pegadas al filtro se resuspendieron, mediante agitación mecánica durante 1 minuto, en el medio sin los aminoácidos precalentado a la temperatura de incubación posterior del cultivo, se retiró el filtro y el volumen se incubó a la temperatura deseada. El inicio del lavado de las células se consideró el tiempo cero de este tratamiento.

3. CONSERVACION DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

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

Para la conservación de las estirpes durante periodos de tiempo de hasta 2 semanas y para permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas y purificadas, las estirpes se conservaron 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. Transcurridas unas dos semanas las estirpes comprobadas que se conservaban en placa se traspasaban a placas con medio fresco, para continuar trabajando con ellas.

4. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO

4.1. MARCAJE DEL DNA *in vivo*

La progresión de la síntesis de DNA se determinó mediante la cuantificación de timidina-(metil- ^3H) incorporada en el DNA a diferentes tiempos (272). En este trabajo se han empleado estirpes mutantes en la ruta de biosíntesis de timidina (Thy^-) y estirpes que no requieren la adición al medio de crecimiento de este nucleótido por lo que se han seguido dos métodos de marcaje diferentes.

Timidina trifosfato (TTP) es el único nucleótido específico de la síntesis de DNA. Las células sintetizan este nucleótido a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) que es transformado en timidina monofosfato (TMP) por la enzima timidilato sintetasa, producto del gen *thyA*. Este monofosfato es fosforilado hasta trifosfato (TTP) para ser utilizado en la síntesis del DNA y su exceso es degradado por la timidilato kinasa (*tdk*) a timidina (TdR) y por la timidina fosforilasa (*tpp*) el 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, 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^- 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. El problema con mutantes Thy^- radica en determinar con exactitud la concentración de timina o timidina justa para que un defecto de esta concentración no limite la velocidad de replicación o su exceso perjudique al crecimiento (294).

Una bacteria Thy^+ puede también usar la ruta degradativa para sintetizar TMP a partir de timina o timidina exógenas pero sin los problemas de una posible limitación del nucleótido. En este trabajo para conseguir el marcaje del DNA en estirpes Thy^+ se añadió al medio de crecimiento uridina en concentraciones altas, 1,5 mM, que inhibe la timidina fosforilasa (*tpp*) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de TdR, por lo que la concentración de TdR en la célula fuerza su incorporación en el DNA a partir del nucleósido exógeno (25, 41, 293).

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 adicionó previamente 8 $\mu\text{g/ml}$ de TdR, concentración de TdR requerida por las estirpes utilizadas, y 1,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-TdR}$ en el caso de mutantes Thy^- , o uridina hasta 1,5 mM final, 1 $\mu\text{g/ml}$ de TdR y 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{H-TdR}$ en el caso de las estirpes Thy^+ . La toma de muestras y todos los tratamientos de estos cultivos comenzaron tras un tiempo de incubación en este medio radiactivo no inferior a tres generaciones.

4.2. MEDIDA DE LA SINTESIS DE DNA

Para cuantificar la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ en el DNA se tomaron alícuotas de 200 μl y se depositaron en tubos que contenían 2,5 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. Se lavaron los tubos con TCA 5% y se filtró este volumen y finalmente los filtros se lavaron dos veces con agua destilada. Los filtros se secaron a 100°C y posteriormente se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de la mezcla de centelleo (apartado 4 de materiales). La medida de la cantidad de $^3\text{H-TdR}$ incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

4.2.1. En crecimiento exponencial

El valor de la cantidad de radiactividad incorporada al DNA en las muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del crecimiento es equivalente a la cantidad de DNA presente en el cultivo y se utilizó para determinar la relación DNA/masa (dpm/absorbencia X 1000).

4.2.2. Tras la inhibición de inicios de replicación

La inhibición del inicio de nuevos ciclos de replicación se llevó a cabo por adición de rifampicina (150 o 200 µg/ml), carencia de los aminoácidos requeridos (apartado 2 de Métodos) o adición de cloranfenicol (200 µg/ml). En el momento del comienzo del tratamiento se tomaron varias muestras de 200 µl del cultivo que se precipitaron en TCA. Se continuó con la toma de alícuotas y su precipitación a diferentes tiempos hasta al menos un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe.

La cantidad de DNA acumulada por el cultivo tras el inicio del tratamiento inhibitor se determinó por la relación dpm en las que se estabiliza la acumulación/dpm en el momento de la inhibición. El incremento de la cantidad de DNA sintetizado, ΔG , está relacionado con el número medio de puntos de replicación por cromosoma equivalente en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente, n , por la expresión (57, 338):

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

Una vez conocido n se determinó el número medio de orígenes por cromosoma en el cultivo exponencial que es igual a 2^n .

4.2.3. Tras la inducción de inicios de replicación

Para cuantificar la inducción térmica del inicio de la replicación en un cultivo creciendo exponencialmente a 20°C o 30°C cuando el cultivo alcanzó una absorbencia entre 0,08 y 0,1, medida a 450 nm, se transfirió una alícuota a 41°C. 30 segundos después del cambio de temperatura, cuando no se especifique otro tiempo diferente, se añadió rifampicina (150 o 200 µg/ml) y se tomaron varias muestras de 200 µl que se precipitaron en TCA e, inmediatamente después, se procedió de igual forma con la porción del cultivo que permaneció a 20°C o 30°C. Se continuó con la toma de muestras y su precipitación hasta al menos un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe.

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

El porcentaje de orígenes que inician inducidos por el cambio de temperatura, se cuantificó a partir de los valores de acumulación de DNA tras la inhibición a baja temperatura y tras el cambio a 41°C. La determinación del número de puntos de replicación por cromosoma equivalente a partir del ΔG en las condiciones de inducción de nuevos inicios daría una sobreestimación debido a que si estos puntos sintetizan cromosomas completos se alcanzará una acumulación de DNA superior a la de una distribución aleatoria de estos puntos en el cromosoma, como ocurre durante el crecimiento exponencial.

Si tras el tratamiento inductor de los inicios de las replications acíclicas en un porcentaje de orígenes, i , se inhiben las posteriores iniciaciones mediante rifampicina, el contenido final de DNA sintetizado es $2^n (i+1)$ y la cantidad de DNA acumulada relativa a la inicial en el momento de la inhibición es por tanto (160):

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

donde n se calcula a partir de los datos de acumulación tras la adición de rifampicina a baja temperatura e i , la proporción de orígenes donde se induce la iniciación, es la única variable desconocida.

5. AISLAMIENTO DEL FAGO λ

Los fagos λ utilizados en este trabajo pertenecen a la genoteca de Kohara (184) y se crecieron en cultivos estacionarios de la estirpe W3110 crecida en LB con $MgSO_4$ 0,01M y maltosa al 2%. Para conseguir los fagos λ a partir de la genoteca se depositaron 5 μ l de la suspensión de fagos de la colección sobre una placa de medio rico NA10, sembrada con agar de cobertera con 0,2 ml de un cultivo de la estirpe W3110. Tras 12 a 16 horas de incubación a 37°C se recogieron las zonas de lisis que aparecieron en la placa. A la zona de lisis recogida se añadieron 0,2 ml de un cultivo W3110 y la mezcla se mantuvo 20 minutos a 37°C, para permitir la preadsorción, y posteriormente se añadieron 10 ml de LB con SO_4Mg 0,01M y maltosa al 2% y se incubó con agitación vigorosa a 37°C hasta observar la lisis

bacteriana, unas 5 a 6 horas después. Las células se eliminaron añadiendo 0,5 ml de cloroformo y, tras permitir su actuación durante 10 minutos a 37°C con agitación suave, el lisado se mantuvo durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante al que se añadieron unas gotas de cloroformo y se guardó a 4°C, obteniéndose una suspensión de entre 10^9 a 10^{10} fagos/ml.

Para aumentar el volumen y el título de la suspensión de fagos obtenida se realizó una lisis en placa, propagándose el fago en bacterias creciendo en agar de cobertera. Se mezclaron unos 10^5 fagos con 0,2 ml de un cultivo de W3110. Tras un periodo de preadsorción de 20 minutos a 37°C se adicionaron 3 ml de agar de cobertera, se mezclaron y se vertieron sobre placas de medio sólido para el fago λ recién preparadas (apartado 5.2 de Materiales) que se incubaron sin inversión durante 6 a 8 horas a 37°C. Tras la incubación se recogió el agar de cobertera al que se añadieron 0,1 ml de cloroformo por placa y se mezclaron con agitación durante 15 minutos a 37°C. La mezcla se centrifugó a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó, se le añadieron unas gotas de cloroformo y se mantuvo a 4°C hasta su uso, obteniéndose en esta suspensión de fagos de 10^{10} a 10^{11} fagos/ml.

Para el recuento del número de fagos de una suspensión se procedió a una dilución seriada en LB, a partir de un volumen de 50 μ l, hasta obtener de 1000 a 6000 fagos/ml. A partir de esta suspensión se tomaron 0,1 ml que se añadieron a 0,2 ml de un cultivo W3110 y tras la preadsorción se sembraron con agar de cobertera sobre placas de NA10. Tras su incubación, de 12 a 16 horas a 37°C, se procedió al recuento de los halos de lisis aparecidos, que se corresponden con el número de fagos sembrados. Este resultado se corrigió con el factor de dilución realizado antes de la siembra.

6. AISLAMIENTO DE DNA

6.1. DNA CROMOSOMICO

Las células a partir de las que se aislaron sus cromosomas se obtuvieron por centrifugación a 13.000 g durante 5 minutos a 0°C de unos 20 ml de cultivo creciendo en las condiciones experimentales deseadas, equivalentes a de 2 a 14 unidades de absorbencia a 450 nm. El sedimento se lavó en un volumen de TE igual a la mitad del volumen centrifugado y se concentró en 250 μ l de TE a 0°C.

La suspensión celular se mantuvo a 0°C y a esta temperatura se añadieron 100 µl de la solución de lisozima (apartado 6 de Materiales) y se dejó actuar de 20 a 30 minutos, posteriormente se añadieron 90 µl de EDTA 500mM y, tras 40 minutos, se adicionaron 50 µl de SDS al 10% y se homogeneizó suavemente la suspensión. Tras 30 minutos a 0°C se añadieron 30 µl de pronasa (apartado 6 de Materiales), se homogeneizó suavemente el lisado y se incubó a 37°C durante la noche. Se obtuvo una solución final viscosa y homogénea, sin agregados, y se guardó a 4°C hasta proceder a la obtención del DNA.

Del lisado celular obtenido se eliminaron las proteínas mediante la extracción con fenol:cloroformo (apartado 7 de Métodos) y el RNA por tratamiento con RNasa II-A a 100 µg/ml finales durante 60 minutos a 37°C. Finalmente se procedió a la precipitación del DNA cromosómico (apartado 7 de Métodos) y se concentró resuspendiendo el sedimento en TE con RNasa 100 µg/ml, a una relación aproximada de 50 µl/1 unidad de absorbencia de cultivo inicial.

6.2. DNA DEL FAGO λ

A un suspensión de fagos λ se añadieron DNasa I y RNasa II-A, cada enzima a una concentración final de 1 µg/ml, y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron NaCl sólido hasta una concentración final de 1 M y PEG 8000 al 10% final que se disolvieron agitando suavemente y el lisado se mantuvo de 60 a 90 minutos a 0°C para precipitar las partículas de fago. El precipitado se recogió centrifugando a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El sedimento seco se resuspendió en 1 ml de SM (apartado 4 de Materiales) y para eliminar el PEG y los restos celulares se añadió 1 ml de cloroformo y se agitó mecánicamente durante 30 segundos, se separaron las fases orgánica y acuosa a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa.

A la suspensión concentrada de fagos obtenida se añadieron EDTA (pH 8) a una concentración final 25 mM y SDS hasta una concentración final del 0,1% y se mezclaron. La suspensión se incubó de 10 a 15 minutos a 55°C y tras ese tiempo se pasó a 0°C. Tras el choque de temperaturas se realizaron dos tratamientos consecutivos con la mezcla de fenol (apartado 4 de Materiales) que consistieron en añadir 1/4 del volumen del sobrenadante recogido de la mezcla de fenol y tras homogeneizar agitando fuertemente la suspensión se mantuvo 15 minutos a 0°C. El sobrenadante se recuperó tras centrifugar a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C. Tras el segundo tratamiento con la mezcla de fenol al sobrenadante recogido se añadió el mismo volumen de cloroformo que el añadido de la mezcla de fenol, se mezclaron y se recuperó el sobrenadante tras centrifugar a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C.

El DNA que contenía la solución recuperada se precipitó con etanol y se resuspendió en TE con RNasa 100 µg/ml (apartado 7 de Métodos).

Para una mayor limpieza del DNA obtenido, si éste iba a ser sometido posteriormente a reacciones de corte con enzimas de restricción, la solución se transfirió a una bolsa de diálisis y se dializó frente a 1000 ml de TE, con dos cambios, durante la noche a 4°C.

6.3. DNA PLASMIDICO

Los métodos que se llevan a cabo para la extracción y purificación del DNA plasmídico incluyen los siguientes pasos: crecimiento de un cultivo bacteriano, recogida y lisis de las bacterias y purificación del DNA plasmídico.

La elección de los métodos de aislamiento de DNA plasmídico utilizados durante la realización de este trabajo ha estado en función del estado de purificación requerido para su uso posterior así como del tamaño del plásmido aislado y de la cantidad de DNA que se necesitó. La lisis por calor se utilizó para aislar DNA plasmídico de pequeño tamaño, menor de 15 kpb, a partir de pequeños volúmenes de cultivo cuando una posterior purificación no era necesaria. Cuando el aislamiento requirió una mayor purificación del DNA plasmídico obtenido y se trataba de plásmidos de tamaño superior a 15 kpb y/o se necesitó una mayor cantidad de DNA se extrajo a partir de mayores volúmenes de cultivo y la separación del DNA plasmídico del cromosómico se llevo a cabo mediante centrifugación en equilibrio en gradientes de CsCl y bromuro de etidio.

6.3.1. Lisis por calor

Este método fue descrito por Holmes y Quigley (142).

Se inocularon 5 ml de medio rico NB que contenía el antibiótico apropiado con una colonia de la estirpe portadora del plásmido y se incubó con agitación vigorosa a 30°C o 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria. Se tomaron volúmenes de 1,5 ml del cultivo y se pasaron a tubos eppendorf que se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto. Se eliminó el medio por aspiración dejando seco el sedimento de bacterias.

El sedimento se resuspendió en 350 µl de la solución de lisis, la solución boiling (apartado 4 de Materiales). Secuencialmente, a cada tubo se añadieron 25 µl de una solución de lisozima (apartado 6 de Materiales) y se mezclaron por agitación mecánica durante 3 segundos, se calentó durante 40 segundos en agua hirviendo y

se pasó a hielo. Los tubos se mantuvieron en hielo hasta centrifugar el lisado a 10.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se eliminó el sedimento con restos celulares con un palillo de dientes y se procedió a la concentración del DNA de la solución con etanol o isopropanol (apartado 7 de este capítulo). Finalmente el sedimento se resuspendió en 50 µl de TE o TES con RNasa II-A pancreática (50µg/ml) y se incubó durante 10 minutos a 37°C. La solución final de DNA se guardó a 4°C.

6.3.2. Método Brij

Cuando la obtención del plásmido incluyó la centrifugación en equilibrio en gradientes de densidad de CsCl y bromuro de etidio se utilizó el método descrito por Stougaard y Molin (332) para su aislamiento.

Se obtuvo un cultivo denso por dilución, 2-3:1000, de un cultivo nocturno en medio rico NB con el antibiótico apropiado y tras su crecimiento con aireación a 37°C. Se centrifugaron 500 ml del cultivo a 14.000 g durante 10 minutos a 4°C y el sedimento bacteriano se lavó una vez con 20 ml de TES y se concentró en 7,5 ml de sacarosa al 25% (p/v) en Tris HCl 0,25 M (pH 8). Una vez resuspendidas las células se añadieron 1,5 ml de una solución de lisozima (apartado 6 de Materiales) y, tras 5 a 10 minutos a 0°C, se añadieron 150 µl de una solución de RNasa II-A pancreática (apartado 6 de Materiales). Después de 5 a 10 minutos a 0°C se añadieron 3 ml de EDTA 0,25 M (pH 8) y transcurridos otros 5 a 10 minutos se adicionaron 12 ml de la solución de lisis, solución Brij (apartado 4 de Materiales), que se dejó actuar durante 10 a 20 minutos a 0°C con suaves agitaciones ocasionales. El lisado obtenido se centrifugó a 20.000 g durante 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El DNA contenido en el sobrenadante se precipitó durante la noche con PEG 8000 al 10% y NaCl 0,5 M, concentraciones finales, a 4°C. El DNA precipitado se recogió por centrifugación a 2.250 g durante 10 minutos a 4°C y el sedimento seco se resuspendió en 0,9 ml de TES con RNasa II-A a 100 µg/ml.

Con la solución de DNA se llevó a cabo una centrifugación isopícnica en un gradiente de CsCl con cantidades saturantes de bromuro de etidio (apartado 4 de Materiales) a 45.000 rpm durante 16 horas a 15°C en un rotor VTi65 para separar el DNA plasmídico del cromosómico. Tras la centrifugación se recuperó la banda de DNA correspondiente al plásmido superenrollado. El bromuro de etidio se eliminó mezclando la solución con isopropanol saturado en NaCl y eliminando el sobrenadante tras centrifugación, sucesivas veces, hasta no apreciar diferencia de color entre las dos fases. El CsCl se eliminó por diálisis frente a 1000 ml de TE, con dos cambios, durante la noche a 4°C.

Los plásmidos utilizados como sondas en el experimento de hibridación (apartado 1.3 de Resultados) se purificaron al menos 2 veces por centrifugación en CsCl y bromuro de etidio para evitar toda la posible contaminación con el DNA cromosómico. Para esto la solución de DNA dializada obtenida tras el primer gradiente se sometió a centrifugación isopícnica en las mismas condiciones que en el primer gradiente.

7. PURIFICACION Y CONCENTRACION DE DNA

Tras el tratamiento con enzimas proteolíticas a lisados celulares y cuando no se requerían otras medidas adicionales de purificación, 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 (apartado 4 de Materiales) y posteriormente con cloroformo 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, se mezclaron los componentes, por agitación mecánica cuando las moléculas de DNA purificadas eran pequeñas (<10 kpb) y mediante una agitación suave cuando el DNA era de un tamaño mayor, hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0°C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 2.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica y la interfase se volvieron a extraer añadiendo un volumen igual de TE, para conseguir una mayor recuperación, y tras mezclarse y mantenerse 15 minutos a 0°C, se separaron las fases por centrifugación como en el caso anterior y se recogió la fase acuosa que se unió al primer volumen recuperado. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase. A la solución acuosa final obtenida se añadió el mismo volumen de cloroformo, se mezclaron y se separaron las fases por centrifugación y finalmente se recuperó la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos en solución.

Para concentrar soluciones de DNA se procedió a su precipitación con etanol o isopropanol o a la reducción de su volumen con isobutanol. Para la concentración mediante precipitación, a la solución de DNA se añadió acetato sódico (pH 5.2) a una concentración final 0,3 M, se mezclaron 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 durante 30 a 60 minutos para facilitar la precipitación y el DNA se recuperó centrifugando a 13.000 g durante 20 a 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 por evaporación a 42°C. El DNA precipitado y seco se resuspendió en el volumen deseado de TE o TES (apartado 4 de Materiales). Cuando se necesitó trabajar con el menor volumen posible durante la precipitación se utilizó isopropanol, aunque tiene la desventaja de ser menos volátil que el etanol.

La extracción con isobutanol se utilizó para concentrar soluciones de DNA cuando se pudo reducir su volumen sin aumentar la concentración de sales hasta límites no deseados. A la solución de DNA se añadió un volumen igual de isobutanol y se mezclaron. Las fases se separaron centrifugando a 2.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente y se eliminó la fase superior. Estos pasos se repitieron hasta que la fase acuosa alcanzó el volumen deseado.

8. DIGESTION Y LIGAMIENTO DE DNA

Las reacciones de digestión de DNA con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor. Generalmente se mezclaron, manteniendo las soluciones a 0°C, el DNA en un volumen igual a la mitad del volumen final, agua milliQ para ajustar el volumen final de la reacción al deseado, la décima parte del volumen final del tampón apropiado a cada enzima 10X y finalmente las unidades de enzima de restricción necesarias para digerir la cantidad de DNA de la mezcla, y se incubó a 37°C durante 1 hora.

La reacción de ligamiento para la construcción de pRPH184 se llevó a cabo mezclando, a 0°C, 3 µl de pUC18 (0,1 µg/µl), 5 µl del fragmento que contiene a *rpoH* (0,12 µg/µl), 1 µl del tampón del ligamiento 10X y 1 µl de ligasa de T4 (1 unidad/µl) e incubando la mezcla a 22°C durante 48 horas.

9. ELECTROFORESIS DE DNA

La separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa del gel dependió del tamaño y la conformación del DNA que se quería separar, generalmente oscilando entre 0,6% y 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-borato 1X (TBE) (apartado 4 de Materiales), excepto en el caso de la obtención de fragmentos a partir del gel de electroforesis por el método de centrifugación a través de lana de vidrio que se utilizó Tris-acetato 1X (TAE) (apartado 4 de Materiales). Generalmente las electroforesis se realizaron en presencia del colorante fluorescente bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml incorporado tanto en el gel como en el tampón, 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 electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

9.1. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

9.1.1. Electroforesis sobre membrana de diálisis

Este método (102) se utilizó para aislar el fragmento de 1,3 kpb del plásmido pFN97 que contiene al gen *rpoH*. La reacción de corte de pFN97 con la enzima *EcoRV* se sometió a electroforesis en un gel al 1% de agarosa. Tras la separación adecuada y la localización visual de los fragmentos obtenidos tras el corte se realizó una incisión en el gel delante de la banda del fragmento de 1,3 kpb, en el sentido de la movilidad de la electroforesis, en la que se introdujo una porción de papel Whatman 3MM y tras él una membrana de diálisis empapadas en el tampón de la electroforesis, sin formar burbujas de aire. Se continuó la electroforesis hasta que el fragmento de DNA migró hasta el papel y quedó atrapado en él.

El papel y la membrana de diálisis se pasaron a un tubo Eppendorf perforado en la base y acoplado a otro tubo y tras una breve centrifugación se recogió el eluido en el tubo inferior. Se añadieron 100 µl de TE al tubo que contenía el papel y la membrana y se volvió a centrifugar para recuperar el DNA.

El fragmento obtenido se purificó por extracción con fenol y cloroformo y se concentró y se recuperó tras la precipitación con etanol.

9.1.2. Centrifugación a través de lana de vidrio

Para obtener los fragmentos cromosómicos usados como DNA sonda en el experimento de hibridación se utilizó el método propuesto por Heery et al. (126).

Tras la separación y localización de los fragmentos que se querían obtener, por electroforesis con tampón Tris-acetato 1X (TAE), se cortó la porción de gel que contenía a cada uno de ellos. Cada porción se transfirió a un tubo Eppendorf perforado en el fondo que contenía de 2 a 3 mm de lana de vidrio estéril siliconizada, acoplado a otro Eppendorf y se mantuvieron de 15 a 30 minutos a -20°C . Una vez congelada la porción del gel, se centrifugaron los tubos a 2.500 g durante 10 minutos y se recogió el eluido en el tubo inferior. En el tubo con la lana de vidrio y el gel se añadieron 100 μl de TE que se recogieron en el tubo inferior tras centrifugación con el fin de recuperar la máxima cantidad de DNA.

El DNA se concentró y se recuperó tras la precipitación con etanol en el volumen deseado de TE (apartado 7 de Métodos).

10. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE DNA

Dos tipos de métodos se han utilizado para determinar la cantidad de DNA de una solución.

10.1. DENSITOMETRIA DE GELES

Si la cantidad de DNA era muy pequeña (menor de 250 ng/ml) o el DNA no estaba totalmente purificado, la cuantificación 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. La cuantificación se realizó mediante digitalización de la imagen de geles iluminados en un sistema de documentación de geles GDS5000 de UVP y la densitometría de las bandas de DNA por ordenador utilizando el programa Collage de la firma Photodyne.

10.2. ESPECTROFOTOMETRIA

Si la muestra no tenía contaminantes, tales como proteínas, fenol, agarosa o RNA, se determinó espectrofotométricamente la cantidad de radiación ultravioleta que absorbía, como en el caso del DNA utilizado en el experimento de hibridación. Se determinó la absorbencia de la solución de DNA a 260 nm y a 280 nm. Una absorbencia de 1 a 260 nm corresponde a aproximadamente 50 µg/ml para DNA de doble cadena. La relación DO 260 nm/DO 280 nm es una estimación de la pureza de la muestra, una solución de DNA puro tiene un valor de 1,8 para esta relación y si hay contaminación con proteínas o fenol esta relación disminuye o si es con RNA se aproxima a 2.

11. TRANSFORMACION

Para la transformación de *E. coli* con DNA plasmídico se utilizó el tratamiento de células con soluciones de CaCl₂ a 0°C seguido por un breve calentamiento, induciendo de este modo el llamado **estado de competencia** en la bacteria receptora durante el cual es capaz de introducir moléculas de DNA de diferente procedencia (49, 239).

A partir de una dilución 1:50, aproximadamente, de un cultivo nocturno de la estirpe a transformar en LB, se obtuvo un cultivo entre 0,3 y 0,4 unidades de absorbencia a 600 nm creciendolo con agitación vigorosa. Para cada transformación se tomaron 3 ml de cultivo, se mantuvieron 20 minutos a 0°C y se recogieron las células centrifugando a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C.

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

La expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico, adquirida por las células transformadas, se permitió añadiendo 1 ml de LB a la suspensión celular e incubándola, con suave agitación, durante 2 horas a 30°C o 90

minutos a 37°C. La selección de los transformante se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo, con ampicilina a 50 o 100 µg/ml y/o cloranfenicol a 30 µg/ml, e incubándolas de 14 a 16 horas a 30°C o 37°C.

12. DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MARCADORES

La frecuencia de marcadores se determinó siguiendo básicamente el método descrito por de Massy et al. (242) y se utilizó para localizar el origen de la replicación termoinducida.

12.1. MARCAJE DE DNA CROMOSOMICO *in vitro*

Para obtener fragmentos cromosómicos marcados radiactivamente se utilizó el sistema de marcaje por extensión de oligonucleótidos que ceban la replicación al azar (apartado 6 de Materiales). Este método está basado en el desarrollado por Feinberg y Vogelstein (78, 79). Los cebadores utilizados son oligómeros de 14 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 se marcó con α -³²P-dCTP o con ³H-dCTP (apartado 3 de Materiales). En cada reacción se marcaron 100 ng de DNA con 10 µCi de α -³²P-dCTP o con 3,125 µCi de ³H-dCTP, debido a que estos dos compuestos tenían distinta actividad específica en las soluciones utilizadas. 100 ng de DNA contienen 80 pmoles de residuos dC y la cantidad utilizada del radioisótopo no excedió en más de un 10% a un 20% este nivel para obtener el máximo porcentaje de incorporación.

El DNA cromosómico, fragmentado y lineal, extraído según el protocolo descrito en el apartado 6.1 de Métodos, en exceso de 2 a 3 veces, se desnaturizó calentándolo en agua a 100°C de 5 a 10 minutos y tras este tiempo rápidamente se pasó a 0°C para evitar su renaturalización. Durante el protocolo seguido hasta el inicio de la reacción, se trabajó a 0°C.

Se mezclaron 12 µl del tampón de la reacción concentrado 5 veces, 12 µl de una mezcla de dNTP concentrado 5 veces que no contenía dCTP, el volumen de dCTP radiactivo que correspondía a 10 µCi de α -³²P-dCTP o a 3,125 µCi de ³H-dCTP, 100 ng del DNA desnaturizado en un volumen no superior a 30 µl y agua milliQ para ajustar el volumen a 58 µl. La reacción comenzó al añadir 2 µl, de 3 a 5 unidades, del fragmento Klenow. La solución se mezcló suavemente y se incubó

durante 60 a 90 minutos a 37°C. La reacción se detuvo pasándola a 0°C y añadiendo 10 µl de una solución a 0°C de EDTA 250mM.

La eficacia de incorporación del marcaje se determinó midiendo la cantidad de radiactividad total y la que correspondía al material precipitable para un mismo volumen. En cada reacción de hibridación se utilizaron aproximadamente 2-4x10⁶ cpm de cada radioisótopo incorporado a DNA que correspondían a entre 50 y 200 ng por cada DNA.

12.2. PREPARACION DE LOS FILTROS PARA LA HIBRIDACION

El DNA que se utilizó como marcador de diferentes posiciones cromosómicas se fijó sobre filtros de nitrato celulosa, Millipore HAWPO2412, de 25 mm de diámetro total y de 0,45 µm de diámetro de poro. Se depositaron por filtración 160 ng de DNA por kpb de la sonda sobre cada filtro. Finalmente los filtros se dividieron en 8 sectores y cada sector fue utilizado para una hibridación.

Como DNA sonda se utilizaron plásmidos aislados por el método Brij y purificados al menos dos veces por centrifugación en CsCl, para evitar toda posible contaminación cromosómica, (apartado 2 de Materiales y 6.3.2 de Métodos) y fragmentos cromosómicos obtenidos a partir de la genoteca de Kohara, tras cortar el DNA de fagos λ de esta genoteca y aislar a partir de geles de agarosa el fragmento cromosómico que contienen (apartado 2 de Materiales y 6.2 y 9.1.2 de Métodos). Los plásmidos se linearizaron digiriéndolos con la enzima *Eco* RI y el corte se verificó por electroforesis. La cantidad de DNA necesaria para ser fijada en un filtro se desnaturizó en un volumen de 3,5 ml de una solución de TE 0,5X por incubación durante 5 a 10 minutos a 100°C, y tras este tiempo se transfirió a 0°C. El volumen se aumentó hasta 5 ml, por adición de 1,5 ml de SSC 20X a 0°C, para obtener finalmente una solución de DNA en SSC 6X que se mantuvo a 0°C hasta ser filtrada.

Los filtros se humedecieron con agua y posteriormente se pasaron a una solución de SSC 6X, dos veces, y para equilibrarlos bien, se mantuvieron en cada una de ellas 30 minutos aproximadamente.

La filtración se realizó manteniendo todas las soluciones a 0°C, para evitar la renaturalización del DNA, y lentamente, de 1 a 2 ml/minuto, para permitir que el DNA se distribuyera homogéneamente sobre la superficie del filtro. El filtro se colocó en un matraz Kitasato y se vertieron sobre él unos ml de SSC 6X, después se

filtraron los 5 ml de la solución de DNA lentamente y finalmente se lavó con aproximadamente 10 ml de SSC 6X.

Tras la filtración cada filtro se cortó en 8 sectores iguales y se marcaron con un código de perforaciones de forma que permitiera una fácil identificación. Los filtros se secaron y el DNA se fijó a los filtros mediante calor manteniéndolos 4 horas a 80°C. Los filtros se conservaron, aún cuando se utilizaron al día siguiente de su preparación, en una campana de vacío, donde pueden ser almacenados hasta 6 meses. Cuando los filtros se almacenaron durante más de dos semanas el DNA se fijó de nuevo antes de su utilización.

Además de los filtros con el DNA sonda se prepararon filtros con de 5 a 7 µg de DNA de salmón sonicado y otros sin DNA, de la misma forma que los anteriores, que se utilizaron para detectar las hibridaciones inespecíficas.

12.3. HIBRIDACION

Los sectores de los filtros con el DNA sonda fijado se humedecieron durante unos 30-60 minutos a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X, formamida al 50% y 100µg/ml de DNA de salmón sonicado y desnaturalizado a pH 7-7,5.

Cada DNA cromosómico correspondiente a un estado de replicación, marcado con ³²P, se mezcló con el DNA de los cromosomas totalmente replicados, marcado con ³H (apartado 1.3 de Resultados), de forma que hubiera el mismo número de cpm de cada uno de ellos, de 4 a 8x10⁶ cpm, y la cantidad de cada DNA estuviera entre 100 y 400 ng. Se desnaturalizaron a 100°C y se reenfriaron a 0°C.

La hibridación se llevó a cabo en viales de vidrio que contenían 1 ml de la mezcla de hibridación compuesta por SSC 2X y formamida al 50%, pH 7-7,5. La mezcla de DNA desnaturalizado se dividió entre dos viales, en 2 volúmenes iguales, para realizar las hibridaciones por duplicado. A los viales se añadieron, húmedos y escurridos tras sacarlos de la mezcla de prehibridación, un sector de filtro por cada DNA sonda, uno del DNA de salmón y otro sector de un filtro sin DNA. Cada vial contenía unos 10 sectores de filtro. Los viales se cerraron herméticamente, sellándolos con papel de parafina, y se incubaron sumergidos hasta el tapón, para evitar la condensación de la solución, con agitación suave entre 40°C y 42°C durante no menos de 40 y hasta 70 horas.

12.4. LAVADO DE LOS FILTROS

Se sacaron los sectores de los filtros del vial de hibridación y rápidamente se aclararon en una solución de SSC 2X y formamida al 50% y se procedió a los lavados siguientes en un matraz con agitación suave en 25 ml de la solución de lavado. Se lavaron 2 veces durante 20 minutos a 42°C en una solución de SSC 2X y formamida al 50%, 2 veces durante 20 minutos a 42°C en Tris HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 0,3 M y EDTA 1mM y una vez durante 20 minutos a 25°C en Tris HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 10 mM y EDTA 1mM. Las soluciones de lavado se precalentaron a la temperatura a la que iban a ser usadas y para cada una de ellas los filtros se pasaron a otro matraz limpio precalentado.

12.5. RECUESTO E INTERPRETACION

Los distintos sectores de los filtros se secaron y se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de líquido de centelleo y tras mantenerlos una noche a 4°C, para eliminar las cargas estáticas, se procedió al doble recuento $^3\text{H}/^32\text{P}$ en cada uno de ellos. Para el recuento se utilizó el programa de porcentaje de referencia de doble marcaje en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

La frecuencia de un gen en una población celular creciendo exponencialmente está definida como $2^{n(1-X)}$, donde (1-X) es la distancia desde la posición cromosómica del gen al origen de replicación, relativa a 1. Por tanto, la frecuencia de un gen está determinada por su localización en el cromosoma y por el número de ciclos de replicación simultáneos por cromosoma (338). La frecuencia de cada marcador se calculó por la relación $\text{cpm } ^{32}\text{P} / \text{cpm } ^3\text{H}$ para cada sector de filtro. La frecuencia relativa al término de cada marcador se obtuvo dividiendo la relación $\text{cpm } ^{32}\text{P} / \text{cpm } ^3\text{H}$ de los distintos marcadores por la misma relación hallada para el marcador del término.

13. IDENTIFICACION DE CLONES RECOMBINANTES POR COMPLEMENTACION α

Este método se utilizó para detectar los plásmidos recombinantes obtenidos tras el ligamiento del plásmido pUC18 con el fragmento que contiene a *rpoH*.

Se utilizaron la estirpe JM83 (apartado 1 de Materiales) y el plásmido pUC18 (apartado 2 de Materiales) que codifican el extremo carboxilo y amino de la enzima β -galactosidasa respectivamente. Ambos fragmentos pueden asociarse para formar la

proteína enzimáticamente activa y este tipo de complementación, en la cual mutantes con una delección del segmento del gen *lacZ* próximo al operador son complementados por mutantes β -galactosidasa negativos que tienen la región del operador intacta, es denominada **complementación α** . Las bacterias Lac⁺ que aparecen tras la complementación α son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromógeno de la β -galactosidasa 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosido (X-gal). La inserción de un fragmento de DNA en la secuencia de clonación múltiple de pUC18 resulta, en la mayoría de los casos, en la producción de un fragmento aminoterminal que no puede complementar. Las bacterias transformadas con estos plásmidos recombinantes forman colonias blancas.

La estirpe indicadora JM83 se creció en medio rico LB a 37°C y se transformó (apartado 11 de Métodos) con la mezcla del ligamiento de pUC18 con el fragmento que contiene a *rpoH*. La bacteria transformada se sembró, tras un periodo de incubación de 90 minutos a 37°C, en placas de LA que contenían X-gal. Estas placas se prepararon vertiendo dos volúmenes de 10 ml cada uno; el primer volumen estaba compuesto por LA con ampicilina (100 μ g/ml) y tras solidificar se vertió, sobre la superficie de la capa formada, el segundo volumen que contenía además de lo anterior X-gal a 40 μ g/ml. Tras 16 horas de incubación de las placas a 37°C se mantuvieron a 4°C durante unas horas para permitir el desarrollo del color azul de forma más clara y así facilitar la distinción entre clones blancos, portadores de los plásmidos recombinantes, y clones azules, donde ha tenido lugar la complementación α .

14. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASICA

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

La determinación de la actividad β -galactosidásica se llevó a cabo siguiendo un ensayo modificado del descrito por Miller (255). La cuantificación precisa de su actividad se obtuvo realizando el ensayo con cultivos creciendo exponencialmente.

Se comenzó el ensayo tras un tiempo de incubación de unas dos generaciones. El crecimiento del cultivo se siguió midiendo su absorbencia a 600 nm. Los valores de absorbencia entre 0,2 y 0,7 fueron los más óptimos para la realización del ensayo. Se ensayaron volúmenes del cultivo de 0,1 ml, cuando se esperaban niveles altos de β-galactosidasa, y de 0,5 ml cuando los niveles de actividad fueron bajos.

Las alícuotas, de 0,1 ml o 0,5 ml, que se tomaron del cultivo se añadieron a tubos a 0°C que contenían 1 ml o 0,6 ml de tampón Z (apartado 4 de Materiales), respectivamente, 100 µl de cloroformo y 50 µl de SDS al 0,1% y se agitaron mecánicamente durante 10 segundos. Estos tubos se mantuvieron a 0°C, hasta terminar la toma de muestras, antes de llevar a cabo la reacción.

Los tubos se incubaron de 5 a 10 minutos a 28°C, temperatura a la que se realizó la reacción. La reacción comenzó tras la adición a cada tubo de 0,3 ml de una solución de ONPG a 4mg/ml en tampón Z, y agitarlo unos segundos. Se registró el tiempo durante el que se desarrolló la reacción. La reacción se detuvo, cuando se había desarrollado suficiente color amarillo para ser cuantificado, añadiendo 0,8 ml de Na₂CO₃ 1M que aumentó el pH hasta 11.

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

Las unidades de actividad de la enzima β-galactosidasa se calcularon aplicando la siguiente fórmula (255):

$$\text{unidades } \beta\text{-galactosidasa} = 1.000 \times \frac{DO_{420} - 1,5 \times DO_{550}}{t \text{ (min)} \times v \text{ (ml)} \times DO_{600}}$$

RESULTADOS

El aumento de la temperatura de incubación a un cultivo de una estirpe silvestre de *Escherichia coli* induce de forma instantánea y transitoria el inicio de replications cromosómicas suplementarias (116). Esta inducción se detectó cuantificando la cantidad de DNA sintetizado tras inhibir el inicio de la replicación en un cultivo creciendo exponencialmente a 30°C y tras la inhibición inmediatamente después de un cambio a 41°C. La mayor acumulación de DNA alcanzada por la alícuota del cultivo a la que se le aumentó la temperatura indica la aparición de nuevos ciclos de replicación inducidos por el cambio de temperatura (apartados 4.2.2 y 4.2.3 de Métodos, 160). Cuando a la alícuota del cultivo a la que se le aumentó la temperatura de incubación se le inhibió el inicio 70 minutos tras el cambio la cantidad de DNA acumulado fue la misma que la del cultivo mantenido a 30°C, lo que indica que la inducción térmica del inicio de la replicación es transitoria, restableciéndose, tras un tiempo a alta temperatura, el mismo número de orígenes por cromosoma del cultivo incubado a 30°C. El aumento de la tasa de síntesis de DNA tras el cambio de la temperatura de incubación en estas condiciones, aunque no se debe exclusivamente al incremento de la velocidad de síntesis de DNA sino a la inducción de nuevos ciclos de replicación, no afecta al número de copias del cromosoma.

1. ANALISIS DE LA INDUCCION TERMICA DEL INICIO DE LA REPLICACION

Un propósito de este trabajo ha sido el análisis y la caracterización del inicio de la replicación cromosómica inducida térmicamente. Se ha cuantificado esta termoinducción en estirpes silvestres en distintas condiciones de crecimiento, para determinar si existe cierta dependencia de ellas y establecer las condiciones más adecuadas en las que los análisis posteriores serían realizados. Con el fin de poder establecer su relación con la replicación fisiológicamente normal que inicia en *oriC* o adscribir la inducción térmica de la replicación a una respuesta de estrés ajena a la replicación normal, se han estudiado los requerimientos funcionales de la iniciación

en *oriC* en relación con los de la iniciación inducida térmicamente y se ha localizado el lugar cromosómico dónde tiene su origen.

1.1. DEPENDENCIA DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La inducción térmica del inicio de la replicación se había observado previamente a este trabajo cuando a cultivos creciendo en medio mínimo a 30°C se les aumentó la temperatura de incubación a 41°C (116). Con el objetivo de determinar la posible relación del número de orígenes en los que se induce la replicación con las condiciones de crecimiento utilizadas, se cuantificó la termoinducción de la replicación por el cambio de temperatura a 41°C en cultivos creciendo en distintas condiciones, por variación del medio de cultivo y de la temperatura de incubación.

Se creció la estirpe NF859 en medio mínimo, en este medio suplementado con casaminoácidos y en medio rico, LB, a 30°C o a 20°C y se determinó el porcentaje de orígenes que iniciaron la replicación inducidos térmicamente por el cambio de la temperatura de incubación a 41°C (apartados 2, 4.2.2 y 4.2.3 de Métodos). La cantidad de DNA acumulada tras la inhibición del inicio por la adición de rifampicina en las diferentes condiciones de crecimiento a baja temperatura y tras el cambio a 41°C se representan en la figura 5.

A partir de estas cantidades de DNA acumulado se determinaron el número de orígenes por cromosoma que tenía el cultivo en el momento de la inhibición, durante el crecimiento exponencial a 30°C o 20°C, y el porcentaje de orígenes en los que se indujo el inicio de la replicación por el cambio de temperatura a 41°C (Tabla 3). El número de orígenes por cromosoma en NF859 fue similar en todas las condiciones de crecimiento; este valor no varía en función de la temperatura de incubación durante el crecimiento equilibrado, aunque es un poco más elevado al enriquecerse el medio. Sin embargo, el porcentaje de orígenes inducidos térmicamente dependió del medio de cultivo y del rango del aumento de temperatura. Este porcentaje fue mayor en cultivos creciendo en medios más ricos y cuando el cambio de la temperatura de incubación se llevó a cabo de 20°C a 41°C. En cultivos crecidos en medio mínimo con glicerol a 30°C se obtuvo un porcentaje menor de inducción del obtenido en glucosa (resultados no mostrados).

En estos cultivos, creciendo en las diferentes condiciones y tras el cambio de temperatura, se analizó el crecimiento de la masa celular y la síntesis de DNA

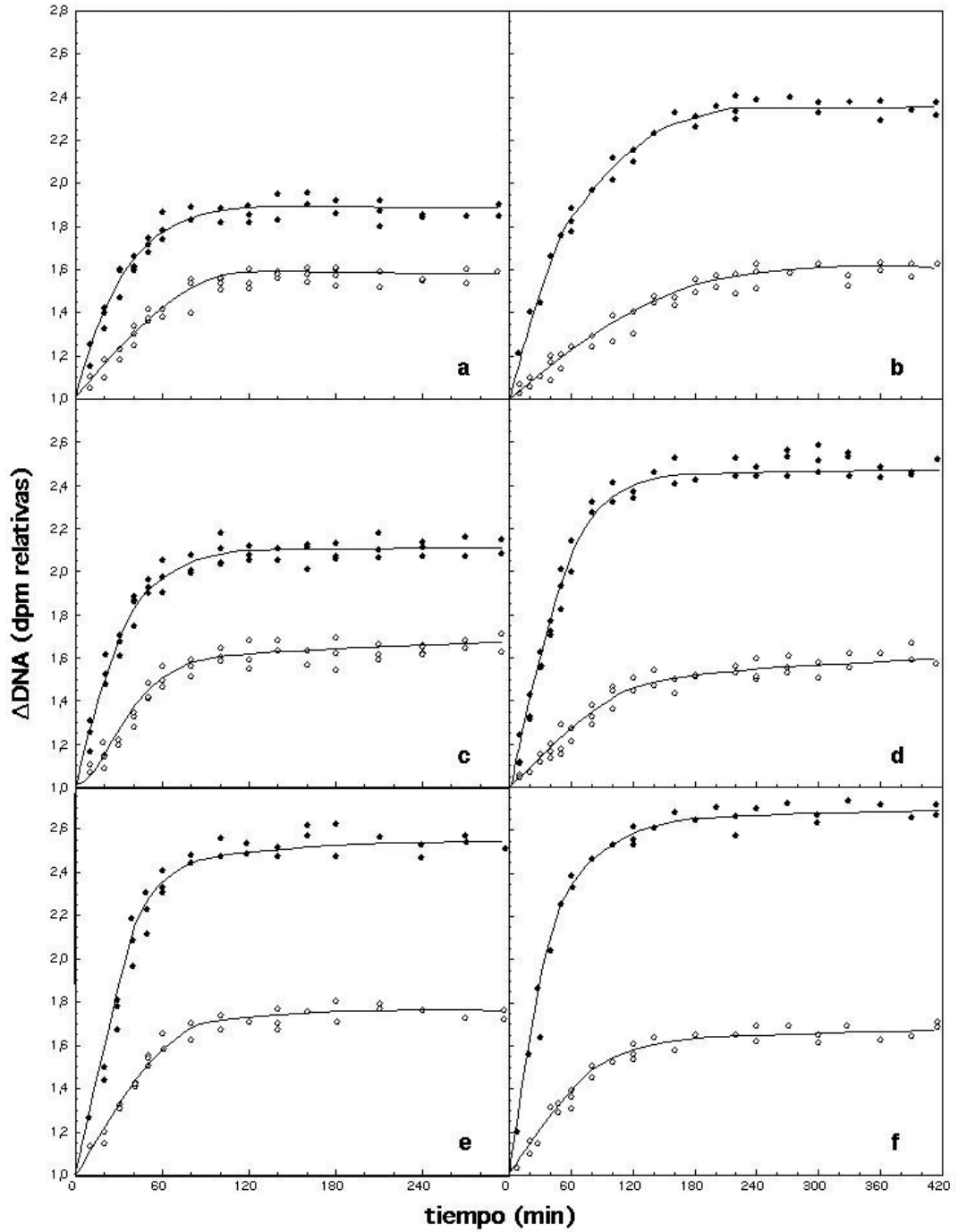


Figura 5. Acumulación de DNA tras la adición de rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) en la estirpe NF859 a 30°C (○ a, c, e) o 20°C (○ b, d, f) y junto con el cambio a 41°C (●) creciendo en medio mínimo (a,b), en este medio suplementado con casaminoácidos (c,d) y en medio rico LB (e,f).

Tabla 3. Número de orígenes por cromosoma a 30°C o a 20°C y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41°C, en la estirpe NF859 creciendo en medio mínimo (**MM9**), en medio mínimo suplementado con casaminoácidos (**MM9 casaa**) y en medio rico (**LB**).

Temperatura de incubación	MM9		MM9 casaa		LB	
	orígenes	inducción (%)	orígenes	inducción (%)	orígenes	inducción (%)
30°C	2,71	18,24%	2,88	29,48%	3,43	46,00%
20°C	2,79	46,91%	2,79	56,29%	3,08	62,08%

y a partir de estos valores se obtuvo la relación DNA/masa que presentaron durante el crecimiento (apartados 1 y 4.2.1 de Métodos). La determinación de la velocidad de la síntesis de la masa y del DNA durante el crecimiento exponencial, a partir de la pendiente de la recta de los logaritmos de las medidas del crecimiento en masa y de síntesis de DNA, permiten conocer la frecuencia de iniciación de la replicación. El mantenimiento de una relación DNA/masa constante a lo largo del crecimiento exponencial para cada situación de crecimiento dada, cualquiera que sea su valor, es el resultado de la acción del mecanismo de control de la replicación y las variaciones que se obtengan de la relación DNA/masa, resultado del cambio de la frecuencia de iniciación, indican una alteración de ese control. Los resultados obtenidos se representan en las figuras 6 y 7.

El crecimiento de la masa y la síntesis de DNA se mantuvieron en crecimiento equilibrado en todos los cultivos a baja temperatura, sosteniendo una relación DNA/masa constante con un valor absoluto próximo a 27,58 en todos los casos. Tras el aumento de la temperatura sólo permaneció constante este parámetro en el cultivo que creció en medio mínimo a 30°C, con un valor similar al de baja temperatura, mientras que en las restantes situaciones se obtuvo un aumento de la concentración de DNA durante el crecimiento a 41°C (Fig. 7). La variación de la relación DNA/masa es progresiva hasta estabilizarse en valores próximos al doble del inicial después de unas 2 a 3 generaciones a temperatura alta. Este aumento de la relación DNA/masa indica la pérdida del control de la replicación de forma transitoria. Esta alteración se produce en los cultivos en los que se induce un porcentaje de inicios mayor al obtenido tras el cambio de 30°C a 41°C del cultivo que creció en medio mínimo, y que finalmente lleva sólo en esas condiciones a un aumento del número de copias de cromosomas por masa.

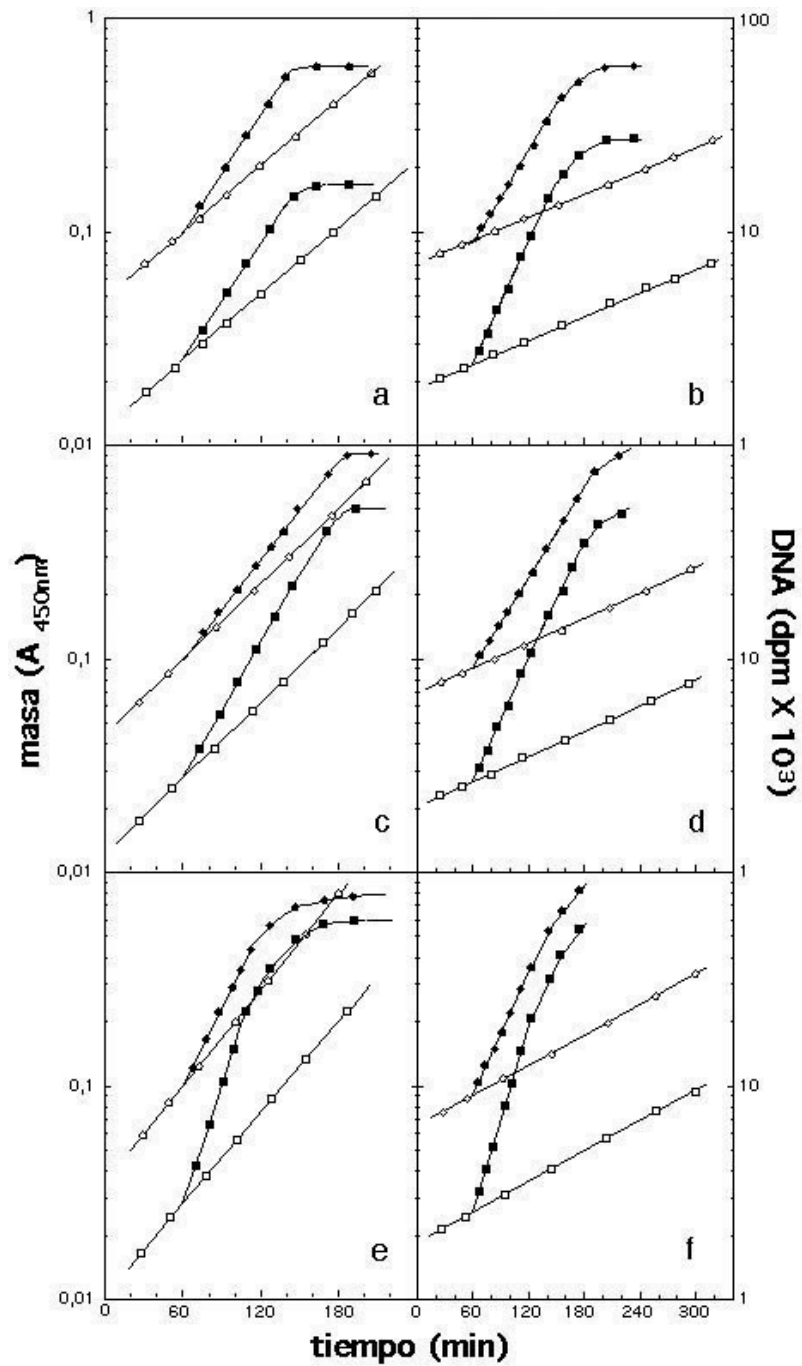


Figura 6. Crecimiento de la masa celular (O) y síntesis de DNA (□) en la estirpe NF859 a 30°C (símbolos vacíos **a, c, e**) o 20°C (símbolos vacíos **b, d, f**) y tras el cambio a 41°C (símbolos llenos) creciendo en medio mínimo (**a, b**), en este medio suplementado con casaminoácidos (**c, d**) y en medio rico LB (**e, f**).

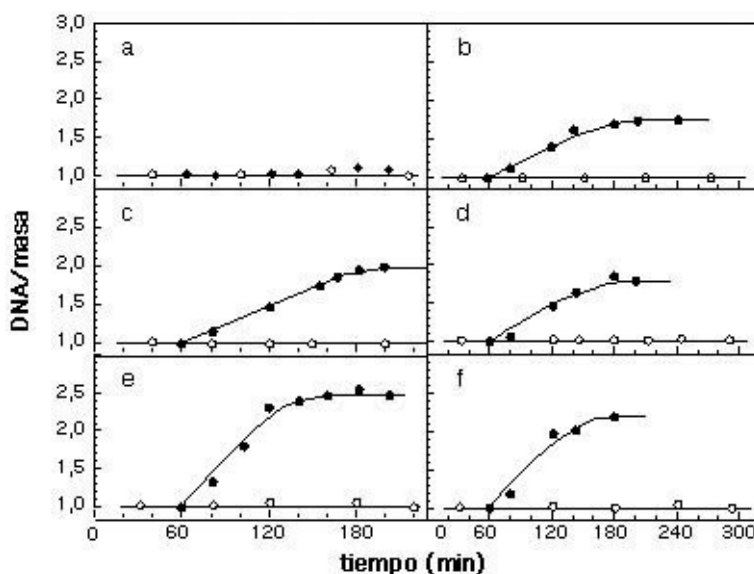


Figura 7. Relación DNA/masa en la estirpe NF859 a 30°C (○ a, c, e) o 20°C (○ b, d, f) y tras el cambio a 41°C (●) creciendo en medio mínimo (a, b), en este medio suplementado con casaminoácidos (c, d) y en medio rico LB (e, f).

Este aumento de la relación DNA/masa no es debido al establecimiento de un número de orígenes por cromosoma mayor a la temperatura alta puesto que los

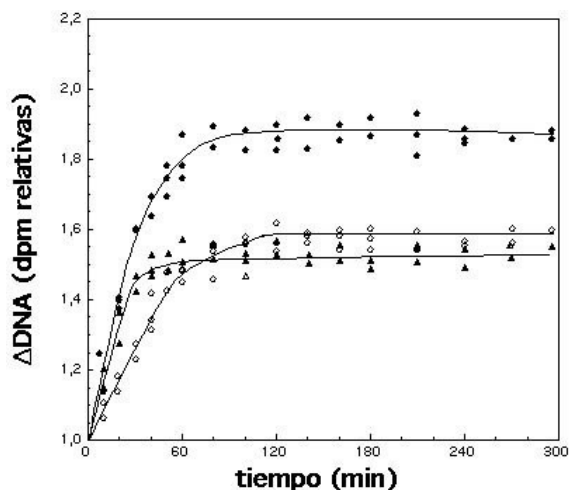


Figura 8. Acumulación de DNA en la estirpe NF859, creciendo en medio mínimo, tras la adición de rifampicina (150 μg/ml) a 30°C (○), a 41°C (▲) y junto con el cambio de 30°C a 41°C (●).

cultivos incubados en los diferentes medios a 41°C presentan un número de orígenes por cromosoma igual al de la temperatura baja (Fig. 8). La acumulación de DNA de un cultivo de NF859 crecido a 41°C alcanza valores similares a los del cultivo incubado a temperaturas más bajas, pero en menor tiempo, de igual forma que la acumulación observada cuando a alícuotas sometidas al aumento de la temperatura de incubación se les inhibe el inicio de la replicación tras un largo periodo de incubación a la temperatura alta (116).

1.2. REGULACION DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA

El inicio de la replicación cromosómica en *oriC* requiere las actividades de transcripción en la región del origen (5, 12, 204, 250) y de síntesis de proteínas (118, 119, 179, 233). Así, la adición de rifampicina, inhibidora de la actividad de la RNA polimerasa, o la carencia de los aminoácidos requeridos o la adición de cloranfenicol, que inhiben la síntesis de proteínas, impiden el inicio de posteriores ciclos de replicación a la vez que permiten la terminación de los ya iniciados. Con el fin de caracterizar el inicio de las replications que se inducen por el incremento de temperatura se determinó la necesidad de estas funciones en la inducción térmica de la replicación.

Estos requerimientos se determinaron en la estirpe NF859 mediante la cuantificación del DNA acumulado llevando a cabo en primer lugar el inicio del tratamiento inhibitor y procediendo al cambio de temperatura a diferentes tiempos posteriores, para asegurar la completa inhibición de los inicios normales de replicación y de la actividad RNA polimerásica o de la síntesis de proteínas.

A un cultivo de NF859 creciendo exponencialmente a 30°C se le añadió rifampicina o se le sometió a la carencia de los aminoácidos que requiere (apartado 2 de Métodos) y a diferentes tiempos posteriores al inicio de cada tratamiento, 0, 20, 40 y 70 minutos, se transfirió una alícuota a 41°C. El crecimiento en masa del cultivo de NF859 tras el inicio de los tratamientos inhibidores se determinó para comprobar que ambos tratamientos detenían la síntesis macromolecular. El valor final de absorbencia no superó en ningún caso el 25% respecto al valor en el momento del inicio del tratamiento (datos no mostrados). La cantidad de DNA acumulado desde el inicio de cada tratamiento inhibitor se cuantificó en las diferentes alícuotas en las que se dividió el cultivo inicial (Fig. 9). La inhibición con rifampicina de la actividad de la RNA polimerasa y del inicio de la replicación es inmediata, mientras que tras la carencia de aminoácidos la inhibición de la síntesis de proteínas es inmediata pero la inhibición del inicio de la replicación experimenta unos minutos de retraso. Por esto la acumulación de DNA obtenida finalmente tras la carencia de aminoácidos supera a la acumulación tras la adición de rifampicina y su valor no se ha considerado en la estimación de los parámetros de la replicación (38). Los resultados obtenidos tras la adición de cloranfenicol fueron similares a los obtenidos con la carencia de aminoácidos (datos no mostrados).

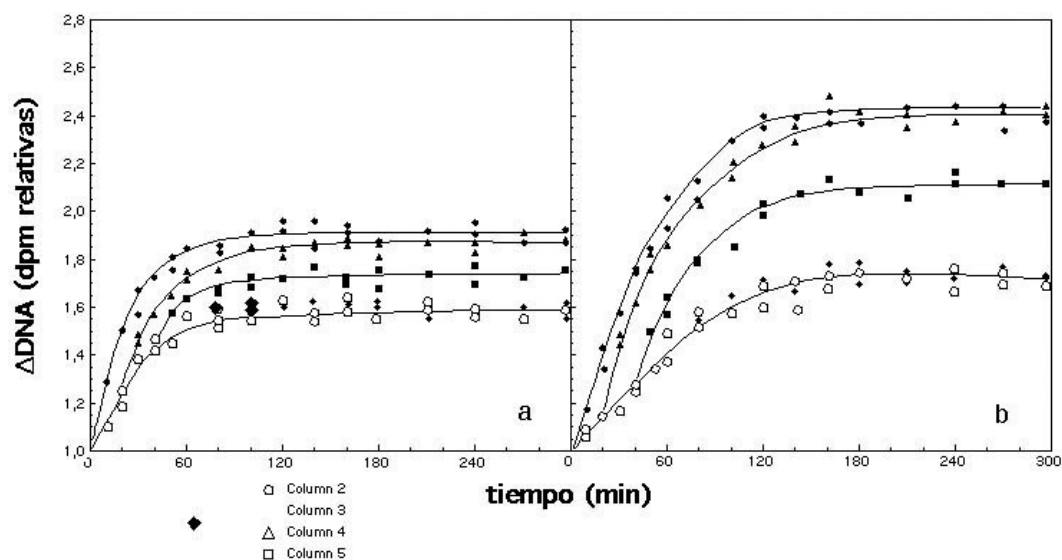


Figura 9. Acumulación de DNA en la estirpe NF859, creciendo en medio mínimo a 30°C, tras la adición de rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) (a) o la carencia de los aminoácidos requeridos (b) a tiempo cero (O). A los 0 (●), 20 (▲), 40 (■) y 70 (◆) minutos del inicio del tratamiento inhibitor una alícuota del cultivo se incubó a 41°C.

Estos resultados muestran que la replicación termoinducida no incluye en su inicio un paso sensible a rifampicina y no requiere la síntesis de proteínas *de novo*. La inhibición de la actividad de la RNA polimerasa (Fig. 9 a) o de la síntesis de proteínas (Fig. 9 b) no impide la termoinducción de nuevos ciclos de replicación. El cambio de temperatura tras al menos 20 minutos del inicio del tratamiento inhibitor permite alcanzar un porcentaje de inducción de inicios similar al obtenido con el tratamiento simultáneo, de adición de rifampicina o carencia de aminoácidos y cambio de temperatura. Tras 40 minutos el porcentaje de orígenes inducidos es aproximadamente la mitad y al distanciar 70 minutos la inhibición del inicio del cambio de temperatura no hay termoinducción de la replicación. Por tanto el inicio de la replicación termoinducida tiene lugar en ausencia de la actividad de la RNA polimerasa y de síntesis de proteínas, manteniéndose el máximo de inducción por el cambio de temperatura al menos hasta 20 minutos después de su inhibición. Este hecho pone de manifiesto una gran diferencia entre esta replicación termoinducida y la replicación fisiológicamente normal.

Trabajos realizados por Guzmán et al. concluyeron en la asignación, por primera vez en estudios realizados *in vivo*, de la función inhibitoria de ppGpp sobre el inicio de la replicación cromosómica en *E. coli* y la de otros replicones plasmídicos y ha sido sugerida la posibilidad de que este nucleótido, mediador de la respuesta restringida, provea el mecanismo necesario para el acoplamiento entre el crecimiento celular y la tasa de iniciación (apartado 1.3.2.1 de Introducción). También está

descrito su efecto inhibitor sobre la replicación estable constitutiva (368). Tras el aumento de la temperatura de incubación de un cultivo las células pueden mostrar síntomas de carencia de aminoácidos acompañados por una acumulación transitoria de ppGpp (apartado 2.1 de Introducción).

Para analizar si el inicio de la replicación termoinducida depende de los niveles de ppGpp, se estudió el efecto de diferentes niveles celulares del nucleótido sobre la inducción térmica de la replicación. Se trabajó en condiciones en las que la diferencia de su concentración estuviera establecida ya antes del cambio de temperatura, y no dependiera de un ajuste diferente de sus niveles tras el cambio, porque como se estableció con el experimento anterior el inicio de la replicación termoinducida no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas para ser inducido. Para este análisis se utilizó la estirpe NF859 y el mutante para la respuesta restringida NF1035, *relA2 relX*, que reduce los niveles basales de ppGpp de 10 a 15 veces (285). El uso de este mutante permitió analizar el efecto de un nivel de ppGpp más bajo, previo al cambio de temperatura, sin tener que alterar la fisiología celular por otros estrés para modificar su síntesis.

La acumulación de DNA se analizó tras la adición de rifampicina a 30°C y junto con el cambio a 41°C en las estirpes NF859 y NF1035 creciendo en medio mínimo. Los resultados obtenidos (Fig. 10) indican que este tipo de inducción de la

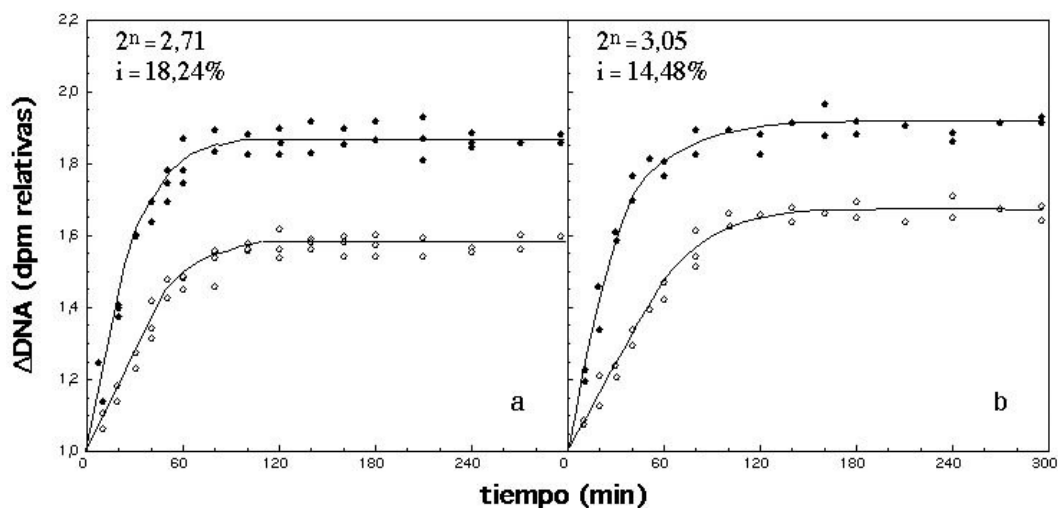


Figura 10. Acumulación de DNA en las estirpes NF859 (a) y NF1035, *relA2 relX*, (b), creciendo en medio mínimo, tras la adición de rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C (○) y junto con el cambio a 41°C (●).

replicación no es inhibido por ppGpp. Aunque el número de orígenes por cromosoma (2^n) es algo superior en el mutante, el porcentaje de inducción de nuevos inicios (*i*) fue similar en ambas estirpes. Por tanto, el inicio de la replicación termoinducida no está bajo control restringido, es decir es insensible a ppGpp. El reducido nivel de ppGpp en la estirpe mutante podría haber elevado el porcentaje de inicios inducidos si esta replicación, al igual que las citadas anteriormente, fuera regulada negativamente por ppGpp, al menos si no existiera en esas condiciones otro factor que limitara la inducción.

1.3. LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL ORIGEN DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA

En condiciones fisiológicas normales *oriC* es el único lugar cromosómico para el inicio de la replicación, tanto sus características estructurales como las interacciones funcionales que en él tienen lugar lo favorecen y determinan que así sea (apartado 1.2.1 de Introducción). La viabilidad de los cultivos sometidos a un aumento de la temperatura de incubación y los resultados de acumulación de DNA obtenidos tras la inhibición del inicio de la replicación junto con el cambio de temperatura indican que las replications inducidas térmicamente son similares a las fisiológicas; sin embargo, la divergencia respecto a los requerimientos para el inicio que presenta con *oriC* establece una gran diferencia entre ambas replications (apartado 1.2 de Resultados). Con el fin de poder determinar si existe cierta dependencia entre la inducción térmica de la replicación y la replicación normal que inicia en *oriC* o adscribirla a una respuesta de estrés ajena a la replicación normal se localizó el lugar cromosómico del inicio de la replicación termoinducida.

Para localizar el origen de la replicación termoinducida se utilizó el procedimiento del análisis de la frecuencia relativa de marcadores (apartado 12 de Métodos, 242) y se llevó a cabo en condiciones en las que el inicio de la replicación desde *oriC* está inhibido. Se sometieron al cambio de temperatura cultivos creciendo en medio mínimo, utilizando las condiciones experimentales en las que la inducción de la replicación alcanzó el máximo porcentaje en estas condiciones de crecimiento.

A un cultivo de NF859 creciendo exponencialmente en medio mínimo suplementado con casaminoácidos a 20°C se le añadió rifampicina cuando alcanzó 0,1 unidades de absorbencia, medida a 450 nm, para impedir el inicio de nuevos ciclos de replicación. Tras 15 minutos desde la adición de la droga una alícuota del cultivo se incubó a 41°C durante 10 minutos, para permitir la continuación de las replications iniciadas en estas condiciones, y el resto se mantuvo a 20°C. Inmediatamente tras este periodo se añadió a los cultivos cianuro potásico en

tampón TE a 0°C, a una concentración final 35mM, para detener más rápidamente las replications en marcha. Las células de los cultivos a 20°C y a 41°C se recuperaron por centrifugación y se procedió a la extracción y purificación de su DNA como se describe en el apartado 6.1 y 7 de Métodos. Este DNA se referirá como “DNA exponencial”. Una porción del mismo cultivo de NF859 se creció hasta alcanzar una densidad óptica elevada, aproximadamente de 0,75 unidades de absorbencia, momento en el que se le añadió rifampicina, para inhibir posteriores iniciaciones, y se continuó la incubación durante un tiempo equivalente a cuatro generaciones para asegurar la terminación de todas las replications ya iniciadas y obtener los cromosomas totalmente replicados. Se recogieron las células y se procedió a la extracción y purificación de su DNA como en el caso anterior. Este DNA se citará como “DNA lineal”.

El DNA se marcó por el sistema de extensión de cebadores aleatorios, oligonucleótidos que ceban la replicación del DNA al azar, usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Se utilizó ³²P-dCTP para marcar el DNA exponencial, y ³H-dCTP para el DNA lineal (apartado 12.1 de Métodos). Cada uno de los DNA exponenciales, correspondientes al cultivo a 20°C y tras el cambio a 41°C, se mezclaron con el DNA lineal. La mezcla final contenía aproximadamente 3,5x10⁶ cpm de cada uno de ellos en 230 ng de DNA total. Las mezclas se desnaturalizaron y se hibridaron con varios marcadores de DNA cromosómico fijados sobre filtros de nitrocelulosa (apartado 2 de Materiales). La relación DNA libre/DNA fijado se ajustó a un valor de 1/500 por kpb de secuencia homóloga. Las hibridaciones se llevaron a cabo por duplicado en las condiciones que se describen en el apartado 12.3 de Métodos.

Tras el lavado de los filtros y la cuantificación de la radiactividad que permaneció fijada a ellos se determinó la relación ³²P/³H para cada marcador cromosómico utilizado y se obtuvo la frecuencia relativa al término, dividiendo cada uno de estos valores por la misma relación obtenida en el caso del marcador del término, el plásmido pK5 (apartados 12.4 y 12.5 de Métodos). Las frecuencias relativas al término de las dos determinaciones realizadas para cada sonda utilizada se representan en la figura 11 en las posiciones correspondientes del mapa genético para cada secuencia homóloga.

En la figura 11 se puede observar el aumento de la frecuencia de la secuencia que contiene a *oriC* tras el cambio de temperatura (Fig. 11 b), con respecto a la frecuencia que presenta esa secuencia en el cultivo mantenido a 20°C (Fig. 11 a), y el mantenimiento de la frecuencia del resto de los marcadores utilizados. Las

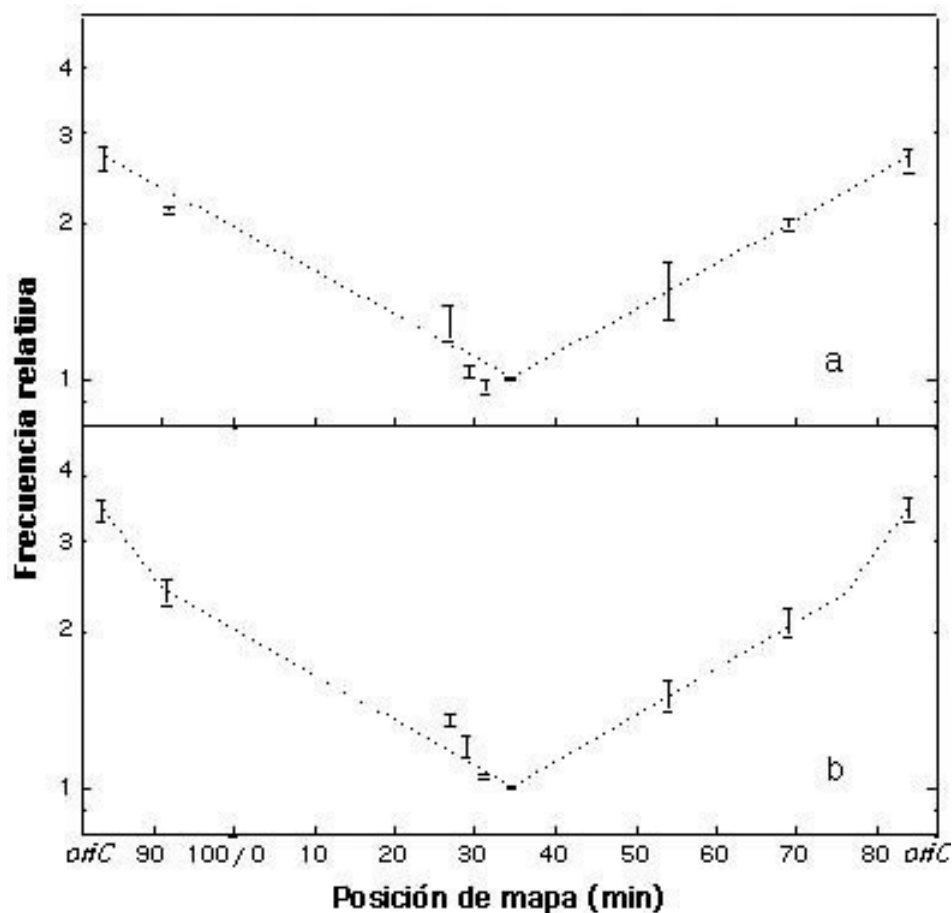


Figura 11. Distribución de las frecuencias relativas de marcadores obtenidos en NF859 creciendo en medio mínimo con glucosa y casaminoácidos a 20°C (a) y tras 10 minutos a 41°C (b), en ambos casos 25 minutos después de la adición de rifampicina (150 µg/ml). Se representan las dos determinaciones hechas para cada marcador en la posición de la secuencia homóloga correspondiente en el mapa genético de *E. coli*. Las líneas de puntos representan la curva esperada si la iniciación es sincrónica a ambos lados de *oriC*.

relaciones origen / término obtenidas por este procedimiento fueron 2,66 en el cultivo que se mantuvo a 20°C y 3,41 tras el aumento de temperatura. Este resultado indica que la región de *oriC* es el lugar donde se inician las replications inducidas por el cambio de temperatura, aún en ausencia de la actividad de la RNA polimerasa.

1.4. ANALISIS DE LA ACUMULACION DE DNA

Bremer y Churchward desarrollaron un análisis de la acumulación de DNA obtenida tras la inhibición del inicio de la replicación que permite conocer ciertos

parámetros de la replicación (38). En él definieron las funciones Υ y Γ , que transforman los datos de acumulación obtenidos, como:

$$\begin{aligned}\gamma_t &= 2^{t/\tau} - \Delta G_t \\ \Gamma_t &= \Delta G_\infty - \Delta G_t\end{aligned}$$

Estas funciones son casi parabólicas y por tanto al representar $\sqrt{\Upsilon}$ y $\sqrt{\Gamma}$ frente al tiempo, t, se obtienen líneas casi rectas que pueden presentar cierta dispersión en valores próximos a cero. La intersección de la curva $\sqrt{\Upsilon}$ con el eje del tiempo señala el momento en el que se produce la inhibición de los inicios, comenzando a decrecer la tasa de replicación relativa a la del crecimiento exponencial, lo que permite conocer si existe un retraso en la inhibición del inicio con el tratamiento utilizado. La extrapolación de la curva $\sqrt{\Gamma}$ con el eje del tiempo indica el tiempo que transcurre hasta que los puntos de replicación se detienen tras la inhibición del inicio; se determina así el valor del periodo C máximo que se establece desde el tiempo en el que se produce la inhibición y que puede diferir del valor de C del cultivo anterior a la inhibición que se obtiene a partir del valor final alcanzado en la acumulación (ΔG).

Los resultados experimentales de acumulación de DNA obtenidos en NF859 creciendo en distintas condiciones, presentados en el apartado 1.1, se analizaron transformándolos con las ecuaciones $\sqrt{\Upsilon}$ y $\sqrt{\Gamma}$ para conocer los parámetros que definen estas funciones en el caso de la replicación termoinducida. Para determinar si las características específicas encontradas eran propias de la replicación inducida por el cambio de temperatura, este análisis también se llevó a cabo con los resultados de acumulación obtenidos tras la adición de rifampicina a un cultivo incubado durante todo su crecimiento a baja temperatura y a 41°C (Fig. 8).

Tras el análisis de los resultados de acumulación se obtuvieron los valores para las funciones $\sqrt{\Upsilon}$ y $\sqrt{\Gamma}$ que se representan en la figura 12. Los cultivos crecidos a una temperatura constante, baja o alta, ajustaron los valores transformados de la acumulación a ecuaciones lineales para ambas funciones, sin embargo en la transformación de la acumulación de DNA de las alícuotas sometidas a cambio de temperatura se obtuvieron valores que necesitaron el ajuste a dos rectas con diferentes pendientes.

Para los cultivos creciendo a temperatura constante el punto de corte con el eje de abscisas de la función $\sqrt{\Upsilon}$ fue en el tiempo cero, o muy próximo, ya que el tratamiento con rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) inhibe inmediatamente el inicio de la replicación (38). En este caso la extrapolación de $\sqrt{\Upsilon}$ determinó, según la

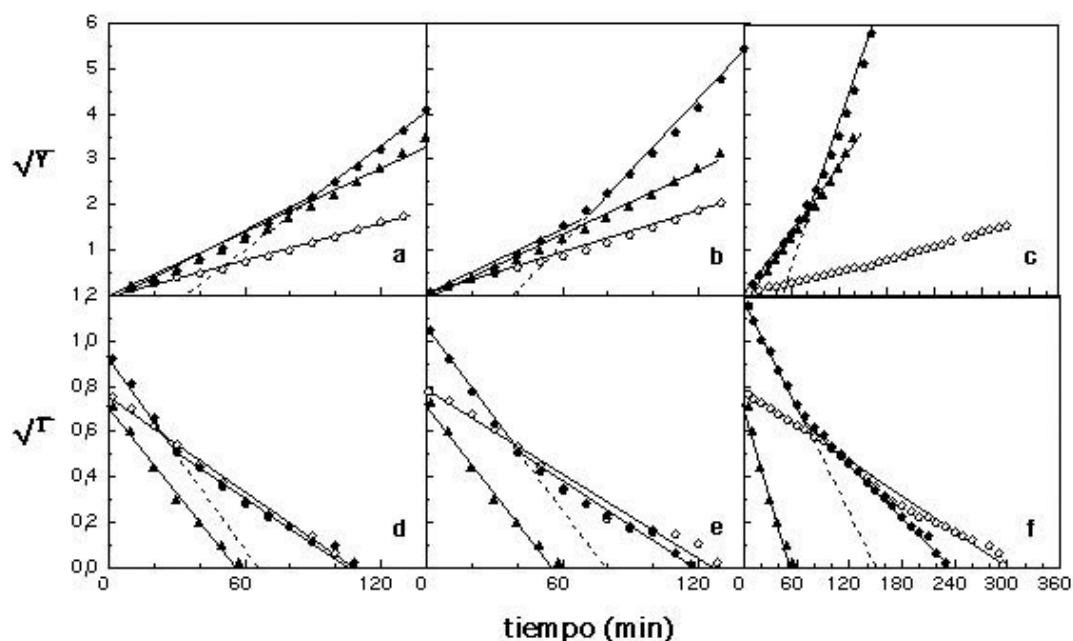


Figura 12. Funciones \sqrt{Y} (a, b, c) y \sqrt{T} (d, e, f) calculadas a partir de los datos de acumulación de DNA obtenidos tras el tratamiento con rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) en la estirpe NF859 (Figs. 5 y 8). Funciones de los datos obtenidos en medio mínimo a 41°C (\blacktriangle), a 30°C (\circ a, d) y a 20°C (\circ c, f) y en medio mínimo suplementado con casaminoácidos a 30°C (\circ b, e) y tras el cambio a 41°C (\bullet a, b, c, d, e, f).

temperatura de incubación del cultivo, diferentes valores para el tiempo de parada de los puntos de replicación tras la inhibición, de aproximadamente 60, 120 y 300 minutos para 41°C, 30°C y 20°C, respectivamente.

Para los valores de acumulación obtenidos tras la inducción de la replicación térmica la doble pendiente de las funciones \sqrt{Y} y \sqrt{T} parece ser debida a la presencia simultánea de dos tipos de replicación que contribuyen a la acumulación final de DNA. La simulación por ordenador de diferentes modos de acumulación de DNA sólo llevó a que la representación de las funciones estudiadas presentaran una doble pendiente cuando fue considerada la presencia simultánea de dos replications con diferente velocidad de elongación. Si se prolongan las dos pendientes de cada función por separado, línea de puntos en la figura 12, una de ellas parece ser sensible a rifampicina sin experimentar ningún retraso en la inhibición de su inicio con este tratamiento y la otra sufre un retraso en su inhibición de entre 20 y 40 minutos. En el caso de la función \sqrt{T} la pendiente de la línea a la que se ajustan sus valores tras la inhibición parece ser similar a la que presenta esta función para la replicación a 41°C; ésta corresponderá a la suma de la velocidad de síntesis de los puntos de replicación inducidos térmicamente y a la de los presentes antes del cambio de temperatura, que debido al efecto del aumento de

temperatura sobre la velocidad del proceso de elongación contribuyen con una mayor tasa de síntesis a 41°C. La segunda parte de la función con menor pendiente sería la que correspondería mayoritariamente a la síntesis de la replicación termoinducida, ya que al llegar a la etapa de terminación la replicación normal su contribución iría desapareciendo y se puede por tanto detectar la contribución de la replicación más lenta.

2. INDUCCION TERMICA DE LA REPLICACION Y LA RESPUESTA DE CHOQUE TERMICO

La inducción del inicio de la replicación analizada en este trabajo tiene lugar cuando a un cultivo se le aumenta su temperatura de incubación diez o más grados. El cambio de temperatura a un cultivo bacteriano origina alteraciones tanto termodinámicas como fisiológicas, por ello se han intentado analizar los efectos físico y biológico que el cambio de temperatura pueda tener sobre la replicación termoinducida.

Un aumento rápido de temperatura induce en todos los seres vivos una de las respuesta de estrés conocidas más universales y conservadas, la respuesta de choque térmico (apartado 2.2 de Introducción). Cuando a un cultivo de *E. coli* se le aumenta su temperatura de incubación se induce transitoriamente la síntesis de las llamadas proteínas de choque térmico implicadas en numerosas funciones celulares. Esta respuesta es dependiente del producto del gen *rpoH*, la subunidad σ^{32} de la RNA polimerasa. Está descrita la acción de varias proteínas de choque térmico en la replicación cromosómica de *E. coli* (76, 85, 98, 101, 150, 157, 170, 238, 306, 372) y la competencia entre las subunidades σ^{70} y σ^{32} por el núcleo de la RNA polimerasa (109, 113, 282, 393, 394, 403), factores que podrían influir en la inducción del inicio de la replicación por el cambio de temperatura.

Para estudiar la posible dependencia de la inducción térmica de la replicación de la alteración termodinámica y, más directamente, de la respuesta de choque térmico provocadas por el aumento de temperatura, se han llevado a cabo dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, se ha analizado la inducción de la replicación por el cambio de temperatura en estirpes mutantes que carecen del gen *rpoH* para observar el efecto termodinámico del aumento de temperatura sin la inducción de la respuesta de choque térmico y, en segundo lugar, en estirpes donde la expresión de *rpoH* es controlada exógenamente y la respuesta fisiológica de choque térmico puede ser inducida sin cambio de temperatura.

2.1. EFECTO TERMODINAMICO DEL AUMENTO DE TEMPERATURA

La estirpe KY1601 presenta una gran deleción en el gen *rpoH*, por lo que carece de la subunidad σ^{32} de la RNA polimerasa y no induce la respuesta de choque térmico tras el cambio de temperatura. Esta estirpe presenta el fenotipo más sensible a la temperatura hasta ahora descrito y sólo es viable a temperaturas igual o menores a 20°C (397, 402). El efecto termodinámico del aumento de la temperatura de incubación sobre la inducción de la replicación se estudió en la estirpe KY1601 y en su parental MC4100 donde se produce la inducción normal de esta respuesta. La síntesis de DNA tras la adición de rifampicina se determinó creciendo las estirpes MC4100 y KY1601 en medio mínimo suplementado con casaminoácidos a 20°C y tras el cambio a 41°C. Los resultados obtenidos se representan en la figura 13.

Ambas estirpes presentan aproximadamente el mismo número de orígenes por cromosoma a la temperatura baja; sin embargo, el cambio de temperatura induce el inicio de la replicación en el mutante KY1601 en un número de orígenes menor a la mitad de los inducidos en la estirpe parental, en las mismas condiciones. La diferencia encontrada en el porcentaje de inducción, puesto que ambas estirpes son isogénicas excepto para el gen *rpoH*, sólo puede ser debida a la ausencia de σ^{32} en el mutante. Este resultado pone de manifiesto cierta dependencia del mecanismo de inducción de la replicación por el cambio de temperatura y la actividad de σ^{32} . En la estirpe parental el porcentaje de inducción de inicios obtenido es el resultado de los efectos del cambio de temperatura y de la acción de σ^{32} , mientras que en el mutante, al eliminarse la contribución de σ^{32} , sólo se observa el efecto del cambio de temperatura, que no causa el porcentaje de inducción que se obtiene en el parental.

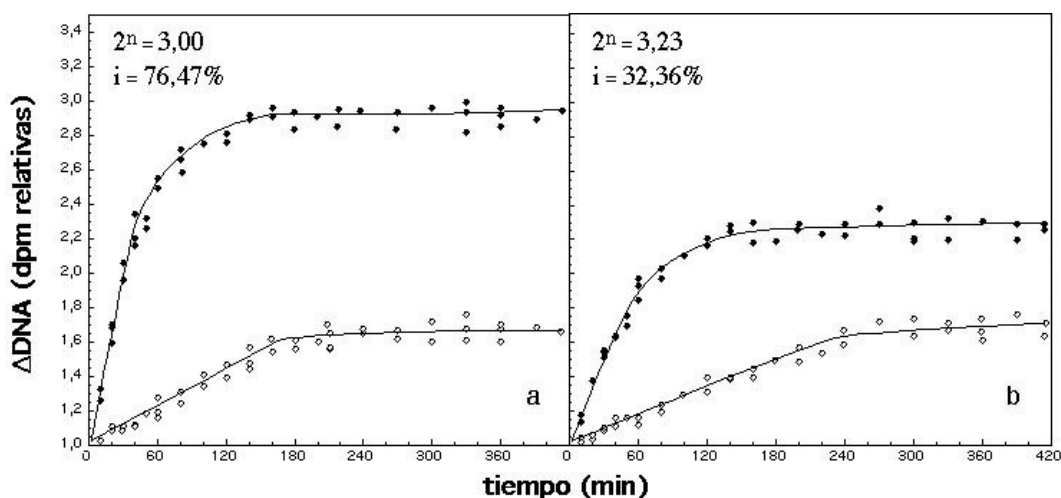


Figura 13. Acumulación de DNA en las estirpes MC4100 (a) y KY1601, $\Delta rpoH30$, (b), creciendo en medio mínimo con casaminoácidos, tras la adición de rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) a 20°C (○) y junto con el cambio a 41°C (●).

2.2. LA RESPUESTA DE CHOQUE TÉRMICO

Para determinar la influencia de la respuesta fisiológica de choque térmico sobre la inducción de la replicación eliminando la alteración termodinámica que ejerce el cambio de temperatura, se clonó el gen *rpoH* de forma que el control de su expresión fuera exógeno. Con este control se estudió el efecto de la inducción de su expresión sobre la replicación en estirpes silvestres y en el mutante $\Delta rpoH$ a temperatura constante y tras su aumento.

2.2.1. Clonación y control del gen *rpoH*

El gen *rpoH* se clonó bajo el control de la zona reguladora del operón lactosa de los plásmidos pUC18 y pALO15. El vector de clonación que se utilizó fue el plásmido pUC18 donde *rpoH* se situó tras el promotor *lac*. El plásmido pALO15, compatible con pUC18, es portador del gen *lacI* y se utilizó como fuente de represor. Esta clonación permitió el control exógeno de la síntesis de σ^{32} por inducción de *POlac-rpoH* tras la adición de IPTG, en ausencia de un cambio de temperatura.

El plásmido pUC18 se digirió con la enzima *Hind* II para la que posee un único sitio de restricción en su secuencia de clonación múltiple generando los extremos que se detallan en la figura 14.

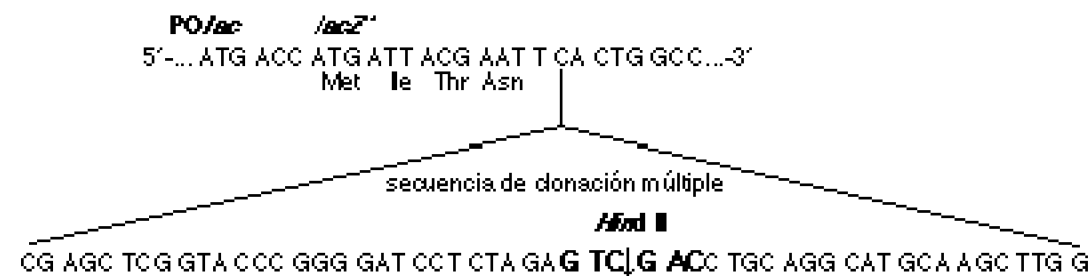


Figura 14. Punto de corte de *Hind II* en el plásmido pUC18.

El fragmento de DNA que contiene el gen *rpoH* se obtuvo digiriendo el plásmido pFN97 con la enzima *Eco RV* para la que posee dos puntos de corte, uno de ellos 19 nucleótidos anteriores al codón de iniciación del gen (Fig. 15). Este corte genera un fragmento de 1,3 kpb que contiene al gen *rpoH* sin sus secuencias promotoras. El ligamiento de este fragmento con pUC18 digerido con *Hind II* restaura la fase de lectura del codón de iniciación de *lacZ* para la síntesis correcta de σ^{32} .

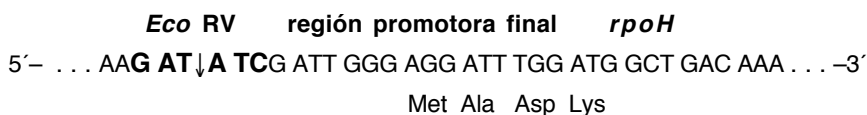


Figura 15. Corte de *Eco RV* en pFN97 anterior a la secuencia estructural de *rpoH*.

Para facilitar la selección del plásmido recombinante que se buscaba, debido a que el plásmido pFN97 y el vector de clonación confieren ambos resistencia a ampicilina, la reacción de corte de pFN97 se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% con el fin de recuperar el fragmento *Eco RV* que contiene a *rpoH* a partir del gel por el método de electroforesis sobre membrana de diálisis (apartado 9.1.1 de Métodos). El ligamiento del fragmento aislado con el plásmido pUC18 linearizado se realizó con la DNA ligasa del fago T4 (apartado 8 de Métodos).

Para identificar los plásmidos recombinantes se transformó a la estirpe indicadora JM83, que permite la complementación α de la β -galactosidasa, con los productos del ligamiento. Las bacterias transformadas se sembraron sobre placas de medio rico (LA) con ampicilina y X-gal. De los transformantes aparecidos un 15% correspondió a los portadores de plásmidos recombinantes, seleccionables fenotípicamente por el color blanco de la colonia frente al resto de clones de color azul (apartado 13 de Métodos).

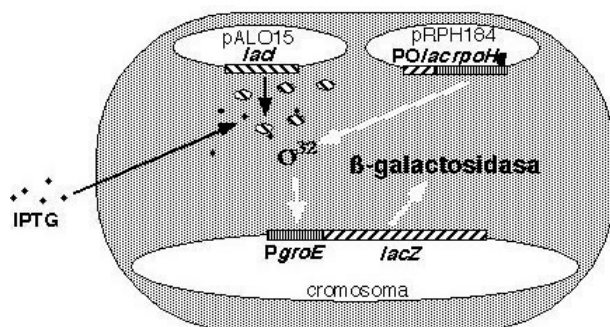


Figura 16. Estrategia para la selección del plásmido *pRPH184* y la cuantificación de la actividad de σ^{32} en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*).

expresión del gen *lacZ* del cromosoma está regulada por la transcripción iniciada en el promotor de choque térmico del operón *groE*. La adición de IPTG a esta estirpe transformada con el plásmido recombinante con el gen *rpoH* en la orientación correcta inducirá la síntesis de σ^{32} sin cambio de temperatura y detectable mediante la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa (Fig.16).

La clonación del gen *rpoH* funcional se determinó mediante la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa en varios clones de plásmidos recombinantes (apartado 14 de Métodos). Los resultados obtenidos se representan en la figura 17. Los niveles basales que presenta la estirpe transformada con *pUC18* y *pALO15* son debidos a que la transcripción del gen *lacZ* desde el promotor *groE* es no sólo dependiente de los niveles celulares de σ^{32} en esas condiciones sino de la regulación adicional de este promotor por σ^{70} (402). Cuando la actividad de estirpes transformadas con plásmidos recombinantes fue similar a la de MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*)/*pUC18pALO15* en las condiciones estudiadas se consideró que contenían el fragmento con *rpoH* clonado en la orientación inversa a la necesaria para su correcta expresión (Fig. 17 a). La actividad basal de la β -galactosidasa detectada a 30°C en la estirpe control, MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*)/*pUC18pALO15*, fue similar en todos los clones comprobados, de 120 a 150 unidades. Tras la adición de IPTG la actividad β -galactosidasa aumentó a lo largo del periodo de incubación hasta alcanzar unos niveles cercanos a las 600 unidades en aproximadamente la mitad de los clones con plásmidos recombinantes y estos fueron los que se consideraron portadores del plásmido que se buscaba (Fig. 17 b). El cambio de temperatura indujo la expresión de *lacZ* en la estirpe transformada con *pUC18* y con los dos tipos de plásmidos recombinantes en la misma extensión,

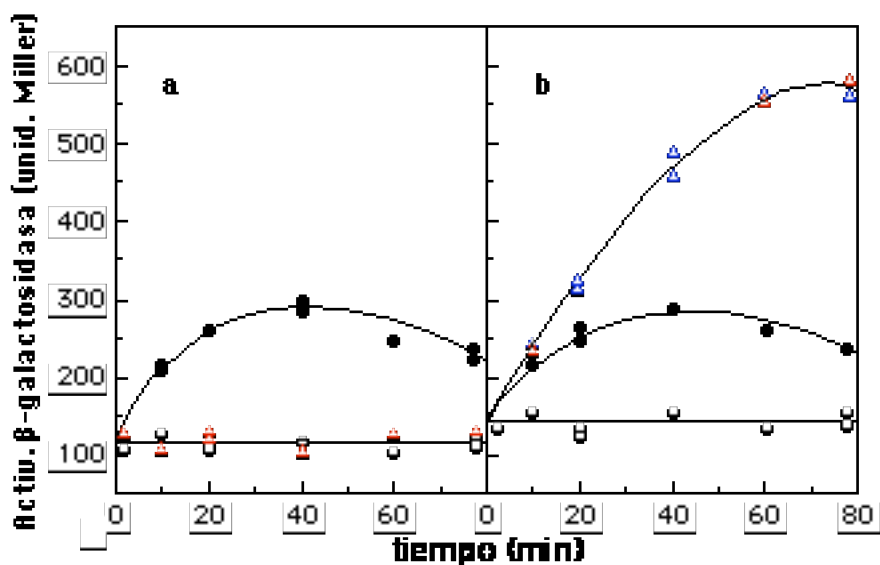


Figura 17. Actividad β -galactosidásica (unidades Miller) en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*)/pUC18pALO15 y en las portadoras de plásmidos pUC18 recombinantes con *rpoH* en la orientación inversa (a) y en la orientación correcta (b), en medio mínimo con glicerol a 30°C (○), tras la adición de IPTG 1mM (Δ) y tras el cambio de temperatura de 30°C a 41°C (●).

alcanzando valores finales de actividad aproximadamente el doble de los niveles basales. Se seleccionó así un plásmido al que se denominó pRPH184 y que se representa en la figura 18.

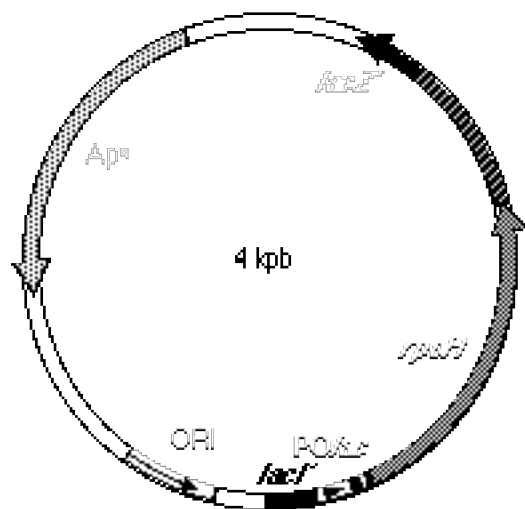


Figura 18. Plásmido pRPH184, que contiene el gen *rpoH* clonado tras la zona de control del operón lactosa.

Los datos de acumulación de la actividad de la β -galactosidasa obtenidos (Fig. 17) se transformaron para conocer la cinética de la respuesta de choque térmico tras la inducción de σ^{32} desde pRPH184. La tasa relativa de síntesis de β -galactosidasa obtenida por el aumento de la temperatura a la estirpe control, MC4100:: λ pF13 – (*PgroE-lacZ*)/pUC18pALO15 y tras la inducción por la adición de IPTG a los clones portadores de pRPH184, se representa en la figura 19. Durante los primeros minutos la actividad de σ^{32} induci-

da desde pRPH184 muestra la cinética de inducción característica de la respuesta de choque térmico que se obtiene por el aumento de temperatura, alcanzándose la tasa máxima entre los 5 a 10 minutos siguientes a la inducción. Posteriormente la inducción de σ^{32} desde pRPH184 no sigue el modelo de inducción transitoria característico de la respuesta de choque térmico, debido a la presencia de su inductor en el medio, manteniéndose una tasa elevada durante unos 30 minutos para después comenzar a descender, debido a la falta del incremento proporcionado de la síntesis de proteínas de choque térmico en condiciones de sobreproducción de σ^{32} (336).

La actividad de la β -galactosidasa se cuantificó en distintas condiciones de crecimiento: en medio mínimo con glucosa o glicerol a 30°C, tras la adición de IPTG y tras el cambio de temperatura a 41°C, en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada con pUC18 y pALO15, con pRPH184 o con pRPH184 y pALO15 para determinar la actividad de σ^{32} en las diferentes situaciones experimenta-

les. En la tabla 4 se indica la media de los valores de la actividad β -galactosidásica obtenidos para las distintas estirpes en las condiciones de crecimiento estudiadas; tras la adición de IPTG y del cambio de temperatura se expresan los valores a los que se estabiliza la actividad. La actividad β -galactosidásica que presenta la estirpe control es solamente inducida por el cambio de temperatura del cultivo hasta estabilizarse en un nivel 1,85 veces superior al que presenta a 30°C, en ambos medios. El nivel de actividad ligeramente mayor detectado en esta estirpe en el medio que contiene glicerol puede ser debido a la regulación de *rpoH* desde uno de sus promotores, P5, reconocido por σ^{70} que es sensible a catabolitos (259). En la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada únicamente con pRPH184 los niveles de expresión de β -galactosidasa son indicadores de la actividad de σ^{32} cuando es

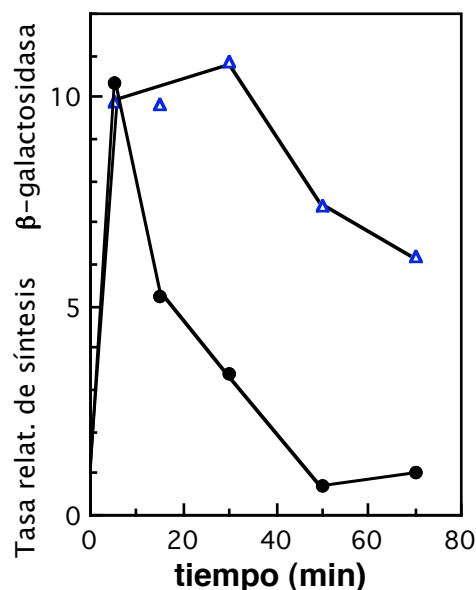


Figura 19. Tasa relativa de síntesis de la enzima β -galactosidasa tras el cambio de temperatura de 30°C a 41°C en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) / pUC18 pALO15 (●) y tras la adición de IPTG (1mM) a la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) / pRPH184 pALO15 (▲). La tasa de síntesis se calculó multiplicando la actividad de la enzima por la densidad óptica del cultivo, para cada valor representado en la figura 17, y el incremento de la actividad así calculada para cada intervalo de tiempo se dividió por el incremento de la densidad óptica. La tasa de síntesis se representada en el punto medio de cada intervalo.

expresada constitutivamente desde un plásmido con alto número de copias. Ya que la síntesis de σ^{32} está regulada en pRPH184 desde la zona de control del operón *lac*, los niveles de β -galactosidasa son constantes tras las condiciones de inducción estudiadas debido al defecto del represor LacI y claramente superiores en el medio con glicerol, debido a los niveles superiores de cAMP; en todos los casos se alcanzaron valores superiores a los inducidos por el cambio de temperatura en la estirpe control. En la estirpe con los plásmidos pRPH184 y pALO15 la actividad β -galactosidásica es inducible por IPTG y por cambio de temperatura. En condiciones de no inducción presenta niveles basales muy similares a la estirpe control, aunque ligeramente superiores, y estos niveles aumentan tras el cambio de temperatura en una relación similar a la estirpe control. La inducción de la síntesis de σ^{32} por IPTG en esta estirpe, sin el cambio de temperatura, conduce a un aumento de su actividad de unas 4 veces en glicerol y de 2 en glucosa. Por tanto tras la inducción de σ^{32} desde pRPH184 por la adición de IPTG se alcanzan en glucosa unos niveles de actividad más fisiológicos que tras la inducción en glicerol.

La funcionalidad del gen clonado se determinó también por análisis de complementación de mutantes *rpoH*. Las estirpes CAG2015, KY1429 y KY1436 contienen mutaciones ámbar en *rpoH*, suprimida a baja temperatura en CAG2015 por un supresor termosensible o sin supresores en KY1429 y KY1436, y aunque

Tabla 4. Valores medios de la actividad β -galactosidásica (unidades Miller) en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada con pUC18 y ALO15, con pRPH184 o con pRPH184 y pALO15 creciendo en medio mínimo con glucosa o glicerol a 30°C (30°C), tras la adición de IPTG (1mM) a 30°C (IPTG) y tras el cambio de temperatura de 30°C a 41°C (CT). Valores obtenidos a partir de 8 a 13 ensayos.

MC4100:: λ pF13- (<i>PgroE-lacZ</i>) /plás.	MM9 Glicerol			MM9 Glucosa		
	30°C	IPTG	CT	30°C	IPTG	CT
pUC18	119	110	225,4	88,22	85,66	161,25
pALO15	±21,10	±19,38	±45,30	±19,46	±11,50	±18,37
pRPH184	333,14	353,14	358	187,66	187,66	189
	±82,84	±78,43	±84,85	±31,21	±32,71	±29,30
pRPH184	148,15	591,84	268,29	98,93	201,14	201,37
pALO15	±27,12	±129,73	±43,70	±14	±36,73	±43,62

todas son viables a 30°C estas mutaciones no permiten su crecimiento a alta temperatura. Se transformaron con el plásmido pRPH184 estos mutantes y la estirpe KY1601, $\Delta rpoH30$. En todos los casos se comprobó su crecimiento en placa a 42°C tras ser transformadas. Se analizó también el crecimiento en medio líquido a 20°C de la estirpe KY1601 su parental MC4100 y de la estirpe KY1601/pRPH184 y se obtuvo que el transformante presentó durante el crecimiento exponencial una velocidad de crecimiento muy superior a la del mutante. En las condiciones estudiadas, en medio mínimo con casaminoácidos a 20°C, el tiempo de generación del mutante es de 248 minutos, que se reduce a 147 minutos en la estirpe mutante transformada aproximándose al del parental que es de 129 minutos. La transformación con pRPH184 elimina el fenotipo mutante en las estirpes analizadas lo que confirmó su correcta funcionalidad.

2.2.2. Efecto de la inducción de la respuesta de choque térmico

La inducción de σ^{32} a partir del plásmido pRPH184, tras la adición de IPTG e independientemente del cambio de temperatura, es suficiente para aumentar la tasa de síntesis de las proteínas de choque térmico (apartado 2.2.1 de Resultados, 110). Esto permite separar la respuesta fisiológica de choque térmico del efecto termodinámico que conlleva el cambio de temperatura y estudiar el efecto directo de la inducción de la respuesta de choque térmico sobre la replicación, sin cambio de la temperatura de incubación.

Para estudiar el efecto del aumento de la síntesis de σ^{32} sobre el inicio de la replicación cromosómica se indujo la expresión del gen *rpoH* de pRPH184 por adición de IPTG en diferentes estirpes silvestres y en la estirpe KY1601 transformadas con pRPH184 y pALO15. Debido a que el nivel de expresión de σ^{32} inducida a partir de pRPH184 varía en función de las condiciones de crecimiento y esto podría tener distintos efectos sobre la replicación, los experimentos se realizaron en diferentes condiciones: medio mínimo con glucosa o glicerol, suplementado o no con casaminoácidos, a 20°C y 30°C y tras el cambio a 41°C.

En la figura 20 se muestran los resultados de acumulación de DNA obtenidos en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada con pUC18 y pALO15 y con pRPH184 y pALO15 tras la adición de rifampicina a 30°C y junto con el cambio a 41°C sin y a distintos tiempos desde la adición de IPTG a 30°C. Se observa que la cantidad de DNA sintetizado por la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*)/pRPH184pALO15 tras la adición de rifampicina es el mismo cuando la síntesis de σ^{32} está o no inducida, a baja y alta temperatura, y próximos a los

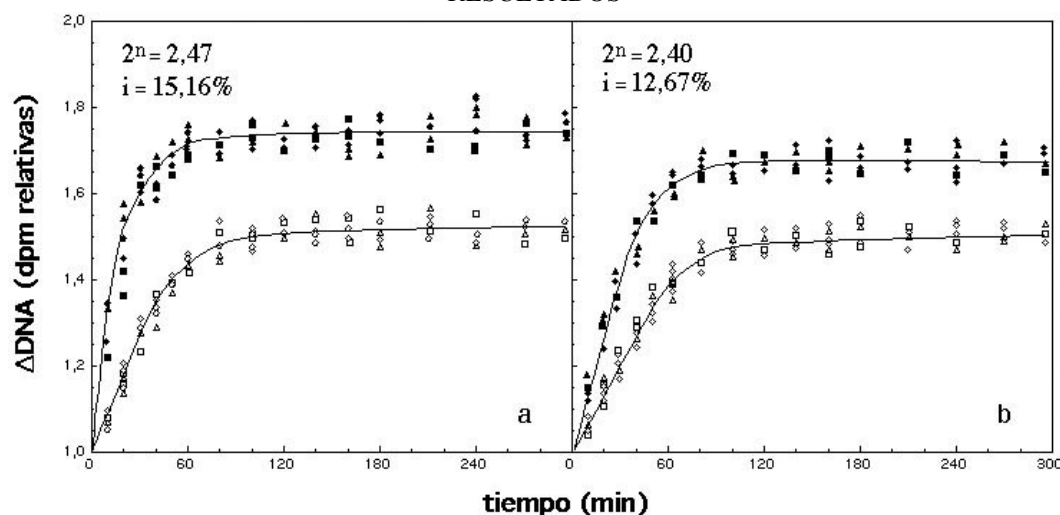


Figura 20. Acumulación de DNA en la estirpe MC4100::λpF13-(*PgroE-lacZ*)/pUC18pALO15 (a) y MC4100::λpF13-(*PgroE-lacZ*)/pRPH184pALO15 (b), creciendo en medio mínimo con glucosa, tras la adición de rifampicina (150 μg/ml) a 30°C (símbolos vacíos) o junto con el cambio a 41°C (símbolos llenos) sin (○) o tras 5 (Δ), 10 (□) y 30 (◇) minutos desde la adición de IPTG (1mM) a 30°C.

niveles de la estirpe control. Se representan los resultados obtenidos del crecimiento en medio mínimo con glucosa, condiciones en las que la inducción de σ^{32} por la adición IPTG es más fisiológica. Resultados similares se encontraron en las diferentes estirpes silvestres utilizadas y en todas las condiciones de crecimiento probadas. Los experimentos que se realizaron con la estirpe MC4100::λpF13-(*PgroE-lacZ*) permitieron comprobar la inducción de la respuesta de choque térmico en todas las condiciones utilizadas mediante la medida de la actividad de la β-galactosidasa, en los mismos cultivos a los que se les determinó la acumulación de DNA, antes y tras la adición de IPTG (valores recogidos en la Tabla 4).

Los resultados de acumulación de DNA obtenidos en la estirpe KY1601/pRPH184pALO15 y sus controles, creciendo en medio mínimo con casaminoácidos, tras la inhibición de iniciaciones por adición de rifampicina a 20°C y junto con el cambio a 41°C, sin y a distintos tiempos desde la adición de IPTG a 20°C se muestran en la figura 21. De igual forma que en las estirpes silvestres, se alcanzan los mismos niveles de acumulación de DNA en KY1601/pRPH184pALO15 sin y tras la adición de IPTG (Fig. 21 c). Sin embargo en este caso en el mutante transformado con pRPH184 se induce térmicamente el inicio de la replicación en un 60% de orígenes (Fig. 21 c), porcentaje similar al obtenido en la estirpe control MC4100/pUC18pALO15 (Fig. 21 a) y que duplica el porcentaje inducido en el mutante (Fig. 21 b). Por tanto la transformación de la

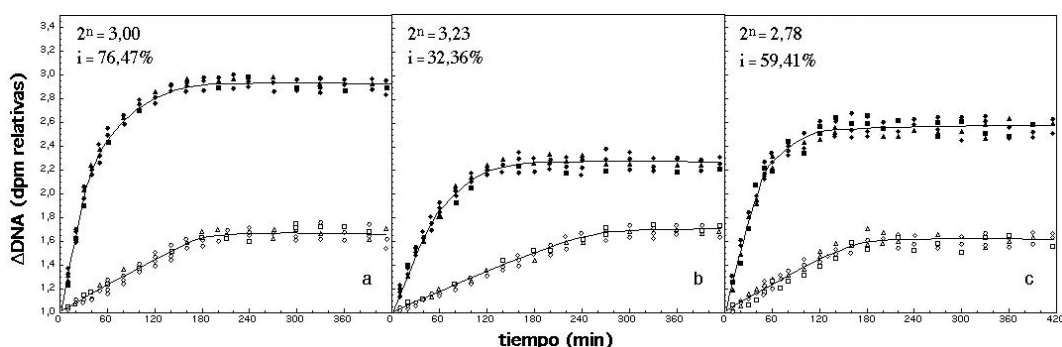


Figura 21. Acumulación de DNA en las estirpes MC4100/pUC18pALO15 (a), KY1601/pUC18pALO15 (b) y KY1601/pRPH184pALO15 (c), creciendo en medio mínimo con casaminoácidos, tras la adición de rifampicina (150 $\mu\text{g/ml}$) a 20°C (símbolos vacíos) y junto con el cambio a 41°C (símbolos llenos) sin (○) o tras 5 (Δ), 10 (\square) y 30 (\diamond) minutos desde la adición de IPTG (1mM) a 20°C.

estirpe KY1601 con pRPH184 y pALO15, aún si inducir la expresión de *rpoH*, restablece en el mutante el porcentaje de orígenes en los que se induce la replicación por el cambio de temperatura en el parental, además de reducir su tiempo de generación. La reducción del tiempo de generación también se acompañó de la reducción del periodo C y se mantiene el valor del número de orígenes por cromosoma aproximadamente constante.

Los resultados presentados muestran que la inducción de la respuesta de choque térmico sin cambio de la temperatura de incubación, en las estirpes transformadas con pRPH184, no induce la aparición de nuevos inicios y que es requerido el aumento de la temperatura de incubación del cultivo para inducir replications extras. Sin embargo, el porcentaje de orígenes de replicación inducidos térmicamente en una estirpe con el gen *rpoH* delecionado es aproximadamente la mitad del que se induce en el silvestre y es suficiente la presencia de pRPH184 en la célula para que la inducción térmica de la replicación tras el cambio de temperatura alcance en el mutante el nivel que en la estirpe silvestre.

Estos resultados y los presentados en el apartado 2.1 indican que la inducción de la replicación tras el cambio de temperatura procede al menos por dos mecanismos diferentes, uno dependiente de σ^{32} y otro independiente de su actividad.

2.3. EFECTO DE LA CLONACION DE *rpoH* EN EL CONTROL DE LA REPLICACION CROMOSOMICA

Al estudiar el efecto de la inducción de la síntesis de σ^{32} desde el plásmido pRPH184 sobre la replicación se encontraron situaciones en las que la relación DNA/masa experimentó algunas modificaciones que motivaron un estudio más detallado.

Las diferentes estirpes silvestres utilizadas en este trabajo y transformadas con el plásmido pRPH184 no mostraron diferencia alguna en su crecimiento celular o en la síntesis de DNA a 30°C respecto a sus controles, las estirpes transformadas con pUC18, manteniendo un crecimiento equilibrado con el mismo tiempo de generación y la misma concentración de DNA. Sin embargo, cuando se cambió la temperatura de incubación del cultivo desde 30°C a 41°C se observó un aumento de su relación DNA/masa de forma constante, hasta alcanzar unos valores aproximadamente 3 veces mayores cuando se detiene el crecimiento de la masa celular. El aumento de la relación DNA/masa observado en las estirpes transformadas con pRPH184 sólo podía ser debido a los niveles mayores de la subunidad σ^{32} de la RNA polimerasa de forma constitutiva en las estirpes con pRPH184 y este aumento requería la subida de la temperatura de incubación, desde 30°C a 41°C para ser expresado.

Situaciones similares a ésta se han descrito anteriormente a este trabajo por nuestro grupo de investigación y otros (116, 341, 298, 358). Estos grupos buscando mutantes que alteraran condicionalmente el número de copias del cromosoma, mutantes *cop*, detectados por el aumento de la relación DNA/masa, encontraron por diferentes métodos de selección que todos los mutantes que expresaban el fenotipo *cop* tenían mutaciones en los genes *rpoB* o *rpoC*, que codifican las subunidades β y β' de la RNA polimerasa. Este fenotipo no es debido a mutaciones específicas de la RNA polimerasa que afectaran a una posible función de control de la replicación cromosómica por esta enzima, sino que, como demostraron Guzmán et al. se obtiene el mismo fenotipo reprimiendo la síntesis de la subunidad α por clonación de los genes *rpoB* y *rpoC* o simplemente inhibiendo parcialmente la actividad de la RNA polimerasa por adición de bajas concentraciones de rifampicina (116). En todos los casos el aumento de la relación DNA/masa se produce siempre tras el aumento de la temperatura de incubación.

Por lo tanto intervienen dos componentes en el incremento de la relación DNA/masa en las situaciones descritas: la reducción de la actividad de la RNA polimerasa y el aumento de la temperatura de incubación. Sin embargo, las

estirpes transformadas con pRPH184 expresan este fenotipo tras el cambio de temperatura aún sin la inhibición de la RNA polimerasa.

El análisis del efecto de la disminución de la actividad de la RNA polimerasa en las estirpes donde se expresa σ^{32} constitutivamente se llevó a cabo en la estirpe LE234, que había sido utilizada en los trabajos anteriormente citados (116). Se estudió el efecto de la adición de rifampicina a $5 \mu\text{g/ml}$, concentración que inhibe parcialmente la actividad de la RNA polimerasa en esta estirpe, en LE234/pUC18 y LE234/pRPH184. Cuando cultivos de estas estirpes creciendo en medio mínimo con glucosa a 30°C alcanzaron entre 0,05 y 0,08 unidades de absorbencia, medida a 600 nm, se dividieron en dos alícuotas y a una de ellas se adicionó rifampicina ($5 \mu\text{g/ml}$). Se tomó una alícuota de cada cultivo sin y con rifampicina y se incubó a 41°C y el resto se mantuvo a 30°C . En todos los casos se analizaron el crecimiento de la masa celular y la síntesis de DNA y a partir de estas medidas se determinó la relación DNA/masa a lo largo del periodo analizado (Fig. 22).

Cuando la estirpe control se mantiene a 30°C no se observa ninguna alteración de la relación DNA/masa tras la adición de rifampicina (\square , Fig. 22 a). Sin embargo, el aumento de la temperatura de incubación al cultivo tratado con la droga incrementa la relación DNA/masa hasta aproximadamente el doble tras 2 a 3 generaciones (\blacksquare , Fig. 22 a). La estirpe LE234/pRPH184 incrementa su relación DNA/masa tras la

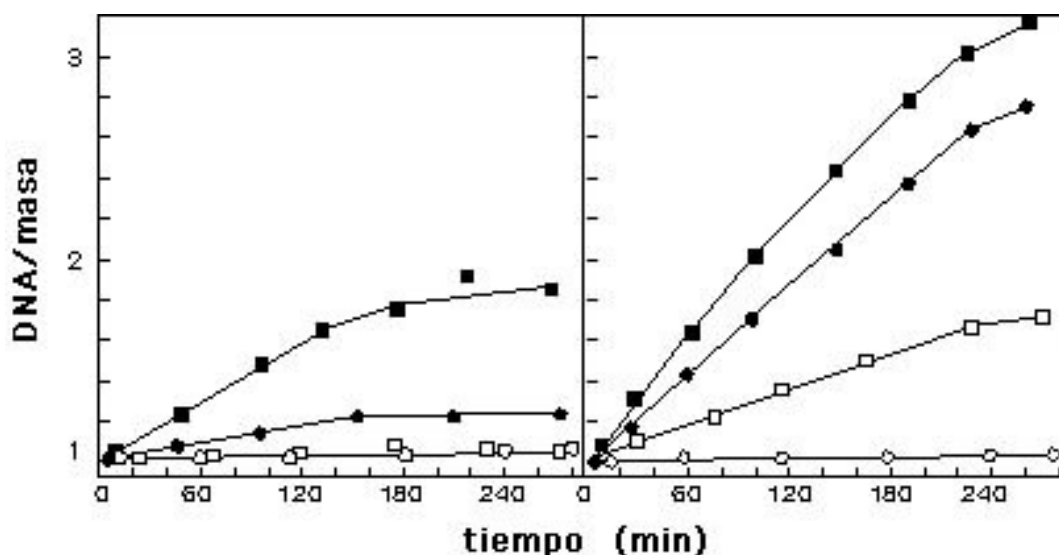


Figura 22. Relación DNA/masa en las estirpes LE234/pUC18 (a) y LE234/pRPH184 (b) creciendo en medio mínimo a 30°C (símbolos vacíos) y tras el cambio a 41°C (símbolos llenos) sin tratamiento (○) y tras la adición de rifampicina $5 \mu\text{g/ml}$ (□).

adición de rifampicina a 30°C (□, Fig. 22 b), de forma similar a la que se obtiene en la estirpe control tras la adición de rifampicina y el cambio de la temperatura, aún sin el cambio de temperatura en este caso. Las relaciones DNA/masa tras el cambio de temperatura en esta estirpe, sin o tras la adición de rifampicina (● ■, Fig. 22 b), incrementan continuamente a lo largo del tiempo de incubación a 41°C, hasta niveles superiores a los obtenidos en el cultivo control en estas condiciones. Se alcanza aproximadamente una relación DNA/masa unas 2,8 veces superior en el cultivo de LE234/pRPH184 que sólo se somete a cambio de la temperatura de incubación y más de 3 veces superior en el cultivo al que se añade rifampicina, relativos a los valores de la relación DNA/masa a 30°C sin adición de rifampicina.

Los resultados muestran que aunque la subida de σ^{32} , por el aumento de la temperatura o por clonación de *rpoH*, o la inactivación parcial de la RNA polimerasa no alteran la relación DNA/masa, cuando el aumento de σ^{32} o su exceso se acompañan de la inactivación parcial de la RNA polimerasa, la relación DNA/masa experimenta un incremento. El aumento continuo de esta relación tras el cambio de temperatura cuando σ^{32} se sobreexpresa indica la alteración del control del inicio de la replicación cromosómica, en estas condiciones, que conduce al aumento su frecuencia.

3. REPLICACION TERMOINDUCIDA Y REPLICACION ESTABLE

El inicio de la replicación cromosómica de *E. coli* tiene lugar, en condiciones normales, en *oriC* y depende de la interacción específica entre *oriC* y la proteína *DnaA*. Esta iniciación requiere la actividad de la RNA polimerasa y la síntesis de proteínas *de novo* (apartados 1.2.1 y 1.3.2 de Introducción). Los resultados presentados en los apartados precedentes indican que la inducción de la replicación por el cambio de temperatura tiene lugar en ausencia de la actividad de la RNA polimerasa y de síntesis de proteínas y aún así estas replications inician en *oriC*.

T. Kogoma ha descrito un modo alternativo de replicación que se conoce como **replicación estable** (apartado 1.3.3 de Introducción). En los mutantes *rnhA*, carentes de la actividad de la RNasa HI, la replicación puede ser iniciada continuamente en ausencia de síntesis de proteínas de manera independiente a *DnaA* desde varios lugares en el cromosoma diferentes a *oriC*, colectivamente denominados ***oriK***, por lo que *oriC* y *DnaA* son dispensables en estos mutantes; a este modo de replicación lo denominé **replicación estable constitutiva**. La inducción de la respuesta SOS en *E. coli* altera el modo de iniciación de la replicación cromosómica de forma que puede ocurrir en ausencia de los requerimientos de síntesis de proteínas y de la proteína *DnaA* y en este

caso también en ausencia de la actividad de la RNA polimerasa, desde *oriC* y *terC* principalmente, y que tiene lugar no sólo en mutantes *rnhA* sino también en estirpes silvestres; a este modo lo denominó **replicación estable inducida**.

La replicación inducida por cambio de temperatura y la replicación estable, por tanto, presentan características comunes, al menos en sus mecanismos de iniciación. Con el fin de comparar los requerimientos de la replicación estable con los de la replicación termoinducida y estudiar el efecto del aumento de temperatura sobre la replicación que inicia en lugares cromosómicos distintos a *oriC*, se analizó la inducción de la replicación por aumento de temperatura en las siguientes estirpes: AQ5441 que lleva la mutación *rnhA224* y en la que la iniciación tiene lugar tanto desde *oriC* como desde *oriK*, AQ5496 con las mutaciones *dnaA850::Tn10* que hace que *oriC* no sea funcional y *rnhA224* que permite el inicio desde otros orígenes cromosómicos, AQ5500 con las mutaciones *oriCΔ1071* por lo que *oriC* no se encuentra presente y *rnhA224*, y su parental silvestre AQ4241. Las estirpes se crecieron en medio mínimo con casaminoácidos y se cuantificó la acumulación de DNA tras la adición de rifampicina (200 µg/ml) a 30°C y junto con el cambio a 41°C (Fig. 23).

Los resultados mostrados en la figura 23 indican que en la estirpe parental la replicación inducida térmicamente es de características similares a las ya descritas y que en los mutantes el efecto del cambio de temperatura en la replicación es muy diferente. En el mutante *rnhA224* tras el cambio de temperatura se alcanza aproximadamente el mismo valor final de acumulación de DNA que a 30°C, lo que indica que en ausencia de RNasa Hi la inducción es muy baja, aún cuando *oriC* es utilizado como origen de replicación. Cuando *oriC* no es funcional, *rnhA224 dnaA850::Tn10*, o no se encuentra presente, *rnhA224 oriCΔ1071*, el cambio de temperatura induce una replicación que continúa insensible a la acción de la rifampicina, a una velocidad más reducida que las replications normales, lo que parece debido a la aparición de una “replicación estable” inducida térmicamente en estas estirpes y que es claramente diferente a la inducida en estirpes silvestres.

La replicación estable inducida parece ser el modo de replicación que se establece tras la inducción de la respuesta SOS (235), aunque también puede ser inducida por otros tratamientos (178). Para su inducción la desrepresión del gen *recA* y la subida de los niveles de la proteína RecA son las condiciones necesarias y suficientes

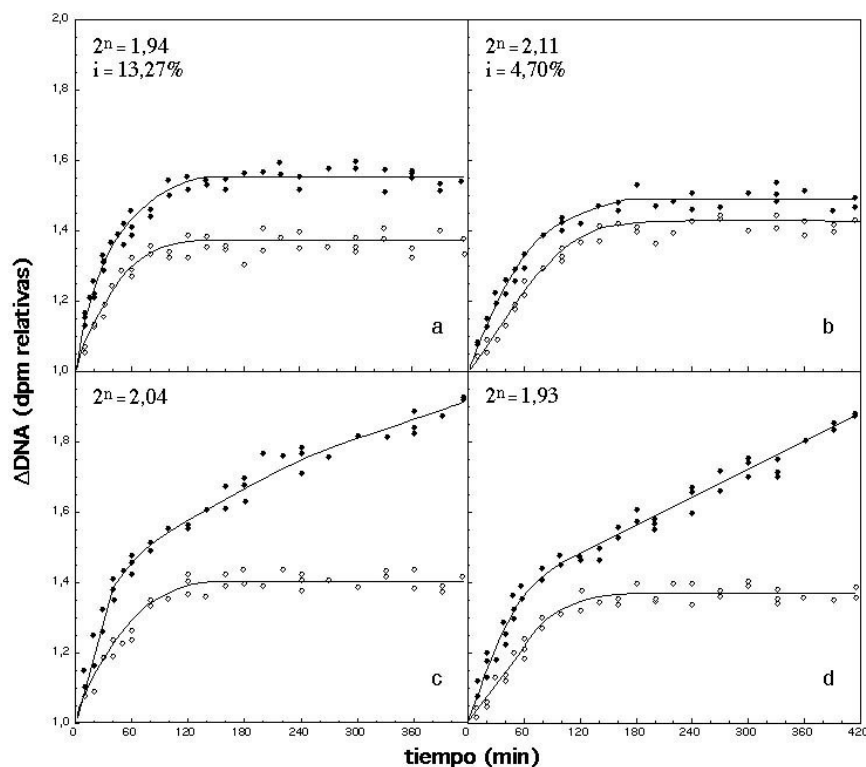


Figura 23. Acumulación de DNA en las estirpes AQ4241, parental silvestre, (a), AQ5441, *rnhA224*, (b), AQ5496, *rnhA224 dnaA850::Tn10*, (c) y AQ5500, *rnhA224 oriCΔ1071*, (d) creciendo en medio mínimo con casaminoácidos tras la adición de rifampicina (200 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C (○) y junto con el cambio a 41°C (●).

(236). La proteína RecA es requerida tanto en la replicación fisiológica desde *oriC* como en la replicación estable, aunque con distintos requerimientos de su funcionalidad (323, 354, 404).

El cambio de la temperatura de incubación en las estirpes *rnhA224dnaA850::Tn10* y *rnhA224 oriCΔ1071*, estrés en el que no se ha descrito la subida de los niveles de la proteína RecA (363), induce y permite la continuación de un tipo de replicación insensible a la presencia de rifampicina de forma similar a la replicación estable inducida. Con el propósito de conocer si la inducción térmica de la replicación depende de la actividad proteasa de la proteína RecA, requerida para la inducción de la replicación estable inducida por la respuesta SOS pero no en la replicación normal a partir de *oriC*, se estudió la inducción de la replicación tras el cambio de temperatura en la estirpe mutante IC400,*recA430*, y su parental IC401

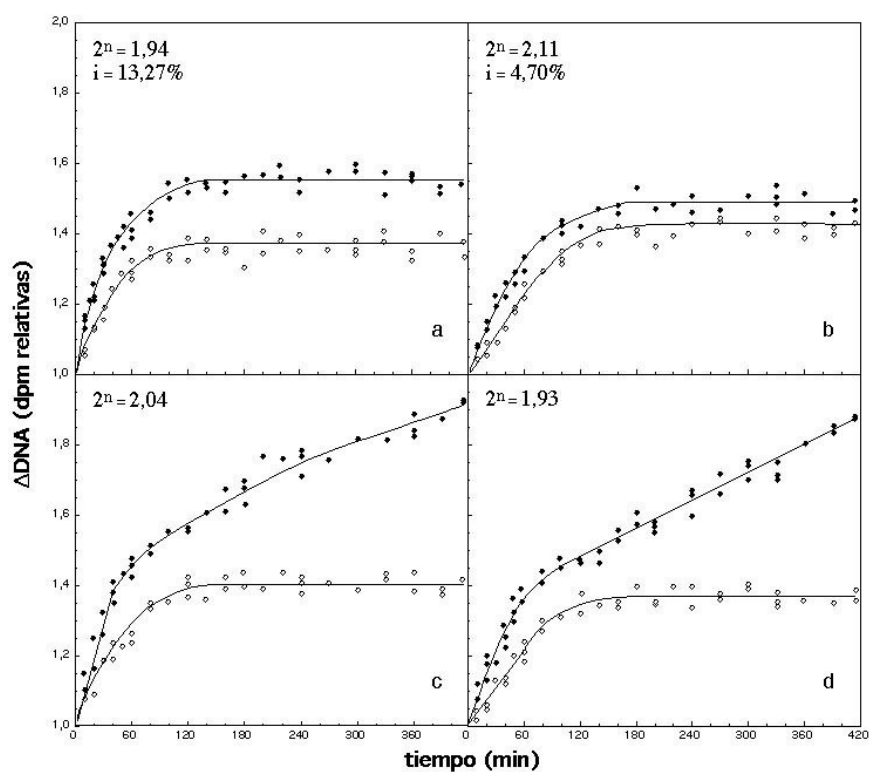


Figura 24. Acumulación de DNA en las estirpes IC401 (a) y IC400, *recA* 430, (b), creciendo en medio mínimo, tras la adición de rifampicina (150 μ g/ml) a 30°C (O) y junto con el cambio a 41°C (●).

crecidas en medio mínimo a 30°C y tras el cambio de temperatura a 41°C (Fig. 24).

Los resultados de la acumulación de DNA tras la adición de rifampicina muestran que en el mutante *recA430* no se inducen inicios tras el aumento de temperatura. Los cultivos de este mutante tras el cambio de temperatura sin adición de rifampicina muestran un crecimiento en masa celular y una síntesis de DNA con los mismos parámetros que su parental (resultados no mostrados). Esto indica el requerimiento de la proteína RecA no defectiva para el inicio de la replicación termoinducida.

DISCUSSION

El mecanismo de control de la replicación cromosómica determina que un inicio de replicación tenga lugar en cada ciclo celular. En condiciones de crecimiento equilibrado, el tiempo entre dos iniciaciones consecutivas, I , es igual al tiempo de duplicación de la masa, τ . Por tanto, cuando una población bacteriana crece exponencialmente, la duplicación del material genético está estrictamente coordinada con la duplicación de la masa celular (39, 50, 127, 187). El inicio de la replicación en *E. coli*, además de ser un suceso determinado en el tiempo de forma precisa dentro del ciclo celular en el que inician todos los orígenes presentes en la célula, tiene lugar en una secuencia cromosómica concreta, *oriC*, que presenta unas características estructurales definidas que facilitan que se produzca en ella y requiere la actuación en sucesión de varias proteínas específicas para su funcionalidad (34).

La cuantificación de la acumulación y la velocidad de síntesis de DNA ha sido utilizada en este trabajo para determinar las situaciones en las que el control de la replicación es alterado momentáneamente, por inducción de inicios extras, o a lo largo del crecimiento, variando la relación DNA/masa (apartado 4 de Métodos).

La cantidad de DNA acumulada por un cultivo tras la inhibición del inicio de la replicación está sólo en función del número medio de puntos de replicación por cromosoma presentes en el momento de la inhibición, independientemente del valor del periodo C ; el tiempo que tarda en ser alcanzado ese valor y estabilizarse es el parámetro que depende del periodo C (38, 40, 160). El algoritmo que permite cuantificar el porcentaje de orígenes en los que se induce una nueva ronda de replicación cromosómica en bacterias, a partir de la cantidad de DNA acumulada tras el inicio de un tratamiento inductor, supone que la inducción ocurre en un único origen y que da lugar a replications cromosómicas completas (160). La velocidad de síntesis de DNA de un cultivo creciendo exponencialmente está determinada por la frecuencia de iniciación de la replicación. Como la frecuencia de iniciación es igual a la de división, la velocidad de síntesis de DNA debe ser paralela a la del aumento de la masa del cultivo para mantener un crecimiento equilibrado, es decir, una relación DNA/masa constante.

1. REPLICACION TERMOINDUCIDA

El incremento de la temperatura de incubación a un cultivo de *E. coli* aumenta la velocidad de síntesis de la masa y del DNA, sin apreciarse un retraso en tal efecto respecto al tiempo del cambio de temperatura, para alcanzar los parámetros característicos de la nueva temperatura y sostener un crecimiento equilibrado adaptado a las nuevas condiciones (261). Una subida de la temperatura de 10 o más grados induce la aparición de inicios de replicación extras, aumentando de forma inmediata tras el cambio el número de orígenes de replicación por cromosoma. Esta inducción es transitoria y posteriormente se establece en el cultivo el mismo número de orígenes por cromosoma que presenta previo al cambio de temperatura (116).

La inducción de la replicación por aumento de la temperatura de incubación se ha encontrado durante la realización de este trabajo en todas las estirpes silvestres utilizadas. La inducción de la replicación térmica en diferentes condiciones experimentales y a diferentes estirpes mutantes ha mostrado distintas características de esta replicación, lo que ha llevado a una mejor comprensión de este fenómeno.

El incremento de las velocidades de crecimiento de la masa y de la síntesis de DNA que conlleva el aumento de la temperatura de incubación de un cultivo para adaptarse a las nuevas condiciones no requiere, por lo que al DNA se refiere, la aparición de nuevas rondas de replicación en el momento del cambio de temperatura; aunque la tasa de síntesis macromolecular en general experimenta cambios temporales durante los minutos posteriores a la subida de la temperatura (111, 261, 304, 305). Durante el crecimiento equilibrado de un cultivo el número de orígenes de replicación por cromosoma permanece constante para un mismo medio de crecimiento incluso a diferentes temperaturas, ya que el periodo C cambia en función de la temperatura de incubación proporcionalmente al tiempo de generación, manteniéndose la relación $C/\tau=n$ constante (40). Sin embargo, las curvas de acumulación obtenidas tras inhibir el inicio de la replicación inmediatamente posterior a la subida de temperatura muestran no sólo el aumento de velocidad del proceso de elongación, ya que aumenta la pendiente de la zona de la curva correspondiente a la síntesis de DNA desde la inhibición, sino también

que han tenido lugar inicios que han dado lugar a una síntesis suplementaria de DNA inducidos por el cambio de temperatura, ya que la acumulación de la síntesis de DNA tras el cambio se estabiliza en valores superiores a los que alcanza a baja temperatura. El valor del número de orígenes por cromosoma alcanzado disminuye paulatinamente en tiempos posteriores al cambio de temperatura, a la vez que finalizan las rondas de replicación que se inducen, hasta alcanzar el valor previo al cambio y mantenerse (116). Análisis de esta inducción llevados a cabo anteriormente al presente trabajo determinaron que aún cuando han tenido lugar rondas de replicación suplementarias se pueden mantener acoplados la velocidad de crecimiento de la masa y de la síntesis de DNA debido a que tras el cambio de temperatura se produce una desactivación de inicios normales de forma transitoria (114). En estos trabajos se detectó una bajada en el número de orígenes por cromosoma por debajo de la cantidad que presenta el cultivo durante el crecimiento exponencial, y posteriormente se recuperó el valor que mantiene la estirpe durante su crecimiento exponencial. Por tanto la inducción de estos inicios responde a la pérdida momentánea del control de la replicación asociada al cambio de temperatura, que posteriormente es recuperado y permite mantener la relación DNA/masa constante; no suponen la aparición de un sistema diferente de replicación que se establezca en las nuevas condiciones. Estas replications termoinducidas representan la pérdida del control no sólo en el tiempo dentro del ciclo celular, sino que alteran la sincronía de la iniciación, ya que estos inicios tienen lugar en un porcentaje variable de los orígenes presentes en el momento de la inducción y no en todos.

El aumento de la temperatura de incubación, de 30°C o 20°C a 41°C, a cultivos de la estirpe NF859 creciendo en medios con diferente riqueza induce en cada caso el inicio de la replicación en un porcentaje diferente de orígenes, del 18,24% al 62,08% (Fig. 5, tabla 3). El porcentaje aumenta al enriquecerse el medio y al ser mayor el rango del cambio de temperatura. Dos componentes parecen por tanto determinar el porcentaje de orígenes inducidos; el estado fisiológico celular en función de la velocidad de crecimiento del cultivo y el efecto termodinámico ya que un cambio mayor de temperatura conduce a una mayor respuesta. A esta diferencia en el porcentaje de inducción puede contribuir la presencia de un mayor número de orígenes presentes por tiempo de generación en los cultivos que crecen más rápidamente si existe algún requerimiento, fisiológico o estructural, de que el origen se encuentre en un estado concreto para poder ser inducida la iniciación (Figs. 5 y 6). En el rango normal de la temperatura de crecimiento, entre 20°C y 37°C, las diferentes temperaturas de incubación en cultivos creciendo exponencialmente parecen tener poca influencia en la composición celular y la célula se adapta a las diferentes temperaturas ajustando la velocidad

de su metabolismo (261). Las diferencias en el porcentaje de inducción encontrada cuando el aumento de la temperatura de incubación se realiza de 30°C a 41°C o de 20°C a 41°C podrían ser directamente atribuidas al efecto termodinámico del mayor rango del cambio de temperatura (Fig. 5). El aumento de la temperatura desde 20°C a 41°C lleva aproximadamente a la duplicación del porcentaje de inducción alcanzado por el cambio de 30°C a 41°C, excepto en el caso del medio rico en el que una duplicación supondría la inducción de inicios casi en el 100% de los orígenes presentes lo que podría estar física o fisiológicamente impedido.

El análisis de los requerimientos del inicio de la replicación termoinducida establece una gran diferencia con el inicio de la replicación normal. Los resultados obtenidos muestran que la replicación inducida por el cambio de temperatura no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas *de novo* para su inicio (Fig. 9). El cambio de temperatura tras al menos 20 minutos desde el inicio del tratamiento inhibitor induce un porcentaje de inicios muy similar al del tratamiento simultáneo, aunque la acción de estos tratamientos prolongada durante más tiempo llega a impedir la inducción por el cambio de temperatura. La no necesidad de estos requerimientos constituye una diferencia muy importante entre ambas replications, al menos entre sus mecanismos de iniciación, y establece ciertas similitudes de la replicación termoinducida con la replicación estable que serán discutidas posteriormente.

Al estudiar el efecto de los niveles de ppGpp, inhibidor general de la replicación (117, 161), sobre la termoinducción de la replicación se puede observar que esta replicación tampoco es regulada por este factor, ni es afectado por la situación metabólica celular establecida en función de sus niveles (Fig. 10).

El inicio de la replicación termoinducida parece, por tanto, no estar sujeto a los mecanismos de regulación más generales de la replicación normal. Sin embargo la localización cromosómica de su origen lo sitúa en la región de *oriC* (Fig. 11). Esta identificación se llevó a cabo mediante la determinación del gradiente de la frecuencia de marcadores que se establece tras inhibir el inicio fisiológico desde *oriC* y permitir la elongación de los inicios termoinducidos durante 10 minutos. Los valores medios determinados a partir de los resultados de acumulación de DNA tras la adición de rifampicina en NF859, en las condiciones de crecimiento utilizadas para la determinación de la frecuencia de marcadores, son 2,79 para el número de orígenes por cromosoma, o relación origen/término, y un 56,29% para el porcentaje de orígenes termoinducidos (apartado 1.1 de Resultados). El valor obtenido en esta experiencia para la relación origen/término a 20°C es igual a

2,66, que como era esperado tras la incubación con rifampicina durante 25 minutos es algo menor. Que la relación obtenida tras el cambio a 41°C igual a 3,41 se corresponda con la inducción del inicio en sólo un 34% de los orígenes puede ser interpretada junto con los resultados obtenidos tras el análisis de los datos de acumulación. Estos resultados indican que los inicios de la replicación termoinducida son insensibles a la presencia de rifampicina durante un periodo de tiempo en el que tendrán lugar sucesivos inicios, por lo que totalidad de la inducción no se puede cuantificar en las condiciones en las que se llevó a cabo esta experiencia (Fig. 12).

Aunque la inducción de la replicación termoinducida no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas, la incubación posterior del cultivo en presencia de rifampicina o sometido a carencia de aminoácidos no lleva a la síntesis continuada de DNA. La transformación de los resultados de acumulación obtenidos tras la inducción térmica de la replicación mediante el análisis propuesto por Bremer y Churchward permite conocer otras características específicas de este modo de replicación (Fig. 12). La replicación termoinducida no sólo es inducida por el cambio de temperatura tras el tratamiento con rifampicina durante al menos 20 minutos (Fig. 9), sino que los inicios de esta replicación no son inhibidos por la presencia de la droga durante 20 a 40 minutos tras el cambio de temperatura (Fig. 12). Durante este tiempo tienen lugar sucesivos inicios. También se detecta con este análisis que esta replicación procede a una velocidad mucho más lenta que las replications normales. Los puntos de replicación originados como consecuencia de la inducción térmica no corresponden al tiempo de iniciación dentro del ciclo celular y su formación tiene lugar aún en ausencia de la actividad de la RNA polimerasa y de la síntesis de proteínas. Es probable que, por tanto, algunos de los componentes del complejo de replicación puedan estar en cantidades deficitarias y/o alternativamente estos puntos de replicación extras encuentren condiciones adversas en su avance. En otras condiciones experimentales que inducen replications extras, como son las alteraciones de la concentración de DnaA por sobreproducción o mutación (9, 170, 223, 306.a, 372), han sido también observadas velocidades de replicación reducidas.

Los resultados experimentales obtenidos parecen indicar que los inicios termoinducidos dan lugar a replications cromosómicas completas. Por el procedimiento utilizado en este trabajo para detectar la aparición de la replicación termoinducida y cuantificarla no es posible detectar inicios de replications abortivas, ya que los cálculos del porcentaje de inducción están referidos a la aparición de nuevos cromosomas completos replicados a partir de un origen único

(apartado 4.2.3 de Métodos, 160). Los porcentajes de inducción tan elevados encontrados en algunas situaciones, del 60% al 70% de los orígenes presentes, en las que los cultivos no mostraron ninguna alteración que hiciera inviable su crecimiento exponencial tras el cambio de temperatura apoyan esta idea. Si estos porcentajes de inducción tuvieran que ser explicados por la contribución de replications abortivas éstas deberían suponer porcentajes de orígenes inducidos mucho mayores, lo que haría inviable el crecimiento posterior del cultivo. Otro dato a favor es el hecho de la determinación de un periodo C mucho más largo del que sería esperable a la temperatura elevada.

La replicación inducida por el cambio de la temperatura de incubación no depende, por todo lo anteriormente expuesto, de las funciones principales que regulan la replicación normal y difiere de ésta tanto en el tiempo y requerimientos de su inicio como en su forma de progresar. Sin embargo, su origen se localiza en *oriC* o en una zona próxima a él. Esta alteración del modo de replicación asociada al aumento de temperatura puede ser inducida como respuesta al estrés térmico y por tanto podría presentar ciertas dependencias de la respuesta de choque térmico. El establecimiento de un modo alternativo de replicación en relación con respuestas de estrés ha sido descrito para la respuesta SOS (235).

La disociación de la alteración termodinámica del aumento de temperatura y la respuesta fisiológica de choque térmico en un mutante carente de σ^{32} muestra que el porcentaje de inducción de inicios por el cambio a 41°C que se obtiene en la estirpe mutante es menor a la mitad del alcanzado por la estirpe control (Fig. 13). Ya que la termoinducción de la replicación no requiere la síntesis de proteínas, el uso de la estirpe mutante KY1601 carente de σ^{32} no sólo impide la inducción de la respuesta de choque térmico sino que permite eliminar la contribución de sus niveles basales y de los de algunas proteínas de choque térmico (158, 402). A la inducción térmica de la replicación parecen contribuir tanto las condiciones fisiológicas como la influencia termodinámica más directa del cambio de temperatura (Fig. 5). Por tanto, el estado fisiológico que se establece en la célula dependiente de σ^{32} forma parte o es todo el componente funcional determinante de la inducción. Las condiciones experimentales que fueron requeridas para realizar este experimento conllevaron el aumento de la temperatura de incubación de 20°C a 41°C, en las que el porcentaje de inducción alcanzado aproximadamente dobla al alcanzado por el aumento de 30°C a 41°C (Fig. 5). Ya que el porcentaje de inducción obtenido en la estirpe KY1601 es la mitad del alcanzado por su parental este podría ser sólo el efecto de la alteración termodinámica del cambio de temperatura.

La aproximación experimental contraria, es decir, la inducción de la respuesta fisiológica de choque térmico de forma específica, sin tener que realizar el aumento de la temperatura de incubación o inducirla por otros agentes que alteraran más genéricamente la fisiología celular, requirió la expresión controlada del gen *rpoH*. Para esto se llevó a cabo la construcción del plásmido pRPH184.

La región reguladora del operón lactosa constituye un sistema de expresión génica bien conocido y fácilmente regulable por factores externos, como la adición de IPTG, y sin ningún efecto desregulador del metabolismo general (255). Por esto, este sistema es ampliamente utilizado para el estudio de la expresión de diferentes genes (9, 110, 223). En este proceso el uso de pUC18 como vector de clonación permitió una fácil selección de los plásmidos recombinantes, mediante la complementación α de la β -galactosidasa (apartado 13 de Métodos), y el uso de la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada con estos plásmidos permitió disponer de un original y efectivo sistema de selección y cuantificación de la proteína σ^{32} activa (Fig. 16). En esta estirpe la actividad del promotor de choque térmico *groE* puede ser cuantificada determinando la actividad β -galactosidásica. La determinación de esta actividad está siendo frecuentemente utilizada para estudiar la actividad de promotores por su sencillez y correlación con los resultados obtenidos por otros métodos más complicados (9, 36, 85, 397). La respuesta de choque térmico provocada en la estirpe MC4100:: λ pF13-(*PgroE-lacZ*) transformada con los plásmidos pRPH184 y pALO15 tras la inducción de σ^{32} por adición de IPTG muestra una cinética de expresión similar a la provocada por el cambio de temperatura de 30°C a 41°C durante los primeros minutos en las condiciones estudiadas (Fig. 19). Aunque la inducción se mantiene durante más tiempo que tras el aumento de temperatura, esta situación no invalida la utilización del sistema de control exógeno de la síntesis de σ^{32} para estudiar la influencia de la inducción de la respuesta de choque térmico en la replicación termoinducida.

En estirpes silvestres transformadas con pRPH184 y pALO15, la inhibición de la replicación por rifampicina a diferentes tiempos posteriores a la inducción de la síntesis de σ^{32} por adición de IPTG no muestra ninguna diferencia en los análisis de acumulación de DNA. Cuando el nivel y la actividad de σ^{32} son inducidos o son muy superiores a los de la estirpe sin *rpoH* clonado, la acumulación de DNA del cultivo es la misma que la de la estirpe control sin cambio de temperatura y por el cambio a 41°C se activan aproximadamente el mismo número de orígenes (Fig. 20). Por tanto, aunque la carencia de σ^{32} lleva a una reducción a la mitad del porcentaje de inducción de la replicación por el aumento de temperatura, ni el momento de la subida de los niveles tras su inducción ni el posterior exceso de

este factor tiene alguna influencia sobre la replicación termoinducida y sigue siendo requerido el aumento de temperatura para su inducción. Sin embargo, en la estirpe KY1601, $\Delta rpoH$, se comprueba de nuevo la dependencia entre la replicación termoinducida y σ^{32} . El porcentaje de orígenes termoinducidos que se obtiene en esta estirpe cuando se complementa la mutación, al transformarla con pRPH184, sube hasta aproximarse al nivel del parental (Fig. 21). El hecho de que aún sin inducir la expresión de $rpoH$ revierta el fenotipo asociado a esta delección indica que debe haber una actividad de σ^{32} que es suficiente para restablecer en el mutante el fenotipo silvestre y complementar la dependencia de la termoinducción de la replicación de σ^{32} . Esta actividad es indetectable por el procedimiento de cuantificación utilizado en MC4100:: λ pF13-(PgroE-lacZ)/pRPH184pALO15 o, al menos, muy baja frente al detectado en las estirpes controles y al alcanzado en las condiciones de respuesta de choque térmico.

El estudio más intenso desarrollado en los últimos años sobre la respuesta de choque térmico y su regulación han determinado la existencia de un estricto control de la síntesis de σ^{32} y la modulación de su actividad a diferentes niveles, transcripción, traducción y postraduccionales (apartado 2.2.2.1 de Introducción). El control de la síntesis de σ^{32} por la regulación del operón *lac*, utilizado en este trabajo y por otros autores (94, 110), aunque funcional no ha resultado ser equivalente a la situación fisiológica normal mucho más precisa. Debido a que σ^{32} en cantidades muy bajas parece ser altamente funcional (94, 350, 370, 400.a, 402), la posibilidad de la inducción de su síntesis regulada desde *POlac* a distintos niveles, en función de la concentración del inductor IPTG y del nivel de cAMP del medio de crecimiento del cultivo, sin cambio de temperatura no ha podido ser utilizada en este estudio.

Las estirpes KY1429, $rpoH6$ am, y KY1436, $rpoH165$ am, producen la cantidad de σ^{32} suficiente que permite el crecimiento celular y la casi normal transcripción de los genes de choque térmico a baja temperatura, pero no se induce su síntesis por el cambio de temperatura (350, 370, 400.a, 402). Cuando se utilizan estas estirpes para analizar la replicación termoinducida, la inducción de inicios de replicación por el cambio a 41°C alcanza el mismo porcentaje que su estirpe parental, MC4100 (resultados no mostrados). La regulación del nivel de σ^{32} tras un aumento de la temperatura es mayoritariamente a nivel de traducción de los mensajeros sintetizados previamente (169, 401). La similitud de los resultados obtenidos con los mutantes KY1429 y KY1436 y en la estirpe KY1601/pRPH184pALO15 elimina la posibilidad de que en el mutante transformado sea la inducción de la síntesis de σ^{32} tras el cambio de temperatura, aún en presencia de rifampicina, la responsable de poder alcanzarse la inducción

de inicios en un porcentaje similar al silvestre e indica de nuevo la dependencia de la termoinducción de los niveles de σ^{32} previos al aumento de temperatura.

Esto demuestra que para alcanzar el porcentaje máximo de termoinducción de inicios es requerida σ^{32} . El inicio de la replicación termoinducida dependerá de σ^{32} o de las proteínas cuya expresión regula. Sin embargo, para inducir esta replicación no es suficiente la inducción de la respuesta de choque térmico sin cambio de temperatura y es necesario el aumento de la temperatura de incubación del cultivo.

Las características que presenta el inicio de la replicación termoinducida establecen ciertas semejanzas, relativas a los requerimientos de sus inicios, entre la replicación termoinducida y la replicación estable (235, 368).

El bajo porcentaje de inducción de inicios de replicación obtenido en el mutante *rnh224* por el cambio de temperatura indica la necesidad de la actividad de la RNasa HI para el inicio de la replicación termoinducida, contrariamente al requerimiento de su ausencia para la replicación estable (Fig. 23). Ya que esta enzima específicamente degrada RNA en moléculas híbridas RNA-DNA (182) su función en el inicio de la replicación termoinducida podría ser el procesamiento del RNA que fuera utilizado como cebador, como está descrito para otros replicones (153). El requerimiento de la RNasa HI puede estar relacionado con la correspondencia recientemente establecida entre los niveles de la enzima RNasa HI y la función como carabinas de las proteínas de choque térmico DnaK, DnaJ y GrpE, ya que estirpes mutantes en estas proteínas presentan niveles reducidos de RNasa HI. Este hecho ha sido propuesto como un mecanismo para la activación de orígenes alternativos regulado por la interacción entre las proteínas de choque térmico citadas y la RNasa HI (85). Por tanto el bajo porcentaje de inducción de la replicación encontrado en el mutante *rnh224* podría ser una fenocopia de los mutantes de estas proteínas de choque térmico en la inducción de esta replicación. Alternativamente este bajo porcentaje de inducción en el mutante *rnh224* puede ser interpretado teniendo en cuenta que al ser eliminada la función que confiere la especificidad al inicio en *oriC* la inducción térmica de la replicación no tiene lugar, si ésta depende estrictamente de la replicación que inicia en *oriC* (219, 243, 273, 352).

En los mutantes AQ5496, *rnhA224dnaA850::Tn10*, y AQ5500, *rnhA224 oriCΔ1071*, donde *oriC* no puede ser utilizado como origen de replicación, tras el cambio de temperatura se induce claramente una replicación de características diferentes a la inducida térmicamente en las estirpes que sólo utilizan como origen de replicación a *oriC* (Fig. 23). La replicación termoinducida en ausencia

de *oriC* es insensible a la presencia de rifampicina y la síntesis de DNA no se estabiliza sino que continúa, aunque con una velocidad muy reducida. Las estirpes mutantes que carecen de RNasa HI utilizan como sistema de replicación el de replicación estable constitutiva, sensible a la rifampicina (368). Así, el inicio de la replicación que estas estirpes presentan previamente al cambio de temperatura se inhibe tras la adición de la droga (Fig. 23). Que térmicamente se induzca en estas estirpes una replicación que es insensible a la acción de la droga parece indicar que el cambio de temperatura induce la aparición del sistema de replicación estable inducida cuando *oriC* no es funcional. La replicación estable inducida es el único modo de replicación descrito en el que la síntesis de DNA continúa durante horas insensible a la rifampicina (235). Esta alteración del modo de iniciación ha sido generalmente provocada tras la inducción de la respuesta SOS por tratamientos que dañan al DNA o bloquean la replicación, pero también puede ser inducido por las alteraciones fisiológicas, como un cambio rápido a medio rico o por inhibición parcial y temporal de la síntesis de RNA y proteínas sin afectar a la de DNA, y tras la incubación a temperatura no permisiva de mutantes en proteínas que intervienen en el inicio o la elongación de la replicación normal (178). La activación de estos inicios de replicación estable inducida tras el cambio de temperatura, supondría un nuevo tratamiento inductor de este mecanismo en estirpes con orígenes de replicación alternativos a *oriC*.

La inducción por el cambio de temperatura de replications tan diferentes dependiendo del origen de replicación utilizado indica que la replicación termoinducida analizada en este trabajo es estrictamente dependiente de la funcionalidad de *oriC* y que estas replications no suponen la alteración del mecanismo general de replicación, sino más bien un “escape” transitorio al control de la replicación normal.

Una de las dependencias que muestra la replicación termoinducida para su inicio es la función de la proteína RecA. El aumento de temperatura en la estirpe IC400, *recA430*, deficiente en la actividad proteásica de esta proteína no induce ningún inicio extra de replicación (Fig. 24). Ya que los niveles de esta proteína no son alterados por el aumento de temperatura (363), será la situación celular establecida en ausencia de la actividad proteásica de RecA la que determina la incapacidad de inducción de la replicación termoinducida. La proteína RecA es una de las más pleiotrópicas de *E. coli*, está implicada en numerosas funciones celulares. En la replicación fisiológica desde *oriC* ha sido determinado el requerimiento de su actividad como recombinasa para el inicio (323) o bien en la etapa de partición posterior a la replicación (404) y tanto su actividad recombinásica como proteásica son requeridas en la replicación estable (5.a, 54).

Asociada a la respuesta SOS interviene en la replicación ayudando a eludir las mutaciones introducidas en el proceso de reparación y también para permitir reiniciar la replicación tras dañar al DNA (386). En este último caso tanto para inducir la reactivación de los complejos de replicación parados como para ensamblar nuevos son requeridos niveles amplificados de la proteína RecA (25, 235, 236). Esta función podría ser de la que dependiera el proceso de la iniciación de la replicación termoinducida. Así, si la formación y activación de los complejos de replicación para esta replicación extemporánea fuera regulada por RecA, su actuación sería un paso limitante de estos inicios.

1.1. UN MODELO PARA EL INICIO DE LA REPLICACION TERMOINDUCIDA

Los resultados presentados permiten ser interpretados de acuerdo con el siguiente modelo para el inicio de la replicación termoinducida en *E. coli*.

El origen de la replicación termoinducida se ha localizado en este trabajo en la región de *oriC*. El inicio normal de la replicación en *oriC* presenta como etapa limitante la formación del complejo abierto (34, 100, 189). Una vez que se ha producido la apertura del origen en la zona rica en AT, tiene lugar la formación del complejo precebador y la síntesis del RNA cebador. Este paso limitante durante el inicio podría ser el que eliminara el aumento de temperatura. El estrés térmico que conlleva el aumento de temperatura produce una relajación transitoria del superenrollamiento del DNA (70, 105, 258). La región que facilita la apertura del origen, el DUE, se caracteriza por su inestabilidad térmica y un bajo requerimiento energético para su apertura (6, 100, 189), por lo que el aumento de temperatura puede suministrar la energía necesaria para modificar la estructura en esta zona del origen. La función que la RNA polimerasa lleva a cabo en el inicio de replicación es la de la activación transcripcional en la región de *oriC* para facilitar la apertura del origen durante la formación del complejo abierto (5, 6, 15, 86, 325). Por tanto, su requerimiento podría ser eliminado por la subida de la temperatura. En este sentido, en estudios realizados *in vitro*, este proceso requiere una temperatura mínima y es facilitado por el aumento de temperatura incluso hasta llegar a eliminar la necesidad de la activación transcripcional y de las proteínas IHF, HU y FIS (33, 84, 99, 148, 325). Este hecho pone de manifiesto la sensibilidad de la apertura del DNA durante la iniciación a cambios moderados de su estructura (325).

El cambio estructural provocado por el aumento de temperatura en *oriC* podría facilitar adicionalmente la interacción de DnaA con la secuencia R3 y, ya que DnaA se encuentra unida a las otras secuencias que reconoce en *oriC* durante la mayor parte del ciclo, sería una señal para el inicio de la replicación (245, 308, 311). Los cambios causados en la fluidez de la membrana por el aumento de temperatura también podrían contribuir a la inducción de la replicación si se facilita la liberación de los orígenes unidos a ella, como paso previo a poder ser utilizados para la iniciación, y/o la activación de DnaA (152, 317, 398). La etapa limitante tras la accesibilidad de estos orígenes seguiría siendo su apertura, que sería facilitada por la temperatura alta en ausencia de activación transcripcional.

El que el inicio de esta replicación no requiera la actividad de la RNA polimerasa, cuya función puede ser reemplazada por la alteración termodinámica del origen, ha resultado ser su característica más sorprendente solamente compartida con la replicación estable inducida (235). El no requerimiento de la síntesis de proteínas lo presentan otras alteraciones de la replicación descritas (84, 170, 177, 306.a). Ya que sólo parece ser requerida para el inicio la síntesis *de novo* de PinO y esta proteína desempeñaría su función en la regulación de la replicación, no en el mecanismo de la replicación, (115, 118) al tratarse de replications fuera de control no sería tan extraordinario que su síntesis no sea necesaria.

Entre las funciones requeridas para la replicación termoinducida determinadas en este trabajo se encuentra la de σ^{32} . El requerimiento de σ^{32} de forma directa en el inicio de la replicación termoinducida implicaría su intervención en el proceso con una función hasta ahora no determinada, independiente de la actividad de transcripción de la RNA polimerasa que no es requerida en estos inicios. La necesidad de σ^{32} en la inducción térmica de la replicación podría ser la dependencia de las proteínas de choque térmico. La función de las proteínas de choque térmico como carabinas celulares es ayudar y mantener la funcionalidad de estructuras proteicas, tanto en situaciones fisiológicas normales como en situaciones de estrés (97). La intervención de estas proteínas en el proceso de la replicación está descrita en relación con esta función; en este sentido se conoce su interacción con las proteínas DnaA, RNA polimerasa, DNA polimerasa, RNasa HI, SSB (59, 76, 85, 150, 157, 170, 238, 306, 326). Así el requerimiento de estas proteínas en la replicación termoinducida podría ser ayudar a la organización del complejo de replicación de las proteínas que intervengan en el mecanismo de esta replicación o prevenir la inactivación de proteínas. Para realizar esta función serían suficientes los niveles basales de estas proteínas en situaciones de no estrés, ya que la replicación termoinducida no requiere síntesis de proteínas *de*

novo. Por esto la inducción directa de su síntesis, sin cambio de temperatura, no lleva a ninguna alteración del proceso de replicación y es estrictamente requerido el cambio de temperatura para detectar su función; además, una limitación o carencia de estas proteínas no lleva necesariamente a la anulación del inicio de esta replicación, sino a una disminución de la eficacia con la que se realiza.

Los requerimientos de las proteínas RNasa HI y RecA podrían estar más directamente relacionados con el mecanismo de la replicación. La proteína RNasa HI intervendría en el suministro de los cebadores para la replicación y RecA en la formación y activación del complejo de replicación.

Si la inducción de esta replicación es debida a la alteración termodinámica de la estructura del DNA, ¿por qué no podrían ser inducidos inicios en orígenes alternativos a *oriC*, cuando las condiciones fisiológicas lo permitieran? Que el aumento de temperatura lleve a la iniciación de las replications extras desde *oriC* en estirpes silvestres puede estar favorecido por la estructura y funcionalidad de este origen. El inicio en orígenes distintos, cuando *oriC* no puede ser utilizado, se deberá en principio al mismo estímulo, aún cuando proceda por mecanismos diferentes según los requerimientos del origen inducido. Esta será la situación en las estirpes AQ5496 y AQ5500.

2. ALTERACION DEL CONTROL DE LA REPLICACION

Un aumento momentáneo del número de orígenes por cromosoma puede aumentar la frecuencia de iniciación, al menos durante la generación en la que se produce, cuando la velocidad de duplicación de la masa no varía coordinadamente. Esto lleva al aumento desequilibrado de la relación DNA/masa. La aparición de las replications suplementarias termoinducidas en un porcentaje bajo de orígenes presentes no varía la relación DNA/masa tras el cambio de temperatura (114, 116). Cuando esta inducción es elevada la concentración de DNA aumenta durante unas 2 generaciones para estabilizarse en valores próximos al doble, de forma similar en todos los casos observados en este trabajo (Figs. 5 y 7). Sin embargo, este desacoplamiento entre la velocidad de crecimiento y de síntesis de DNA permite recuperar las condiciones de control y estabilizar la concentración de DNA con un mayor número de orígenes por masa, o lo que es igual, con una menor masa de iniciación.

Por tanto, un porcentaje reducido de inducción de replications por el cambio de temperatura, de hasta al menos un 18%, no altera la concentración de DNA y superado un límite, mayor o igual al 30%, la alteración de la concentración de DNA se produce en la misma extensión independientemente de la inducción. Este hecho parece reflejar la existencia de un nivel hasta el que el sistema de control de la replicación es eficaz; una vez sobrepasado este nivel, por el aumento del número de orígenes relativo a la masa, el control deja de ser operativo. Que el aumento del número de orígenes en el momento del cambio de temperatura lleve a establecer posteriormente una mayor concentración de DNA favorece la propuesta de un modelo de control negativo para el inicio. La naturaleza del propio control, no obstante, consigue restablecer el estado de equilibrio al aumentar la dosis génica del producto inhibidor, lo que lleva a alcanzar un nuevo nivel de control. Esta situación no es, por tanto, una alteración del control de la replicación ya que, después de estabilizarse la nueva concentración de DNA, ésta se mantiene constante y, por tanto, regulada.

La alteración del control de la replicación implica la variación de la frecuencia de inicios de replicación, con el consecuente incremento o disminución de la concentración de DNA de forma continuada. Cuando se sobreexpresa σ^{32} de forma constitutiva, en estirpes transformadas con pRPH184, se consigue tras un cambio de temperatura de 30°C a 41°C un aumento continuado de la relación DNA/masa. Este aumento es superior cuando la RNA polimerasa está parcialmente inactivada (Fig. 22).

Un aumento de la temperatura de incubación lleva asociada la bajada transitoria de actividad de la RNA polimerasa (304) y la competencia entre las subunidades σ^{32} y σ^{70} por su unión a la RNA polimerasa es más acentuada cuando σ^{32} es requerida para la supervivencia celular (403). Por tanto, en las condiciones experimentales descritas la mayor concentración de σ^{32} en la célula desplazará la RNA polimerasa activa hacia los promotores de los genes de choque térmico. Ya que en la bacteria transformada con pRPH184 hay la misma cantidad de σ^{32} que en la misma bacteria tratada con rifampicina, que en esta bacteria tras choque térmico hay la misma cantidad de σ^{32} con o sin tratamiento con rifampicina y que en la bacteria parental tras choque térmico hay la misma cantidad de σ^{32} con o sin tratamiento con rifampicina, y sin embargo en todos los casos citados la frecuencia de los inicios de replicación en las bacterias tratadas con rifampicina es considerablemente superior a la de las no tratadas, podemos concluir que el efecto de la inducción de σ^{32} no es su actividad directa sobre el origen, o indirecta a través de la inducción de las proteínas de choque térmico, sino sobre la relación RNA polimerasa - σ^{32} / RNA polimerasa - σ^{70} . No es la sobreexpresión de σ^{32} la

causa directa del aumento de la frecuencia de los inicios de la replicación, sino que esta frecuencia aumenta cuando ambas subunidades σ tienen que competir por la enzima limitante.

Estos resultados parecen así apuntar hacia una alteración del control causada por competencia entre las subunidades σ^{32} y σ^{70} por una RNA polimerasa limitante. La competencia entre σ^{32} y σ^{70} por una cantidad limitante de RNA polimerasa hará disminuir la expresión de los genes cuyos promotores sean reconocidos por σ^{70} . La expresión de estos genes depende además de la afinidad de σ^{70} por sus respectivos promotores, por lo que su disminución hará que los más débiles, es decir los constitutivos, sean los primeros en dejar de expresarse. En términos generales podemos decir que todo gen cuyo producto sea regulador de alguna actividad génica ha de ser constitutivo y, por tanto, de promotor débil, por lo que estos genes serán los más afectados por la disminución de la unión RNA polimerasa - σ^{70} . Entre estos genes estará el que codifique a un posible inhibidor del inicio de la replicación, como predice el modelo de Pritchard (293, 295), cuya desaparición afectará positivamente a la frecuencia de los inicios, ajenanamente a su dilución por la duplicación de la masa celular; su disminución relativa al crecimiento general celular aumentaría paulatinamente la frecuencia de inicios o disminuiría gradualmente la masa de iniciación de la replicación.

2.1. UN MODELO PARA EL CONTROL DE LA REPLICACION CROMOSOMICA

Los resultados presentados en esta memoria junto con los obtenidos por nuestro grupo de investigación han llevado a proponer un modelo para el control de la replicación cromosómica en *Escherichia coli* (161).

Los resultados obtenidos previamente a este trabajo pusieron de manifiesto la intervención de la RNA polimerasa en el mecanismo que controla la iniciación (116, 117). Cuando la actividad de la RNA polimerasa está reducida se obtiene tras el cambio de temperatura un porcentaje mayor de inducción térmica de la replicación y el incremento de la concentración de DNA; este incremento también lo presentan mutantes de transcripción relajada y estirpes con cantidades altas de σ^{32} . El que la reducción de la actividad de transcripción lleve a un incremento de la concentración de DNA indica que se ha producido la disminución de un producto inhibidor de la iniciación. Por esto, en el modelo se sugiere la existencia de un producto génico inhibidor del inicio, cuya expresión es muy sensible a las variaciones de la RNA polimerasa unida a σ^{70} (116, este trabajo) y a las

variaciones de ppGpp, estando positivamente regulado por este factor, (117, 161). Si el producto inhibidor se mantuviera a una concentración limitada y actuara uniéndose a *oriC*, su efecto dependería del número de copias de *oriC* y sería más sensible a las modificaciones por cambios en la transcripción de lo que se ha observado. En el modelo propuesto la cantidad celular de este inhibidor o no es limitante o es autorregulada para mantener su capacidad inhibidora independientemente del número de orígenes por célula. El inicio de la replicación no será la consecuencia de su dilución, su concentración se mantendrá a un nivel constante, sino que se propone que su efecto inhibidor sobre el inicio es eliminado por la aparición de una señal cíclica que podría anular o modificar al producto inhibidor. Esta señal podría estar relacionada, estableciendo un paralelismo con el ciclo celular de eucariontes (231, 264, 268, 269), con los flujos de calcio en la célula donde podría estar implicada la actividad de la proteína PinO, cuya síntesis *de novo* parece ser la única requerida para el inicio.

De igual forma que la célula determina así el momento del inicio de la replicación, en el que el nivel del producto o del efecto inhibidor se reducen, el aumento del número de orígenes por célula provocado por el cambio de la temperatura de incubación afectan al control reduciendo la concentración del inhibidor. Los resultados obtenidos tras la inducción térmica de la replicación parecen indicar que el nivel del producto inhibidor permite alteraciones del número de orígenes dentro de unos límites, pero que una vez superado un umbral de la relación orígenes/inhibidor el efecto inhibidor queda anulado, de igual forma que por la acción de la señal cíclica. Estas replications son extemporáneas y llevan a un aumento transitorio de la frecuencia de inicios que a tiempos posteriores se recuperara al alcanzar de nuevo el nivel de inhibidor efectivo para el número de orígenes posteriormente establecido, ya que el control de la expresión del inhibidor no es alterado en estas condiciones. El tiempo en que la célula tarde en recuperar ese nivel determinará el que se tarde en alcanzar la nueva situación de equilibrio. Cuando la expresión del inhibidor sea afectada de forma continua, como en el caso de la sobreexpresión constitutiva de σ^{32} , estará impedido el restablecimiento de su nivel umbral que llevará, en este caso, al aumento continuo de la frecuencia de iniciación.

Los resultados presentados en este trabajo indican que un aumento brusco de la temperatura de incubación a un cultivo no sólo implica un efecto acelerador sobre la replicación, sino que conduce a la pérdida de su control de forma transitoria.

Numerosos estudios genéticos hacen uso de mutantes termosensibles o del control de la expresión de genes por promotores termoinducibles, que en ciertas situaciones han llevado a interpretaciones controvertidas. El análisis del comportamiento de estos mutantes o de la termoinducción de la expresión de genes debe ser cuidadosamente comparado al de la estirpe parental, teniendo en cuenta las alteraciones observadas en este trabajo que ejerce el aumento de la temperatura sobre la replicación.

CONCLUSIONES

- 1.** Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el aumento de la temperatura de incubación a un cultivo de *Escherichia coli* induce una replicación cromosómica suplementaria.
- 2.** El inicio de la replicación termoinducida tiene lugar en *oriC* y depende de su funcionalidad.
- 3.** El inicio de la replicación termoinducida no requiere la actividad de la RNA polimerasa y tiene lugar en ausencia de síntesis de proteínas. Esta replicación no es regulada por el mediador de la respuesta restringida, el ppGpp. Estas características implican que la replicación termoinducida no está regulada por los factores que regulan la replicación fisiológicamente normal.
- 4.** La inducción de la replicación descrita en este trabajo es estrictamente dependiente del aumento brusco de la temperatura de incubación y no de la inducción de la respuesta de choque térmico.
- 5.** El mecanismo de inducción de esta replicación es parcialmente dependiente de σ^{32} , de RNasa HI y de RecA.
- 6.** El número de orígenes en los que se induce la replicación térmica varía con el rango del aumento de la temperatura de incubación y con la velocidad de crecimiento.
- 7.** El periodo de elongación de estas replications es mayor que el de las replications fisiológicas.
- 8.** La concentración de DNA aumenta, tras un cambio de temperatura, al sobrepasar un umbral de inducción de inicios extras de replicación.

- 9.** La alteración del control de la replicación debida a la sobreproducción de σ^{32} parece estar causada por la competencia entre σ^{32} y σ^{70} por la RNA polimerasa. Consecuentemente se producirá la disminución de la tasa de transcripción de los promotores de genes reguladores reconocidos por σ^{70} , entre los que se encontrará el inhibidor del inicio de la replicación.

- 10.** Las alteraciones del control de la replicación observadas en este trabajo permiten proponer un nuevo modelo para el control de la replicación cromosómica en *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al profesor Dr. Alfonso Jiménez Sánchez por la dirección de este trabajo y por su decisiva labor en mi formación científica. ... y por sus lecciones de Mac.

A los miembros del Area de Genética, a los que fueron y a los que son, por sus ayudas y sugerencias a lo largo de este trabajo y por lo que de ellos aprendí.

A los componentes de las Areas de Microbiología, Citología y Fisiología Vegetal de esta Facultad y especialmente a los de Bioquímica y Biología Molecular por estar ahí para lo que los necesité.

A los doctores M. E. Armengod, E. Boye, R. Díaz-Orejas, C. A. Gross, T. Kogoma, Y. Kohara, J. Louarn, R. A. VanBogelen y T. Yura por la donación de las estirpes bacterianas, plásmidos y fagos utilizados en este trabajo. Mi agradecimiento en especial a la Dra. J. Louarn por el envío de su método para la determinación de la frecuencia de marcadores, sus consejos y sugerencias acerca de esta técnica y su “debe funcionar”.

A quienes, no habiendo participado directamente en este trabajo, lo han vivido junto a mí, muchas gracias.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la financiación del trabajo a través de los proyectos PB87-0975 y PB91-0559 y la beca predoctoral del Programa General concedidos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Allen, G. C. Jr., N. E. Dixon y A. Kornberg.** 1993. Strand switching of a replicative DNA helicase promoted by the *E. coli* primosome. *Cell* **74**:713-722.
2. **Anfisen, C. B. y H. A. Sheraga.** 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* **29**:205-299.
3. **Ang, D. y C. Georgopoulos.** 1989. The heat-shock-regulated *grpE* gene of *Escherichia coli* is required for bacterial growth at all temperatures but is dispensable in certain mutant backgrounds. *J. Bacteriol.* **171**:2748-2755.
4. **Armengod, M. E.** 1982. *recF*-dependent recombination as a SOS function. *Biochimie* **64**:629-632.
5. **Asai, T., C-P. Chen, T. Nagata, M. Mitsuru y M. Imai.** 1992. Transcription *in vivo* within the replication origin of the *Escherichia coli* chromosome: a mechanism for activating initiation of replication. *Mol. Gen. Genet.* **231**:169-178.
- 5.a. **Asai, T., S. Sommer, A. Bailone y T. Kogoma.** 1993. Homologous recombination dependent initiation of DNA replication from DNA damage inducible origins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**:3287-3295.
6. **Asai, T., M. Takanami y M. Imai.** 1990. The AT richness and *gid* transcription determine the left border of the replication origin of the *E. coli* chromosome. *EMBO J.* **9**:4065-4072.
7. **Atherly, A. G.** 1981. ppGpp metabolism and the regulation of growth, ribonucleic acid, and protein synthesis. *Microbiology D. Schlessger* (ed). ASM, Washington, D. C. pp. 7-10.
8. **Atlung, T., E. S. Clausen y F. G. Hansen.** 1985. Autoregulation of the *dnaA* gene of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **200**:442-450.
9. **Atlung, T. y F. G. Hansen.** 1993. Three distinct chromosome replication states are induced by increasing concentrations of DnaA protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:6537-6545.
10. **Bachmann, B. J.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
11. **Bachmann, B. J.** 1987. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1190-1219.
12. **Bagdasarian, M.M.** 1977. Suppression of the *dnaA* phenotype by mutations in the *rpoB* cistron of ribonucleic acid polymerase in *Salmonella typhimurium* and *E. coli*. *J. Bacteriol.* **130**:577-582.
13. **Bahl, H., H. Echols, D. Straus, D. Court, R. Crowl y C. Georgopoulos.** 1987. Induction of a heat shock response of *E. coli* through stabilization of σ^{32} by phage λ cIII protein. *Genes Dev.* **1**:57-64.
14. **Baker, T. A., A. D. Grossman y C. A. Gross.** 1984. A gene regulating the heat shock response in *E. coli* also causes a defect in proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6799-6783.
15. **Baker, T. A. y A. Kornberg.** 1988. Transcriptional activation of initiation of replication from the *E. coli* chromosomal origins: an RNA-ADN hybrid near *oriC*. *Cell* **55**:113-123.
16. **Baker, T. A., B. E. Funnell, A. Kornberg.** 1987. Helicase action of DnaB protein during replication from the *Escherichia coli* chromosomal origin *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **262**: 6877-6885.

17. **Baker, T. A., K. Sekimizu, B. E. Funnell y A. Kornberg.** 1986. Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell* **45**:53-64.
18. **Baker, T. A. y S. H. Wickner.** 1992. Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **26**:447-477.
19. **Bakker, A. y D. W. Smith.** 1989. Methylation of GATC sites is required for precise timing between rounds of DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:5738-5742.
20. **Balke, V. L. y J. D. Gralla.** 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**:4499-4506.
21. **Baracchini, E. y H. Bremer.** 1988. Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp. *J. Biol. Chem.* **263**:2579-2602.
22. **Baran, N., A. Lapidot y H. Manor.** 1987. Unusual sequence element found at the end of an amplicon. *J. Mol. Cell. Biol.* **7**:2636-2640.
23. **C. Bardwell, J. A. y E. A. Graig.** 1988. Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170**:2977-2983.
24. **Bastia, D., J. Germino, J. H. Crosa y P. Hale.** 1981. Molecular cloning of the replication terminus of the plasmid R6K. *Gene* **14**:81-89.
25. **Beacham, I. R., P. T. Barth y R. H. Pritchard.** 1968. Constitutivity of thymidine phosphorylase in deoxyribodolase negative strains: dependence on thymine requirement and concentration. *Bioph. Biochem. Abstrac* **166**:589-592.
26. **Béjar, S. y J. P. Bouché.** 1983. Molecular cloning of the region of the terminus of *E. coli* K-12 DNA replication. *J. Bacteriol.* **153**:604-609.
27. **Bernander, R., S. Dasgupta y K. Nordström.** 1991. The *E. coli* cell cycle and the plasmid R1 replication cycle in the absence of the DnaA protein. *Cell* **64**:1145-1153.
28. **Blum, P., J. Ory, J. Bauernfeind y J. Krska.** 1992. Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7436-7444.
29. **Bourgaize, D. B., T. A. Phillips, R. A. VanBogelen, P. G. Jones, F. C. Neidhardt y M. J. Fournier.** 1990. Loss of 4.5S RNA induces the heat shock response and lambda prophage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:1151-1154.
30. **Boye, E.** 1991. The hemimethylated replication origin of *Escherichia coli* can be initiated *in vitro*. *J. Bacteriol.* **173**:4537-4539.
31. **Boye, E.** 1991. A turnstile for initiation of DNA replication. *Trends in Cell Biol.* **1**:107-109.
32. **Boye, E. y A. Løbner-Olesen.** 1990. The role of dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **62**:981-989.
33. **Bramhill, D. y A. Kornberg.** 1988. Duplex opening by *dnaA* protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of *E. coli* chromosome. *Cell* **52**:743-755.
34. **Bramhill, D. y A. Kornberg.** 1988. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**:915-918.
35. **Braun, R. E. y A. Wright.** 1986. DNA methylation differentially enhances the expression of one of two *E. coli dnaA* promoters *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* **202**:246-250.
36. **Braun, R. E., K. O'Day y A. Wright.** 1985. Autorregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli*. *Cell* **52**:743-755.
37. **Braun, R. E., K. O'Day, y A. Wright.** 1985. Autoregulation of the DNA replication gene *dnaA* in *E. coli* K-12. *Cell* **40**:159-169.
38. **Bremer, H. y G. Churchward.** 1977. Deoxyribonucleic acid synthesis after inhibition of initiation of rounds of replication in *E. coli* B/r. *J. Bacteriol.* **130**:692-697.
39. **Bremer, H. y G. Churchward.** 1991. Control of cyclic chromosome replication in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**:459-475.
40. **Bremer, H. y P. P. Dennis.** 1987. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1527-1542.
41. **Budman, D. R. y A. B. Pardee.** 1967. Thymidine and thymine incorporation into nucleic acid: inhibition and repression by uridine of thymidine phosphorylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **94**:1546-1550.

42. **Bukau, B. y G. C. Walker.** 1989. Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* *dnaK* gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J. Bacteriol.* **171**:2337-2346.
43. **Bukau, B. y G. C. Walker.** 1989. *DdnaK* mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenance at normal growth temperatures. *J. Bacteriol.* **171**:6030-6038.
44. **Bukau, B. y G. C. Walker.** 1990. Mutations altering heat shock specific subunit of RNA polymerase suppress major cellular defects of *E. coli* mutants lacking the DnaK chaperone. *EMBO J.* **9**:4027-4036.
45. **Campbell, J. L. y N. Kleckner.** 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.
46. **Cao, Y. y T. Kogoma.** 1993. Requirement for the polymerization and 5'→3' exonuclease activities of DNA polymerase I in initiation of DNA replication at oriK sites in the absence of RecA in *Escherichia coli* *rnhA* mutants. *J. Bacteriol.* **175**:7254-7259.
47. **Cashel, M. y K. E. Rudd.** 1987. The stringent response. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1410-1438.
- 47.a. **Cesarini, G.** 1981. The target of the negative regulator of pHB1 replication overlaps with part of the repressor coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* **184**:40-45.
48. **Clewell, D. B. y D. R. Helinski.** 1972. Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **110**:1135-1146.
49. **Cohen, S. N., A. C. Y. Chang y L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:2110.
50. **Cooper, S. y C. E. Helmstetter.** 1968. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **31**:519-540.
51. **Cowing, D. W., J. C. A. Bardwell, E. A. Craig, C. Woolford, R. W. Hendrix y C.A. Gross.** 1985. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2679-2683.
52. **Craig, E. A. y C. A. Gross.** 1991. Is hsp70 the cellular thermometer?. *Trends Biochem. Sci.* **16**:135-140.
53. **Chakraborti, A., S. Gunji, N. Shakibai, J. Cubeddu y L. Rothfield.** 1992. Characterization of the *Escherichia coli* membrane domain responsible for binding *oriC* DNA. *J. Bacteriol.* **174**:7202-7206.
54. **Chiaramello, A. E. y J. W. Zyskind.** 1989. Expression of *Escherichia coli* *dnaA* and *mioC* genes as a function of growth rate. *J. Bacteriol.* **171**:4272-4280.
55. **Chiaramello, A. E. y J. W. Zyskind.** 1990. Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **172**:2013-2019.
56. **Christman, M. F. y R. W. Morgan.** 1985. Positive control of regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**:753-762.
- 56.a. **Chuang, S. y F. R. Blattner.** 1993. Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:5242-5252.
57. **Churchward, G., E. Estiva y H. Bremer.** 1981. Growth rate-dependent control of chromosome replication initiation in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **145**:1232-1238.
58. **Churchward, G. y H. Bremer.** 1977. Determination of deoxyribonucleic acid replication time in exponentially growing *E. coli* B/r. *J. Bacteriol.* **130**:1206-1213.
59. **Delaney, J. M.** 1990. Phenotype of an *Escherichia coli* *grpE* mutant. *J. Gen. Microbiol.* **136**:797-801.
60. **Delaney, J. M.** 1990. A *cya* deletion mutant of *Escherichia coli* develops thermotolerance but does not exhibit a heat-shock response. *Genet. Res.* **55**:1-6.
61. **Dodson, M., H. Echols, S. Wickner, C. Alfano, K. Mensa-Wilmot y R. McMaken.** 1986. Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage lambda:

- localized unwinding of duplex DNA by a six-protein reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:7638-7642.
62. **Donachie, W.** 1968. Relation between cell size and time of initiation of DNA replication. Nature **219**:1077-1079.
 63. **Donachie, W.** 1992. What is the minimum number of dedicated functions required for a basic cell cycle?. Curr. Opin. Genet. Develop. **2**:792-798.
 64. **Donnelly, C. E. y G. C. Walker.** 1989. *groE* mutants of *Escherichia coli* are defective in *umuDC* dependent UV mutagenesis. J. Bacteriol. **171**:6117-6125.
 65. **Dorman, C. J., G. C. Barr, N. Ni Bhriain y C. F. Higgins.** 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. J. Bacteriol. **170**:2816-2826.
 66. **Drahos, D. J. y R. W. Hendrix.** 1982. Effect of bacteriophage lambda infection on synthesis of GroE protein and other *Escherichia coli* proteins. J. Bacteriol. **149**:1050-1063.
 67. **Drlica, K.** 1984. Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. Microbiol. Rev. **48**: 273-289.
 68. **Drlica, K.** 1987. The nucleoid. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 91-103.
 69. **Drlica, K., R. J. Franco y T. R. Steck.** 1988. Rifampin and *rpoB* mutations can alter DNA supercoiling in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**:4983-4985.
 70. **Duguet, M.** 1993. The helical repeat of DNA at high temperature. Nucleic Acids Res. **21**:463-468.
 71. **Eisenbeis, S. J. y J. Parker.** 1981. Strains of *Escherichia coli* carrying the structural gene for histidyl-tRNA synthetase on a high copy number plasmid. Mol. Gen. Genet. **183**:115-122.
 72. **Ellis, R. J. y S. M. Hemmingsen.** 1989. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. Trends Biochem. Sci. **14**:339-342.
 73. **Ellis, R. J. y S. M. Van Der Vies.** 1991. Molecular chaperones. Ann. Rev. Biochem. **60**:321-347.
 74. **Ezaki, B., T. Ogura, H. Mori, H. Niki y S. Hiraga.** 1989. Involvement of DnaK protein in mini-F plasmid replication: Temperature-sensitive *seg* mutations are located in the *dnaK* gene. Mol. Gen. Genet. **218**:183-189.
 75. **Farr, S. B. y T. Kogoma.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev. **55**:561-585.
 76. **Fayet, O., J. M. Louarn y C. Georgopoulos.** 1986. Suppression of *E. coli dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. Mol. Gen. Genet. **202**:435-445.
 77. **Fayet, O., T. Ziegelhoffer y C. Georgopoulos.** 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. J. Bacteriol. **171**:1379-1385.
 78. **Feinberg, A. P. y B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **123**:6-13.
 79. **Feinberg, A. P. y B. Vogelstein.** 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum Anal. Biochem. **137**:266-267.
 80. **Filutowicz, M. y P. Jonczyk.** 1983. The *gyrB* gene product function in both initiation and chain polymerization of *E. coli* chromosome replication: Suppression of the initiation deficiency in *gyrB-ts* mutants by a class of *rpoB* mutations. Mol. Gen. Genet. **191**:282-287.
 81. **Filutowicz, M.** 1980. Requirement of DNA gyrase for the initiation of chromosome replication in *E. coli* K-12. Mol. Gen. Genet. **177**:301-309.
 82. **Filutowicz, M. y J. Roll.** 1990. The requirement of IHF protein for extrachromosomal replication of the *Escherichia coli oriC* in a mutant deficient in DNA polymerase I activity. New Biol. **2**:818-827.
 83. **Filutowicz, M. y P. Jonczyk.** 1981. Essential role of the *gyrB* gene product in the transcriptional event coupled to *dnaA*-dependent initiation of *E. coli* chromosome replication. Mol. Gen. Genet. **183**:134-138.
 84. **Filutowicz, M., W. Ross, J. Wild y R. L. Gourse.** 1992. Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. J. Bacteriol. **174**:398-407.

85. **Foster, P. L. y M. G. Marinus.** 1992. Levels of epsilon, an essential replication subunit of *Escherichia coli* DNA Polymerase-III, are controlled by heat shock proteins. *J. Bacteriol.* **174**:7509-7516.
86. **Frank-Kamenetskii, M.** 1989. Waves of DNA supercoiling. *Nature* **337**: 206.
87. **Friedman, D. E., E. R. Olson, C. Georgopoulos, K. Tilly, I. Herskowitz y F. Banuett.** 1984. Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage λ . *Microbiol. Rev.* **48**:299-325.
- 87.a. **Fry, I. J., M. Becker-Hapak y J. H. Hageman.** 1991. Purification and properties of an intracellular calmodulinlike protein from *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **173**:2506-2513.
88. **Fujita, N. y A. Ishihama.** 1987. Heat-shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in *E. coli*: transcriptional control and a multiple promoter system. *Mol. Gen. Genet.* **210**:10-15.
89. **Fuller, R. S., B. E. Funnell y A. Kornberg.** 1984. The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* **38**:889-900.
90. **Fuller, R. S., J. M. Kaguni y A. Kornberg.** 1981. Enzymatic replication of the origin of the *E. coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7370-7374.
91. **Funnell, B. E., T. A. Baker y A. Kornberg.** 1986. Complete enzymatic replication of plasmid containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **261**:5616-5624.
92. **Funnell, B. E., T. A. Baker y A. Kornberg.** 1987. *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**:10327-10334.
93. **Gallant, J. A.** 1979. Stringent control in *E. coli*. *Ann. Rev. Genet.* **13**:393-415.
94. **Gamer, J., H. Bujard y B. Bukau.** 1992. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ^{32} . *Cell* **69**:833-842.
95. **Gayama, S., T. Kataoka, M. Wachi, G. Tamura y K. Nagai.** 1990. Periodic formation of the *oriC* complex of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **9**:3761-3765.
96. **Geier, G. E., y P. Modrich.** 1979. Recognition sequence of the *dam* methylase of *Escherichia coli* K-12 and mode of cleavage of DpnI endonuclease. *J. Biol. Chem.* **254**:1408-1413.
97. **Georgopoulos, C.** 1992. The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sci.* **17**:295-299.
98. **Georgopoulos, C., D. Ang, A. Maddock, S. Raina, B. Lipinska y M. Zylicz.** 1990. Heat shock response of *Escherichia coli*. The bacterial chromosome. K. Drlica y M. Riley (eds.), ASM, Washington, DC. pp. 405-419.
99. **Gille, H., J. B. Egan, A. Roth y W. Messer.** 1991. The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **19**:4167-4172.
100. **Gille, H. y W. Messer.** 1991. Localized DNA melting and structural perturbations in the origin of replication, *oriC*, of *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* **10**:1579-1584.
101. **Giraldo-Suárez, R., E. Fernández-Tresguerres, R. Díaz-Orejas, A. Malki y M. Kohiyama.** 1993. The heat shock DnaK protein is required for plasmid R1 replication and it is dispensable for plasmid ColE1 replication. *Nucleic Acids Res.* **21**:5495-5499.
102. **Girvitz, S. C., S. Bacchetti, A. J. Rainbow y F. L. Graham.** 1980. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.* **106**:492.
103. **Goff, S. A. y A. L. Goldberg.** 1985. Production of abnormal proteins in *Escherichia coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**:587-595.
104. **Goff, S. A., L. P. Casson y A. L. Goldberg.** 1984. The heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6647-6651.
105. **Goldstein, E. y K. Drlica.** 1984. Regulation of bacterial DNA supercoiling: Plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4046-4050.
106. **Goldstein, J., N. S. Pollitt y M. Inouye.** 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:283-287.
107. **Gottesman, S.** 1989. Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **23**:163-198.

108. **Gottesman, S. y M. R. Maurizi.** 1992. Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* **56**:592-621.
109. **Gross, C. A., A. D. Grossman, H. Liebke, W. Walter y R.R. Burgess.** 1984. Effects of mutant sigma allele *rpoD* 800 on the synthesis of specific macromolecular components of the *Escherichia coli* K-12 cell. *J. Mol. Biol.* **172**:283-300.
110. **Grossman, A. D., D. B. Straus, W. A. Walter y C.A. Gross.** 1987. σ^{32} synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **1**:179-184.
111. **Grossman, A. D., J. W. Erickson y C. A. Gross.** 1984. The *htpR* gene product of *Escherichia coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**:383-390.
112. **Grossman, A. D., W. E. Taylor, Z. F. Burton, R. R. Burgess y C. A. Gross.** 1985. Stringent response in *Escherichia coli* induces expression of heat shock proteins. *J. Mol. Biol.* **186**:357-365.
113. **Grossman, A. D., Y. Zhou, C. Gross, J. Heilig y G. E. Christie.** 1985. Mutations in the *rpoH* (*htpR*) gene of *Escherichia coli* K-12 phenotypically suppress a temperature-sensitive mutant defective in the σ^{70} subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **161**:939-943.
114. **Guijo, M. I.** 1988. Análisis de la replicación de choque térmico. Tesis de Licenciatura. Departamento de Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.
115. **Guzmán, E. C. y A. Jiménez-Sánchez.** 1991. Location of *pinO*, a new gene located between *tufA* and *rpsJ*, on the physical map of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **173**:7409.
116. **Guzmán, E. C., A. Jiménez-Sánchez, E. Orr y R. H. Pritchard.** 1988. Heat stress in the presence of low RNA polymerase activity increases chromosome copy number in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **212**:203-206.
117. **Guzmán, E. C., F. J. Carrillo y A. Jiménez-Sánchez.** 1988. Differential inhibition of the initiation of DNA replication in stringent and relaxed strains of *E. coli*. *Genet. Res.* **51**:173-177.
118. **Guzmán, E. C., R. H. Pritchard y A. Jiménez-Sánchez.** 1991. A calcium-binding protein that may be required for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **142**:137-140.
119. **Hanawalt, P., O. Maaløe, D. J. Cummings. y M. Schaenchter.** 1961. The normal DNA replication cycle. II. *J. Mol. Biol.* **3**:156-165.
120. **Hansen, F. G., B. B. Christensen y T. Atlung.** 1991. The initiator titration model: computer simulation of chromosome and minichromosome control. *Res. Microbiol.* **142**:161-167.
121. **Hansen, F. G., E. B. Hansen y A. Atlung.** 1982. The nucleotide sequence of the *dnaA* gene promoter and of the adjacent *rpmH* gene, coding for the ribosomal protein L34, of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **1**:1043-1048.
122. **Hansen, F. G. y K. V. Rasmussen.** 1977. Regulation of the *dnaA* product in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **155**:219-225.
123. **Hansen, F. G., T. Atlung, R. E. Braun, A. Wright, P. Hughes y M. Kohiyama.** 1991. Initiator (DnaA) protein concentration as a function of growth rate in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**:5194-9199.
124. **Haseltine, W.A. y R. Block.** 1973. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:1564-1568.
125. **Hecker, M., A. Schoeter y F. Mach.** 1983. Replication of pBR322 DNA in stringent and relaxed strains of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **190**:355-357.
126. **Heery, D. M., F. Gannon y R. Powell.** 1990. A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends in Genet.* **6**:173.
127. **Helmstetter, C. E.** 1987. Timing of synthetic activities in the cell cycle. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1594-1605.
128. **Helmstetter, Ch. y A. C. Leonard.** 1987. Coordinate initiation of chromosome and minichromosome replication in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**:3489-3494.

129. **Hendrickson, W. G., T. Kusano, H. Yamaki, R. Balakrishnan, M. King, J. Murchie y M. Schaechter.** 1982. Binding of the origin of replication of *Escherichia coli* to the outer membrane. *Cell* **30**:915-923.
130. **Henson, J. M. y P. L. Kuempel.** 1985. Deletion of the terminus region (340 kilobase pairs of DNA) from the chromosome of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3766-3770.
131. **Herendeen, S. L., R. A. VanBogelen y F. C. Neidhardt.** 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**:185-194.
132. **Herendeen, S., R. VanBogelen y F. C. Neidhardt.** 1979. Levels of major proteins of *E. coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**:185-194.
133. **Hernandez, P., S. Lamm, C. A. Bjerknes y J. Van'tHof.** 1988. Replication termini in the rDNA of synchronized pea root cells. *EMBO J.* **7**:303-308.
134. **Hernandez, V. J. y H. Bremer.** 1991. *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J. Biol. Chem.* **266**:5991-5999.
135. **Hidaka, M., T. Kobayashi, S. Takenaka, H. Takeya y T. Horiuchi.** 1989. Purification of a DNA replication terminus (*ter*) site-binding protein in *Escherichia coli* and identification of the structural gene. *J. Biol. Chem.* **264**:21031-21037.
136. **Hidaka, M., T. Kobayashi y T. Horiuchi.** 1991. A newly identified DNA replication terminus site, *terE*, on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **173**:391-393.
137. **Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May y E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic control of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.
138. **Higgins, C. F., C. J. Dorman y N. N. Bhriain.** 1990. Environmental influences on DNA supercoiling: a novel mechanism for the regulation of gene expression. *The Bacterial Chromosome*. K. Drlica y M. Riley (eds.), ASM, Washington, DC. pp. 421-432.
139. **Hill, T. M., A. J. Pelletier, M. L. Tecklenburg y P. L. Kuempel.** 1988. Identification of the DNA sequence from the *E. coli* terminus region that halts replication forks. *Cell* **55**:459-466.
140. **Hill, T. M., B. J. Kopp y P. L. Kuempel.** 1988. Termination of DNA replication in *E. coli* requires a trans-acting factor. *J. Bacteriol.* **170**:662-668.
141. **Hill, T. M., J. M. Henson y P. L. Kuempel.** 1987. The terminus regions of the *Escherichia coli* chromosome contains two separate *loci* that exhibit polar inhibition of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:1754-1758.
142. **Holmes, D. S. y M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193.
143. **Holland, B. I.** 1987. Genetic analysis of the *E. coli* division clock. *Cell* **48**:361-362.
144. **Hong, X. y T. Kogoma.** 1993. Absence of a direct role for RNase HI in initiation of DNA replication at the *oriC* site on the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **175**:6731-6734.
145. **Huang, R. Y. y D. Kowalski.** 1993. A DNA unwinding element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome. *EMBO J.* **12**: 4521-4531.
146. **Hwang, B. J., K. M. Woo, A. L. Goldberg y C. H. Chung.** 1988. Protease Ti, a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits. *J. Biol. Chem.* **263**:8727-8734.
147. **Hwang, D. S. y A. Kornberg.** 1990. A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E. coli* minichromosome. *Cell* **63**:325-331.
148. **Hwang, D.S. y A. Kornberg.** 1992. Opposed actions of regulatory proteins, DnaA and IciA, in opening the replication origin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:23087-23091.
149. **Hwang, D. S. y A. Kornberg.** 1992. Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J. Biol. Chem.* **267**:23083-23086.
150. **Hwang, D. S., E. Crooke y A. Kornberg.** 1990. Aggregated *dnaA* protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or *dnaK* protein. *J. Biol. Chem.* **265**:19244-19248.
151. **Ingraham, J. L. y A. G. Marr.** 1963. Control of enzyme biosynthesis at temperature near the minimum for growth of *Escherichia coli*. *Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci.* **124**:319-328.

152. **Ingraham, J.** 1987. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1543-1554.
153. **Itoh, T. y J. Tomizawa.** 1980. Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:2450-2454.
154. **Jacob, F., S. Brenner y F. Cuzin.** 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **28**:329-348.
155. **Jacq, A., H. Lothar, W. Messer y M. Kohiyama.** 1980. Isolation of a membrane protein having an affinity to the replication origin of *E. coli*. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. **19**:189-197.
156. **Jacq, A., M. Kohiyama, H. Lothar y W. Messer.** 1983. Recognition sites for a membrane derived DNA binding protein preparation in the *E. coli* replication origin. Mol. Gen. Genet. **191**:460-465.
157. **Jenkins, A. J., J. B. March, I. R. Oliver y M. Masters.** 1986. A DNA fragment containing the *groE* genes can suppress mutations in the *E. coli dnaA* gene. Mol. Gen. Genet. **202**:446-454.
158. **Jenkins, D. E., E. A. Auger y A. Matin.** 1991. Role of *rpoH*, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival. J. Bacteriol. **173**:1992-1996.
159. **Jenkins, D. E., J. E. Schultz y A. Matin.** 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**:3910-3914.
160. **Jiménez-Sánchez, A. y E. C. Guzmán.** 1988. Direct procedure for the determination of the number of replication forks and the reinitiation fraction in bacteria. CABIOS **4**:431-433.
161. **Jiménez-Sánchez, A., E. C. Guzmán y E. Botello.** 1993. An approach to the control of the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. Current Topics in Mol. Genet. **1**:33-48.
162. **Johnson, C., G. N. Chandrasekhar y C. Georgopoulos.** 1989. *Escherichia coli* DnaK and GrpE heat shock proteins interact both *in vivo* and *in vitro*. J. Bacteriol. **171**:1590-1596.
163. **Jones, P. G., M. Cashel, G. Glaser y F. C. Neidhardt.** 1992. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**:3903-3914.
164. **Junker, D. E., L. A. Rokeach y D. Ganea.** 1986. Transcription termination within the *E. coli* origin of DNA replication, *oriC*. Mol. Gen. Genet. **203**:101-109.
165. **Kaguni, J. M. y A. Kornberg.** 1981. Topoisomerase I confers specificity in enzymatic replication of the *E. coli* chromosomal origin. J. Biochem. **259**:8578-8583.
166. **Kaguni, J. M. y A. Kornberg.** 1984. Replication initiated at the origin (*oriC*) of the *E. coli* chromosome. Reconstituted with purified enzymes. Cell **38**:183-190.
167. **Kaguni, J. M., R. S. Fuller y A. Kornberg.** 1982. Enzymatic replication of *E. coli* chromosomal origin is bidirectional. Nature **296**:623-627.
168. **Kaiser, K.** 1980. The origin of Q-independent derivatives of phage. Mol. Gen. Genet. **179**:547-554.
169. **Kamath-Loeb, A. S. y C. A. Gross.** 1991. Translational regulation of σ^{32} synthesis: Requirement for an internal control element. J. Bacteriol. **173**:3904-3906.
170. **Katayama, T. y T. Nagata.** 1991. Initiation of chromosomal DNA replication which is stimulated without oversupply of DnaA protein in *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. **226**:491-502.
171. **Katayama, Y., S. Gottesman, J. Pumphrey, S. Rudikoff, W. P. Clark y M. R. Maurizi.** 1988. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*: purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. J. Biol. Chem. **263**:15226-15236.
172. **Keller, J. A. y L. D. Simon.** 1988. Divergent effects of a *adnaK* mutation on abnormal protein degradation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **2**:31-41.
173. **Khatri, G. S., T. MacAllister, P. R. Sista y D. Bastia.** 1989. The replication terminator protein of *E. coli* is a DNA sequence-specific contra-helicase. Cell **59**:667-674.

- 173.a. **Klee, C. B., T. H. Crouch y P. G. Richman.** 1980. Calmodulin. *Ann. Rev. Biochem.* **49**:489-515.
- 173.b. **Kline, B. C.** 1982. Genetic evidence that control of F replication is negative. *Mol. Gen. Genet.* **183**:218-224.
174. **Kobayashi, T., M. Hidaka y T. Horiuchi.** 1989. Evidence of a *ter* specific binding protein essential for the termination reaction on DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**:2435-2441.
175. **Kochan, J. y H. Murialdo.** 1982. Stimulation of *groE* synthesis in *Escherichia coli* by bacteriophage lambda infection. *J. Bacteriol.* **149**:1166-1170.
176. **Kogoma, T.** 1978. A novel *E. coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **121**:55-69.
177. **Kogoma, T.** 1986. RNase H-defective mutants of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **166**:361-363.
178. **Kogoma, T. y G. Lark.** 1975. Characterization of the replication of *E. coli* DNA in the absence of protein synthesis: Stable DNA replication. *J. Mol. Biol.* **94**:243-256.
179. **Kogoma, T. y K. G. Lark.** 1970. DNA replication in *E. coli*: Replication in absence of protein synthesis after replication. *J. Mol. Biol.* **52**:143-164.
180. **Kogoma, T., K. Skarstad y E. Boye.** 1985. RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **163**:439-444.
181. **Kogoma, T. y K. von Meyenburg.** 1983. The origin of replication, *oriC*, and the *dnaA* protein are dispensable in stable DNA replication (*sdrA*) mutants of *Escherichia coli* K-12. *EMBO J.* **2**:463-468.
182. **Kogoma, T., N. L. Subia y K. von Meyenburg.** 1985. Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **200**:103-109.
183. **Kogoma, T., T. A. Torrey y M. J. Connaughton.** 1979. Induction of UV-resistant DNA replication in *E. coli*: Induced stable DNA replication as an SOS function. *Mol. Gen. Genet.* **176**:1-9.
184. **Kohara, Y., K. Akiyama y K. Isomo.** 1987. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* **50**:495-508.
185. **Kohara, Y., N. Tohdoh y X-W. Jiang.** 1985. The distribution and properties of RNA primed initiation sites of DNA synthesis at the replication origin of *E. coli* chromosome. *Nucleic Acids Res.* **13**:6847-6865.
186. **Koppes, L. J. H. y K. von Meyenburg.** 1987. Nonrandom minichromosome replication in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**:430-433.
187. **Koppes, L. y K. Nordström.** 1986. Insertion of an R1 plasmid into the origin of replication of the *E. coli* chromosome: Random timing of replication of the hybrid chromosome. *Cell* **44**:117-124.
188. **Kornberg, A., T. A. Baker, L. L. Bertsch, D. Bramhill, B. E. Funnell, R. S. Lasken, H. Maki, S. Maki, K. Sekinizu y E. Wahle.** 1987. Enzymatic studies of replication of *oriC* plasmids. In DNA replication and recombination. T. J. Kelly y R. McMacken (ed.). Alan R. Liss., New York. pp. 137-149.
189. **Kowalski, D. y M. J. Eddy.** 1989. The DNA unwinding element: a novel, cis-acting component that facilitates opening of the *Escherichia coli* replication origin. *EMBO J.* **8**:4335-4344.
190. **Kroh, H. E. y L. D. Simon.** 1990. The ClpP component of Clp protease is the σ^{32} - dependent heat shock protein F21.5. *J. Bacteriol.* **172**:6026-6034.
191. **Kruger, J. H. y G. C. Walker.** 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *E. coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR+* - dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1499-1503.
192. **Kücherer, C., H. Lothar, R. Kolling, M. A. Schuauzu y W. Messer.** 1986. Regulation of transcription of the chromosomal *dnaA* gene of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **205**:115-121.
193. **Kuempel, P., S. Duerr y N. Seeley.** 1977. Terminus region of the chromosome in *E. coli* inhibits replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:3927-3931.

194. **Kusano, T., D. Steinmetz, W. G. Hendrickson, J. Murchie y M. King.** 1984. Direct evidence for specific binding of the replicative origin of the *E. coli* chromosome to the membrane. *J. Bacteriol.* **158**:313-316.
195. **Kusukawa, N., y T. Yura.** 1988. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* **2**:874-882.
196. **Kusukawa, N., T. Yura, C. Ueguchi, Y. Akiyama y K. Ito.** 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**:3517-3521.
- 196.a. **Lacatena, R. M. y G. Cesareni.** 1981. Base pairing of RNA I with its complementary sequence in the primer precursor inhibits ColE1 replication. *Nature* **294**:623-626.
197. **Lagosky, P. A. y F. N. Chang.** 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.
198. **Lagosky, P. A. y F. N. Chang.** 1980. Influence of amino acid starvation on guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate basal-level synthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **144**:499-508.
199. **Lamond, A. I. y A. A. Travers.** 1985. Stringent control of bacterial transcription. *Cell* **41**:6-8.
200. **Landick, R., V. Vaughn, E. T. Lau y R. A. VanBogelen.** 1984. Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *E. coli* suggests its protein product may be transcription factor. *Cell* **38**:175-182.
201. **Landoulsi, A., A. Malki, R. Kern, M. Kohiyama y P. Hughes.** 1990. The *E. coli* cell surface specifically prevents the initiation of DNA replication at *oriC* on hemimethylated DNA templates. *Cell* **63**:1053-1060.
202. **Landoulsi, A., P. Hughes, R. Kern y M. Kohiyama.** 1989. *dam* methylation and the initiation of DNA replication on *oriC* plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **216**:217-223.
203. **Langer, T., C. lu, H. Echols, J. Flanagan, M. K. Hayer y F. U. Hartl.** 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GrpE along the pathway of chaperona. *Nature* **356**:683-689.
204. **Lark, K.G.** 1972. Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in *E. coli* 15T-. *J. Mol. Biol.* **64**:47-60.
205. **Lark, K. G. y C. A. Lark.** 1979. *recA*-dependent DNA replication in the absence of protein synthesis: characteristics of a dominant lethal replication mutation *dnaT*, and requirement for *recA*+ function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**:537-549.
206. **Lark, K. G., T. Repko y E. J. Hoffman.** 1963. The effect of amino acid deprivation on subsequent deoxyribonucleic acid replication. *Biochim. Biophys. Acta* **76**:9-24.
207. **Lazzarini, R. A., M. Cashel y J. Gallant.** 1971. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **246**:4381-4385.
208. **LeBowitz, J. H. y R. McMacken.** 1986. The *Escherichia coli* DnaB replication protein is a DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **261**:4738-4748.
209. **Lee, E. H., A. Kornberg, M. Hidaka, T. Kobayashi y T. Horiuchi.** 1989. *Escherichia coli* replication termination protein impedes the action of helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9104-9108.
210. **Lee, P. C., B. R. Bochner y B. N. Ames.** 1983. AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7496-7500.
211. **Lemaux, P. G., S. L. Herendeen, P. L. Bloch y F. C. Neidhardt.** 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* **13**: 427-434.
212. **Lemaux, P. G., S. L. Herendeen, P. L. Bloch y F. C. Neidhardt.** 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* **13**:427-434.
213. **Lesley, S. A., S. B. Jovanovich, Y-C. Tse-Dinh y R. R. Burgess.** 1990. Identification of a heat shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6871-6874.
214. **Levine, A., F. Vannier, M. Dehbi, G. Henckes y S. J. Seror.** 1991. The stringent response blocks DNA replication outside the *ori* region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **219**:605-613.

215. **Liberek, K., D. Skowrya, M. Zylicz, C. Johnson y C. Georgopoulos.** 1991. The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDA heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering dissociation from a bound target protein. *J. Biol. Chem.* **266**:14491-14496.
216. **Liberek, K. y C. Georgopoulos.** 1993. Autoregulation of the *Escherichia coli* heat shock response by the DnaK and DnaJ heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11019-11023.
217. **Liberek, K., J. Marszalek, D. Ang, C. Georgopoulos y M. Zylicz.** 1991. *Escherichia coli* DnaJ y GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2874-2878.
218. **Liberek, K., J. Osipiuk, M. Zylicz, D. Ang, J. Skorko y C. Georgopoulos.** 1990. Physical interactions between bacteriophage and *Escherichia coli* proteins required for initiation of lambda DNA replication. *J. Biol. Chem.* **265**:3022-3029.
- 218.a. **Light, J. y S. Molin.** 1981. Replication control functions of plasmid R1 act as inhibitors of expression of a gene required for replication. *Mol. Gen. Genet.* **184**:56-61.
219. **Lindahl, G. y T. Lindahl.** 1984. Initiation of DNA replication in *E. coli*: RNase H deficient mutants do not require the *dnaA* function. *Mol. Gen. Genet.* **196**:283-289.
220. **Lindquist, S. y E. A. Craig.** 1988. The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**:631-677.
221. **Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird y C. Georgopoulos.** 1989. Identification, characterization and mapping of the *Escherichia coli* *htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**:1574-1584.
222. **Liu, L. F. y J. C. Wang.** 1987. Supercoiling of DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7024-7027.
223. **Løbner-Olesen, A., K. Skarstad, F. G. Hansen, K. von Meyenburg y E. Boye.** 1989. The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K12. *Cell* **57**:881-889.
224. **Løbner-Olesen, A., T. Atlung y K. V. Rasmussen.** 1987. Stability and replication control of *E. coli* minichromosomes. *J. Bacteriol.* **169**:2835-2842.
225. **Løbner-Olesen, A. y E. Boye.** 1992. Different effects of *mioC* transcription on initiation of chromosomal and minichromosomal replication in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **20**:3029-3036.
226. **Lother, H., H.-J. Buhk, G. Morelli, B. Heimann, T. Chakraborty y W. Messer.** 1981. Genes, transcriptional units and functional sites in and around the *E. coli* replication origin. *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* **22**:57-77.
227. **Lother, H., R. Lurz y E. Orr.** 1984. DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res.* **12**:901-914.
228. **Louarn, J., J. P. Bouché, J. Patte y J. M. Louarn.** 1984. Genetic inactivation of topoisomerase I suppresses a defect in initiation of chromosome replication in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **195**:170-174.
229. **Louarn, J., J. Patte y J. M. Louarn.** 1979. Map position of the replication terminus on the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **172**:7-11.
230. **Louarn, J., V. François y J. M. Louarn.** 1990. Chromosome replication pattern in *dam* mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **221**:291-294.
231. **Lu, K. P. y A. R. Means.** 1993. Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Rev.* **14**:40-58.
232. **Lycett, G. W., E. Orr y R. H. Pritchard.** 1980. Chloramphenicol releases a block in initiation of chromosome replication in a *dnaA* strain of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **178**:329-336.
233. **Maaløe, O. y P. C. Hanawalt.** 1961. Thymine deficiency and normal DNA replication cycle. *I. J. Mol. Biol.* **3**:144-155.
234. **Mackow, E. R. y F. N. Chang.** 1983. Correlation between RNA synthesis and ppGpp content in *E. coli* during temperature shifts. *Mol. Gen. Genet.* **192**:5-9.
235. **Magee, T. R., T. Asai, D. Malka y T. Kogoma.** 1992. DNA damage-inducible origins of DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**:4219-4225.

236. **Magee, T. R. y T. Kogoma.** 1990. Requirement of RecBC enzyme and an elevated level of activated RecA for induced stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:1834-1839.
237. **Mahaffy, J. M. y J. W. Zyskind.** 1989. A model for the initiation of replication in *Escherichia coli*. *J. Theor. Biol.* **140**:453-477.
238. **Malki, A., P. Hughes y M. Kohiyama.** 1991. *In vitro* roles of *Escherichia coli* DnaJ and DnaK heat shock proteins in the replication of *oriC* plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **225**:420-426.
239. **Mandel, M. y A. Higa.** 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**:159.
240. **Marians, K. J.** 1992. Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **61**:673-719.
241. **Marinus, M. G., M. Carraway, A. Z. Frey, L. Brown y J. A. Arraj.** 1983. Insertion mutations in the *dam* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **191**:288-289.
242. **Massy de, B., J. Patte, J. Louarn y J. Bouché.** 1984. *oriX*: A new origin of replication in *E. coli*. *Cell* **36**:221-227.
243. **Massy de, B., O. Fayet y T. Kogoma.** 1984. Multiple origin usage for DNA replication in *sdra(rnh)* mutants of *E. coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **178**:227-236.
244. **Massy de, B., S. Béjar, J. Louarn, J. M. Louarn y J. P. Bouché.** 1987. Inhibition of replication forks exiting the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome occurs at two *loci* separated by 5 minutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:1759-1763.
245. **Matsui, M., A. Oka, M. Takanami, S. Yasuda y Y. Hirota.** 1985. Sites of DnaA protein-binding in the replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.* **184**:529-533.
246. **Matthews, R. G. y F. C. Neidhardt.** 1989. Elevated serine catabolism is associated with the heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:2619-2625.
247. **Maurizi, M. R.** 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**:178-201.
248. **Meijer, M., E. Beck, F. G. Hansen, H. E. N. Bergmans, W. Messer, K. von Meyenburg y H. Schaller.** 1979. Nucleotide sequence of the origin of replication of the *E. coli* K-12 chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:580-584.
249. **Menzel, R. y M. Gellert.** 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: Homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**:105-113.
250. **Messer, W.** 1972. Initiation of the deoxyribonucleic acid replication in *E. coli* B/r: chronology of events and transcription control of initiation. *J. Bacteriol.* **112**:7-12.
251. **Messer, W., M. Meijer, H. E. N. Bergmans, F. G. Hansen, K. von Meyenburg, E. Beck y H. Schaller.** 1979. Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**:139-145.
252. **Messing, J.** 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **100**: 20.
253. **Meury, J. y M. Kohiyama.** 1991. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:4404-4410.
254. **Miki, T., T. Orita, M. Funruno y T. Horiuchi.** 1988. Control of cell division by sex factor F in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **201**:327-338.
255. **Miller, J. H.** 1992. The *lac* system. A short course in bacterial genetics. Laboratory manual. J. H. Miller (ed), Cold Spring Harbor laboratory Press. pp. 43-80.
256. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. J. H. Miller (ed), Cold Spring Harbor laboratory Press.
257. **Mizusawa, S. y S. Gottesman.** 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of Sula protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:358-362.
258. **Mizushima, T., S. Natori y K. Sekimizu.** 1993. Relaxation of supercoiled DNA associated with induction of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **238**:1-5.
259. **Nagai, H., R. Yano, J. W. Erickson y T. Yura.** 1990. Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: Involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J. Bacteriol.* **172**:2710-2715.

260. **Natale, D. A., R. M. Umek y D. Kowalski.** 1993. Ease of DNA unwinding is a conserved property of yeast replication origins. *Nucleic Acids Res.* **21**:555-560.
261. **Neidhardt, F. C. y R. A. VanBogelen.** 1987. Heat shock response. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1334-1345.
262. **Neidhardt, F. C., R. A. VanBogelen y E. T. Lau.** 1983. Molecular cloning and expression of a gene that controls the high-temperature regulon of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **153**:597-603.
263. **Neidhardt, F. C., R. A. VanBogelen y V. Vaughn.** 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **18**:295-329.
264. **Norbury, C. y P. Nurse.** 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* **61**:441-470.
265. **Nordström, K., R. Bernander y S. Dasgupta.** 1991. The *Escherichia coli* cell cycle: One cycle or multiple independent processes that are coordinated? *Mol. Microbiol.* **5**:769-774.
266. **Norrande, J., T. Kempe y J. Messing.** 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**:101-106.
267. **Norris, V.** 1990. DNA replication in *E. coli* is initiated by membrane detachment of *oriC*: a model. *J. Mol. Biol.* **214**:1-5.
268. **Norris, V.** 1989. A calcium flux at the termination of replication triggers cell division in *Escherichia coli*. *Cell Calcium* **10**:511-517.
269. **Norris, V., S. J. Seror, S. Casaregola y I. B. Holland.** 1988. A single calcium flux triggers chromosome replication, segregation and septation in bacteria: a model. *J. Theor. Biol.* **134**:341-350.
270. **Nover, L.** 1991. HSFs and HSPs- A stressful program on transcription factors and chaperones. *New Biol.* **3**:855-859.
271. **Nozaki, N., T. Okazaki y T. Ogawa.** 1988. *In vitro* transcription of the origin region of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **163**:14176-14183.
272. **O'Donovan, G. A.** 1978. Thymidine metabolism in bacteria and how or how not to label DNA. *Dna synthesis: Present and Future.* Plenum Publishing Corporation. pp. 219-253.
273. **Ogawa, T. G., G. Pickett, T. Kogoma y A. Kornberg.** 1984. RNase H confers specificity in the *dnaA*-dependent initiation of replication at unique origin of *E. coli* chromosome *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1040-1044.
274. **Ogawa, T., T. A. Baker, A. Van Der Ende y A. Kornberg.** 1985. Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: Contributions of RNA polymerase and primase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3562-3566.
275. **Ogawa, T., y T. Okazaki.** 1984. Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **193**:231-237.
276. **Ogawa, T. y T. Okazaki.** 1991. Concurrent transcription from the *gid* and *mioC* promoters activates replication of an *Escherichia coli* minichromosome. *Mol. Gen. Genet.* **230**:193-200.
277. **Ogden, G. B., M. J. Pratt y M. Schaechter.** 1988. The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when hemimethylated. *Cell* **54**:127-135.
278. **Ohki, R., R. Morita, T. Kawamata, H. Uchida y M. Ohki.** 1989. A complete deletion mutant of the *Escherichia coli dnaK dnaJ* operon. *Biochem. Biophys. Acta* **109**:94-98.
279. **Oka, A., H. Sasaki, K. Sugimoto y M. Takanami.** 1984. Sequence organization of replication origin of the *E. coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.* **176**:443-458.
280. **Oka, A., K. Sugimoto, M. Takanami y Y. Hirota.** 1980. Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol. Gen. Genet.* **178**:9-20.
281. **Orr, E., N. F. Fairweather, I. B. Holland y R. H. Pritchard.** 1979. Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **177**:103-112.
282. **Osawa, T. y T. Yura.** 1981. Effects of reduced amount of RNA polymerase sigma factor on gene expression and growth of *Escherichia coli*: Studies of the *rpoD* 40 (amber) mutation. *Mol. Gen. Genet.* **184**:166-173.

283. **Ostrander, E. A., P. Benedetti y J. C. Wang.** 1990. Template supercoiling by a chimera of yeast GAL4 protein and phage T7 RNA polymerase. *Science* **249**:1261-1265.
284. **Paek, K. y G. C. Walker.** 1987. *E. coli dnaK* null mutants are inviable at high temperature. *J. Bacteriol.* **169**:283-290.
285. **Pao, C. C. y J. Gallant.** 1978. A gene involved in the metabolic control of ppGpp synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **158**:271-277.
286. **Parsell, D. A. y R. T. Sauer.** 1989. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev.* **3**:1226-1232.
287. **Pedersen, F. S., E. Lund y N. O. Kjølgaard.** 1973. Codon specific, tRNA-dependent *in vitro* synthesis of ppGpp and pppGpp. *Nature* **243**:13-15.
288. **Pelletier, A., T. M. Hill y P. L. Kuempel.** 1988. Location of sites that inhibit progression of replication forks in the terminus region of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **170**:4293-4298.
289. **Philips, G. J. y T. J. Silhavy.** 1990. Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*. *Nature* **344**:882-884.
290. **Phillips, T. A., R. A. VanBogelen y F. C. Neidhardt.** 1984. Lon gene product of *Escherichia coli* is a heat shock protein. *J. Bacteriol.* **159**:283-287.
291. **Plumbridge, J. A., J. G. Howe, M. Springer, D. Touati-Schwartz, J. W. B. Hersey y M. Grunberg-Manago.** 1982. Cloning and mapping of a gene for translational initiation factor IF2 in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:5033-5037.
292. **Polaczek, P.** 1990. Bending of the origin of replication of *Escherichia coli* by binding of IHF at a specific site. *New Biol.* **2**:265-271.
293. **Pritchard, R. H.** 1974. On the growth and from of a bacterial cell . (Review Lecture). Royal Society of London Biological Sciences **267**:303-333.
294. **Pritchard, R. H. y A. Zaristky.** 1970. Effect of thymine concentration on the replication velocity of DNA in a thymineless mutant of *E. coli*. *Nature* **226**:126-131.
295. **Pritchard, R. H., P. T. Barth y J. Collins.** 1969. Control of DNA synthesis in bacteria. XIX Microbial Growth, Symp. Soc. Gen. Microbiol. **19**:263-297.
296. **Raina, S. y C. Georgopoulos.** 1990. A new *Escherichia coli* heat shock gene, *htrC*, whose product is essential for viability only at high temperatures. *J. Bacteriol.* **172**:3417-3426.
297. **Raina, S. y C. Georgopoulos.** 1991. The *htrM* gene, whose product is essential for *Escherichia coli* viability only at elevated temperatures, is identical to the *rfaD* gene. *Nucleic Acids Res.* **19**:3811-3819.
298. **Rasmussen, K. V., T. Atlung, G. Kerszman, G. E. Hansen y F. G. Hansen.** 1983. Conditional change of DNA replication control in an RNA polymerase mutant of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **154**:443-451.
299. **Rokeach, L. A y J. W. Zyskind.** 1986. RNA terminating within *E. coli* origin of replication: Stringent regulation and control by DnaA protein. *Cell* **46**:763-771.
300. **Ruben, S. M., S. E. VanDenBrink-Webb, D. C. Rein y R. R. Meyer.** 1988. Suppression of the *ssb-1* mutation by an allele of *groEL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3767-3771.
301. **Rudd, K. E.** 1992. Alignment of *E. coli* DNA sequences to a revised, integrated genomic restriction map. *A Short Course in Bacterial Genetics*, J. H. Miller (ed). pp. 2.3-2.43.
302. **Russell, D. W. y R. V. Hirata.** 1989. The detection of extremely rare DNA modifications: methylation in *dam*- and *hsd*-*Escherichia coli* strains. *J. Biol. Chem.* **264**:10787-10794.
303. **Ryals, J.** 1982. Temperature dependence of RNA synthesis parameters in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **151**:879-887.
304. **Ryals, J., R. Little y H. Bremer.** 1982. Control of RNA synthesis in *E. coli* after a shift to higher temperature. *J. Bacteriol.* **151**:1425-1432.
305. **Ryals, J., R. Little y H. Bremer.** 1982. Control of rRNA and tRNA syntheses in *E. coli* by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* **151**:1261-1268.
306. **Sakakibara, Y.** 1988. The *dnaK* gene of *E. coli* functions in initiation of chromosome replication. *J. Bacteriol.* **170**:972-979.
- 306.a. **Sakakibara, Y. y S. Yuasa.** 1982. Continuous synthesis of the *dnaA* gene product of *E. coli* in the cell cycle. *Mol. Gen. Genet.* **186**:87-94.

307. **Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. C. Nolan (ed.), Cold Spring Harbor.
308. **Samitt, C. E., F. G. Hansen, J. F. Miller y M. Schaechter.** 1989. *In vivo* studies of DnaA binding to the origin of replication of *Escherichia coli*. EMBO J. **8**:989-993.
309. **Sancar, A., R. R. Wharton, S. Seltzer, B. M. Kacinski, N. D. Clarke y D. Rupp.** 1981. Identification of the *uvrA* gene product. J. Mol. Biol. **148**:45-62.
310. **Sarubbi, E., E. Rudd y M. Cashel.** 1988. Basal ppGpp level adjustment shown by new mutants affect steady state growth rates and *rrnA* ribosomal promoter regulation in *E. coli*. Mol. Gen. Genet. **213**:214-222.
311. **Schaefer, C. y W. Messer.** 1991. DnaA protein/DNA interaction. Modulation of the recognition sequence. Mol. Gen. Genet. **226**:34-40.
312. **Schauzu, M.-A., C. Kücherer, R. Kölling, W. Messer y H. Lothar.** 1987. Transcripts within the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **15**: 2479-2496.
313. **Schlesinger, M. J.** 1990. Heat shock proteins. J. Biol. Chem. **265**:12111-12114.
314. **Schmid, M. B.** 1990. More than just "histone-like" proteins. Cell **63**:451-453.
315. **Schoemaker, J. M., R. C. Gayda y A. Markovitz.** 1984. Regulation of cell division in *E. coli*: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to lon-associated filamentation and death. J. Bacteriol. **158**:551-561.
316. **Schröder, H., T. Langer, F.-U. Hartl y B. Bukau.** 1993. DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. EMBO J. **12**:4137-4144.
317. **Sekimizu, K., y A. Kornberg.** 1988. Cardiolipin activation of DnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **263**:7131-7135.
318. **Sekimizu, K., D. Bramhill y A. Kornberg.** 1988. ATP activates DnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. Cell **50**:259-265.
319. **Sharma, B. y T. M. Hill.** 1992. TerF, the 6th identified replication arrest site in *Escherichia coli*, is located within the *rcsC* gene. J. Bacteriol. **174**:7854-7858.
320. **Sherman, M. y A. L. Goldberg.** 1991. Formation *in vitro* of complexes between an abnormal fusion protein and the heat shock proteins from *Escherichia coli* and yeast mitochondria. J. Bacteriol. **173**:7249-7256.
321. **Sherman, M. Y. y A. L. Goldberg.** 1992. Involvement of the chaperonin *dnaK* in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. EMBO J. **11**:71-77.
322. **Shineberg, B. y D. Zipser.** 1973. The *lon* gene and degradation of β -galactosidase nonsense fragments. J. Bacteriol. **116**:1469-1471.
323. **Skarstad, K. y E. Boye.** 1988. Perturbed chromosomal replication in *recA* mutants of *E. coli*. J. Bacteriol. **170**:2549-2554.
324. **Skarstad, K., E. Boye y H. B. Steen.** 1986. Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. EMBO J. **5**:1711-1717.
325. **Skarstad, K., T. A. Baker y A. Kornberg.** 1990. Strand separation required for initiation of replication at the chromosomal origin of *E. coli* is facilitated by a distant RNA—DNA hybrid. EMBO J. **9**:2341-2348.
326. **Skowyra, D., C. Georgopoulos y M. Zylicz.** 1990. The *E. coli dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. Cell **62**:939-944.
327. **Smith, G. R.** 1988. Homologous recombination in procaryotes. Microbiol. Rev. **52**:1-28.
328. **Sozhamannan, S. y D. K. Chattoraj.** 1993. Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. J. Bacteriol. **175**:3546-3555.
329. **Spence, J., A. Cegielska y C. Georgopoulos.** 1990. Role of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK and HtpG (C62.5) in response to nutritional deprivation. J. Bacteriol. **172**:7157-7166.
330. **Stanier, R. Y., E. A. Adelberg y J. L. Ingraham.** 1984. Microbiología. Ed. Reverté, Barcelona.

331. **Stent, G. S. y S. Brenner.** 1961. A genetic locus for the regulation of the regulation of ribonucleic acid synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **47**:2005-2014.
332. **Stougaard, P. y S. Molin.** 1981. Vertical dye-buoyant density gradients for rapid analysis and preparation of plasmid DNA. Biochemistry **118**:191-193.
333. **Straus, D.B., W.A. Walter y C.A. Gross.** 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . Nature **329**:348-351.
334. **Straus, D. B., W. A. Walter y C. A. Gross.** 1988. *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. Genes Dev. **2**:1851-1858.
335. **Straus, D. B., W. A. Walter y C. A. Gross.** 1990. DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . Genes Dev. **4**:2202-2209.
336. **Strauss, D. B., W. A. Walter y C. A. Gross.** 1989. The activity of σ^{32} is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. Genes Dev. **3**:2003-2010.
337. **Stuitje, A. R., N. de Wind, J. C. Van Der Spek, T. H. Pors y M. Meijer.** 1986. Dissection of promoter sequences involved in transcriptional activation of the *Escherichia coli* replication origin. Nucleic Acids Res. **14**: 2333-2344.
338. **Sueoka, N. y H. Yoshikawa.** 1965. The chromosome of *Bacillus subtilis*. I. Theory of marker frequency analysis. Genetics **52**:747-757.
339. **Sugimoto, K., A. Oka, H. Sugisaki, M. Takanami, A. Nishimura, S. Yasuda y Y. Hirota.** 1979. Nucleotide sequence of the replication origin of *Escherichia coli* K12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:575-579.
340. **Taglicht, D., E. Padan y A. B. Oppenheim.** 1987. An alkaline shift induces the heat shock response in *E. coli*. J. Bacteriol. **169**:885-887.
341. **Tanaka, M., H. Ohmori y S. Hiraga.** 1983. A novel type of *E. coli* mutants with increased chromosomal copy number. Mol. Gen. Genet. **192**:51-60.
342. **Taura, T., N. Kusukawa, T. Yura y K. Ito.** 1989. Transient shut off of *Escherichia coli* heat shock protein synthesis upon temperature shift down. Biochim. Biophys. Rec. Comm. **163**:438-443.
343. **Taylor, W. E., D. B. Strauss, A. D. Grossman, Z. F. Burton y C. A. Gross.** 1984. Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase. Cell **38**:371-381.
344. **Theisen, P. W., J. E. Grimwade, A. C. Leonard, J. A. Bogan y C. E. Helmstetter.** 1993. Correlation of gene transcription with the time of initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **10**:575-584.
345. **Thliveris, A. T., D. G. Ennis, L. K. Lewis y D. W. Mount.** 1990. SOS functions. The Bacterial Chromosome. K. Drlica y M. Riley (eds.), ASM, Washington, DC. pp. 381-387.
346. **Thöny, B., D. S. Hwang, L. Fradkin y A. Kornberg.** 1991. *iciA*, an *Escherichia coli* gene encoding a specific inhibitor of chromosomal initiation of replication *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:4066-4070.
347. **Tilly, K., J. Erickson, S. Sharma y C. Georgopoulos.** 1986. Heat shock regulatory gene *rpoH* mRNA level increases after heat shock in *E. coli*. J. Bacteriol. **168**:1155-1158.
348. **Tilly, K., J. Spence y C. Georgopoulos.** 1989. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor sigma-32. J. Bacteriol. **171**:1585-1589.
349. **Tilly, K., N. Mckittrick, M. Zylicz y C. Georgopoulos.** 1983. The *dnaK* protein modulates the heat-shock response of *E. coli*. Cell **34**:641-645.
- 349.a. **Tilly, K., H. Murialdo y C. Georgopoulos.** 1981. Identification of a second *E. coli groE* gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:1629-1633.
350. **Tobe, T., N. Kusukawa y T. Yura.** 1987. Suppression of *rpoH* (*htpR*) mutations of *E. coli*: Heat-shock response in *suhA* revertants. J. Bacteriol. **169**:4128-4134.
351. **Torres-Cabassa, A. S. y S. Gottesman** 1987. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. J. Bacteriol. **169**:981-989.

352. **Torrey, T. A., T. Atlung y T. Kogoma.** 1984. *dnaA* suppressor (*dasF*) mutants of *E. coli* are stable DNA replication (*sdrA/rnh*) mutants. *Mol. Gen. Genet.* **196**:350-355.
353. **Torrey, T. A. y T. Kogoma.** 1982. Suppressor mutations (*rin*) that specifically suppress the *recA+* dependence of stable DNA replication in *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **187**:225-230.
354. **Torrey, T. A. y T. Kogoma.** 1987. Genetic analysis of constitutive stable DNA replication in *rnh* mutants of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **208**:420-427.
355. **Travers, A.** 1976. RNA polymerase specificity and the control of growth. *Nature* **263**:641-646.
356. **Travers, A.** 1976. Modulation of RNA polymerase specificity by ppGpp. *Mol. Gen. Genet.* **147**:225-232.
357. **Travers, A.** 1980. Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **141**:973-976.
358. **Trun, N. J. y S. Gottesman.** 1990. On the bacterial cell cycle: *Escherichia coli* mutants with altered ploidy. *Genes Dev.* **4**:2036-2047.
359. **Tsao, Y-P., H.-Y. Wu y L. F. Liu.** 1989. Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell* **56**:111-118.
- 359.a. **Tsutsui, H. y K. Matsubara.** 1981. Replication control and switchoff function as observed with a mini-F factor plasmid. *J. Bacteriol.* **147**:509-516.
360. **Van Der Ende, A., T. A. Baker, T. Ogawa y A. Kornberg.** 1985. Initiation of enzymatic replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome: Primase as the sole priming enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3954-3958.
361. **VanBogelen, R. A. y F. C. Neidhardt.** 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5589-5593.
362. **VanBogelen, R. A., M. A. Acton y F. C. Neidhardt.** 1987. Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **1**:525-531. 386
363. **VanBogelen, R. A., Ph. M. Kelley y F. C. Neidhardt.** 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **169**:26-32.
364. **VanBogelen, R. A., V. Vaughn y F. C. Neidhardt.** 1983. Gene for heat-inducible lysyl-tRNA synthetase (*lysU*) maps near *cadA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**:1066-1068.
365. **Varshavsky, A.** 1983. Diadenosine 5', 5'''-P1, P4-tetraphosphate: A pleiotropically acting alarmone?. *Cell* **34**:711-712.
366. **Viret, J. F., A. Bravo y J. C. Alonso.** 1991. Recombination-dependent concatemeric plasmid replication. *Microbiol. Rev.* **55**:675-683.
367. **von Meyenburg, K., B. B. Jørgensen, J. Nielsen y F. G. Hansen.** 1982. Promoters of the *atp* operon coding for the membrana-bound ATP synthase of *Escherichia coli* mapped by Tn10 insertion mutations. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 240-248.
368. **von Meyenburg, K., E. Boye, K. Skarstad, L. Koppes y T. Kogoma.** 1987. Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**:2650-2658.
369. **von Meyenburg, K. y F. G. Hansen.** 1980. The origin of replication, *oriC*, of the *E. coli* chromosome: genes near *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* **19**: 137-159.
370. **Wada, C., Y. Akiyama, K. Ito y T. Yura.** 1986. Inhibition of F plasmid replication in *htpR* mutants of *E. coli* deficient in sigma 32 protein. *Mol. Gen. Genet.* **203**:208-213.
371. **Wada, M., H. Fujita y H. Itikawa.** 1987. Genetic suppression of a temperature-sensitive *groES* mutation by an altered subunit of RNA polymerase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**:1102-1106.
372. **Wada, M. y H. Itikawa.** 1984. Participation of *Escherichia coli* K-12 *groE* gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA. *J. Bacteriol.* **157**:694-696.
373. **Wada, M., Y. Kadokami y H. Itikawa.** 1982. Thermosensitive synthesis of DNA and RNA in *dnaJ* mutants of *Escherichia coli* K-12. *Jpn. J. Genet.* **57**:407-413.

374. **Walker, G. C.** 1987. The SOS response of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C. pp. 1346-1357.
375. **Walkup, L. K. B. y T. Kogoma.** 1989. *Escherichia coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J. Bacteriol.* **171**:1476-1484.
376. **Wang, J. C.** 1985. DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 665-697.
377. **Wang, Q. y J. M. Kaguni.** 1987. Transcriptional repression of the *dnaA* gene of *E. coli* by *dnaA* protein. *Mol. Gen. Genet.* **209**:518-525.
378. **Wang, Q. y J. M. Kaguni.** 1989. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4248-4253.
379. **Wang, Q. y J. M. Kaguni.** 1989. *dnaA* protein regulates transcription of the *rpoH* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:7338-7344.
380. **Wechsler, J. A. y J. D. Gross.** 1971. *E. coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Mol. Gen. Genet.* **113**:273-284.
381. **Weinberger, M. y C. E. Helmstetter.** 1989. Inhibition of protein synthesis transiently stimulates initiation of minichromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:3591-3596.
382. **Weiss, A. S y R. G. Wake.** 1984. Impediment to replication fork movement in the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Mol. Biol.* **179**:745-750.
383. **Welch, T. J., A. Farewell, F. C. Neidhardt y D. H. Bartlett.** 1993. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* **175**:7170-7177.
384. **Wickner, W., A. J. M. Driessen y F.-U. Hartl.** 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Ann. Rev. Biochem.* **60**:101-124.
385. **Wild, J., W. A. Walter, C. A. Gross y E. Altman.** 1993. Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* **175**:3992-3997.
386. **Witkin, E. M.** 1991. RecA protein in the SOS response: milestones and mysteries. *Biochimie* **73**:133-141.
387. **Witkin, E. y T. Kogoma.** 1984. Involvement of the activated form of RecA protein in SOS mutagenesis and stable DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7539-7543.
388. **Woelker, B. y W. Messer.** 1993. The structure of the initiation complex at the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**:5025-5033.
389. **Wu, C. A., E. L. Zechner, A. J. Jr. Hughes, M. A. Franden, C. S. McHenry y K. J. Marians.** 1992. Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. IV. Reconstitution of an asymmetric, dimeric DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **267**:4064-4073.
390. **Wu, C. A., E. L. Zechner, J. A. Reems, C. S. McHenry y K. J. Marians.** 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.
391. **Wu, H.-Y., S. Shyy, J. C. Wang y L. F. Liu.** 1988. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**:433-440.
392. **Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser y M. Cashel.** 1991. Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**:5980-5990.
393. **Yamamori, T., T. Osawa, T. Tobe, K. Ito y T. Yura.** 1982. *Escherichia coli* gene (*hin*) controls transcription of heat-shock operons and cell growth at high temperatures. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 131-137.
394. **Yamamori, T. y T. Yura.** 1982. Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *E. coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:860-864.
395. **Yamamori, Y.** 1978. Transient regulation of protein synthesis in *E. coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.* **134**:1133-1140.

396. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
397. **Yano, R., M. Imai y T. Yura.** 1987. The use of operon fusions in studies of the heat-shock response: Effects of altered sigma 32 on heat-shock promoter function in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **207**:24-28.
398. **Yat-Ming, B. y A. Kornberg.** 1988. Membrane attachment activates DnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7202-7205.
399. **Young, R. A. y T. J. Elliott.** 1989. Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* **59**:5-8.
400. **Yung, B. Y. y A. Kornberg.** 1989. The DnaA initiator protein binds separate domains in the replication origin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:13988-13995.
- 400.a. **Yura T., T. Tobe, K. Ito y T. Osawa.** 1984. Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *E. coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6803-6807.
401. **Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori y T. Yura.** 1993. Heat induction of σ^{32} synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**:5449-5455.
402. **Zhou, Y. N., N. Kusakawa, J. W. Erickson, C. A. Gross y T. Yura.** 1988. Isolation and characterization of *E. coli* mutants that lack the heat shock sigma factor 32. *J. Bacteriol.* **170**:3640-3649.
403. **Zhou, Y. N., W. A. Walter y C. A. Gross.** 1992. A mutant σ^{32} with a small deletion in conserved region 3 of σ has reduced affinity for core RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **174**:5005-5012.
404. **Zyskind, J. W., A. L. Stivil, W. B. Stine, M. C. Biery y D. W. Smith.** 1992. RecA protein of *Escherichia coli* and chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* **6**:2525-2537.
405. **Zyskind, J. W. y D. W. Smith.** 1986. The bacterial origin of replication, *oriC*. *Cell* **46**:489-490.
406. **Zyskind, J. W. y J. M. Cleary.** 1983. Chromosomal replication origin from the marine bacterium *Vibrio parvulus* function in *E. coli*: *oriC* consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1164-1168.

