



Departamento de Bioquímica,  
Biología Molecular y Genética  
Facultad de Ciencias

“Implicaciones de la NDP reductasa  
en la progresión de las horquillas de  
replicación en *Escherichia coli*”

*Memoria presentada por la Licenciada  
Estrella Guarino Almeida  
para optar al grado de  
Doctor en Biología  
Badajoz, 2006*

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

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

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

## **CERTIFICAN**

Que el presente trabajo de investigación, titulado “Implicaciones de la NDP reductasa en la progresión de las horquillas de replicación en *Escherichia coli*”, ha sido realizado por la Lcda. D<sup>a</sup>. Estrella Guarino Almeida, bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Badajoz a 21 de abril de 2006.

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

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



*“Cualesquiera que hayan sido nuestros logros,  
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos”*

*A Elena y a Encarna.*



*No hay nada más equitativamente  
repartido en el mundo que la razón;  
todos creen tener suficiente.*

R. Descartes.



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1. Ciclo celular bacteriano	11
2. La replicación de <i>Escherichia coli</i>	13
2.1. Iniciación	13
2.2. Elongación	17
2.3. Terminación	22
3. Progresión de las horquillas de replicación	25
3.1. Paradas y reanudaciones de las horquillas de replicación	26
3.1.1. Reanudación a partir de un DSB	27
3.1.2. Reanudación a partir de <i>RFR</i>	29
3.2. Ensamblaje del replisoma por PriA	33
4. NDP reductasa	35
4.1. Estructura y clases	35
4.2. Acción catalítica y control de la actividad	37
4.3. Estudio de la NDP reductasa	38
5. Hiperestructuras celulares	40
5.1. Complejo de síntesis de nucleótidos ( <i>dNTP sintetasa</i> )	42
5.2. Hiperestructura de replicación	44
<b>MATERIALES</b>	<b>47</b>
1. Estirpes bacterianas	49
2. Fagos	51
3. Plásmidos	51

## Índice

---

4.	Productos químicos	51
4.1.	Antibióticos	52
4.2.	Productos radiactivos	52
4.3.	Soluciones y tampones	52
4.3.1.	Purificación y aislamiento de DNA plasmídico	52
4.3.2.	Medida de la síntesis de DNA <i>in vivo</i>	53
4.3.3.	Manipulación <i>in vivo</i> de bacterias y fagos	53
4.3.4.	Electroforesis de DNA	53
4.3.5.	Electroforesis en campo pulsante	54
4.3.6.	Citometría de flujo	54
5.	Medios de crecimiento	55
5.1.	Medios de crecimiento para bacterias	55
5.2.	Medios de crecimiento para el fago PI	55
6.	Enzimas	56

## MÉTODOS 57

1.	Crecimiento de estirpes	59
1.1.	Crecimiento de la estirpe JS89 I	59
2.	Conservación de las estirpes bacterianas	60
3.	Medida de la cantidad de DNA sintetizado	61
3.1.	Marcaje del DNA <i>in vivo</i>	61
3.2.	Medida de la síntesis de DNA	61
3.2.1.	Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial	62
3.2.2.	Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los orígenes de replicación	62

## Índice

---

4.	Aislamiento de DNA plasmídico	63
5.	Purificación y concentración de DNA	64
5.1.	Purificación de DNA mediante extracciones con fenol/cloroformo	64
5.2.	Concentración de DNA mediante precipitación	64
6.	Electroforesis de DNA	65
7.	Medida de la concentración de DNA mediante densimetría de geles	66
8.	Electroforesis en campo pulsante	66
8.1.	Preparación de bloques de DNA	67
8.2.	Electroforesis y procesamiento del gel	67
9.	Electroporación	68
10.	Transducción	70
10.1.	Multiplicación de fagos	70
10.2.	Transducción	71
10.3.	Comprobación de los transductantes	71
10.3.1.	Comprobación de los requerimientos de aminoácidos y de la resistencia a antibióticos	71
10.3.2.	Comprobación de la correcta incorporación de timidina radiactiva	72
10.3.3.	Comprobación de la sensibilidad a la irradiación con ultravioleta	72
11.	Conjugación	73
12.	Análisis de viabilidad por medida de unidades formadoras de colonias	74
13.	Citometría de flujo	74
13.1.	Fundamento de la citometría de flujo	74

## Índice

---

13.2. Tratamiento y análisis de las muestras	75
13.2.1. Fijado de las muestras	75
13.2.2. Tinción	76
13.2.3. Análisis de las muestras	77
<b>RESULTADOS</b>	<b>79</b>
• Aproximación experimental	81
<i>Capítulo 1: Análisis de la progresión de las horquillas de replicación en un mutante <i>nrdA101</i> creciendo exponencialmente a 30°C</i>	
1.1. Una estirpe <i>nrdA101</i> creciendo a 30°C aumenta los DSBs	85
1.2. Los DSBs en una estirpe <i>nrdA101</i> son dependientes de la actividad endonucleasa del complejo RuvABC	86
1.3. El aumento de DSBs en la estirpe <i>nrdA101</i> no está relacionado con un menor suministro de nucleótidos	87
<i>Capítulo 2: Análisis del RFR (reversiones de las horquillas de replicación) en un mutante <i>nrdA101</i> a 30°C</i>	
2.1. La reversión de las horquillas de replicación en un mutante <i>nrdA101</i> es dependiente de RecG e independiente de RecA	93
2.2. La inactivación de RuvABC suprime la letalidad de la estirpe <i>nrdA101 recB</i> sólo si RecG está presente	94
2.3. Los DSBs en un mutante <i>nrdA101</i> en ausencia de RecG se deben a cortes directos en la horquilla de replicación parada	97

### **Capítulo 3: Análisis de progresión de las horquillas de replicación en un mutante termosensible *nrdA101* incubado a 42°C**

- Resultados preliminares 101
- 3.1. La NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* permanece activa *in vivo* al menos 50 minutos tras la incubación a 42°C 101
- 3.2. La síntesis de DNA a 42°C en el mutante *nrdA101* no depende de enzimas de recombinación ni de la proteína PriA 103
- 3.3. La síntesis de DNA a 42°C en el mutante *nrdA101* está relacionada con la procesividad de la replicación 104
  - 3.3.1. La replicación de JS1018 a 37°C 105
    - 3.3.1.1. Parámetros de ciclo celular de JS1018 creciendo a 37°C 105
    - 3.3.1.2. Análisis de la procesividad de las horquillas de replicación a 37°C 108
  - 3.3.2. La disminución de la procesividad de la replicación disminuye la acumulación de DNA después del cambio a 42°C 110
  - 3.3.3. El aumento de la procesividad de la replicación incrementa la acumulación de DNA después del cambio a 42° 111

### **Capítulo 4: Análisis de las horquillas de replicación paradas por inactivación de la NDP reductasa**

- 4.1. Generación de *RFR* en una horquilla parada por inactivación de la NDP reductasa 115
  - 4.1.1. Las horquillas de replicación paradas por la inactivación de la NDP reductasa inducen *RFR* 115
  - 4.1.2. Las horquillas de replicación paradas al incubar un mutante *nrdA101* a 42°C inducen menos DSBs que al inhibir la NDP reductasa con Hu 117

## Índice

---

4.2. Las horquillas de replicación paradas bajo distintas condiciones restrictivas para la NDP reductasa en el mutante <i>nrdA101</i> no tienen la misma capacidad de reanudar la replicación	118
4.2.1. Una estirpe <i>nrdA</i> <sup>+</sup> no requiere específicamente ninguna enzima de recombinación para reanudar la replicación	119
4.2.2. Una estirpe <i>nrdA101</i> requiere RecA y RecB para reanudar la replicación	119
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
• La NDP reductasa codificada por el alelo <i>nrdA101</i> compromete la progresión de la horquilla de replicación a 30°C	126
• La actividad de la NDP reductasa codificada por el alelo <i>nrdA101</i> a 42°C está relacionada con la procesividad del replisoma	129
• La inactivación térmica de la NDP reductasa codificada por el alelo <i>nrdA101</i> entorpece la reversión de la horquilla de replicación	132
• La NDP reductasa como componente de la hiperestructura de replicación	135
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>143</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>169</b>

# *Introducción*



## 1. CICLO CELULAR BACTERIANO

El crecimiento de cualquier sistema biológico se suele definir como el incremento ordenado de todos los elementos componentes de ese sistema, lo que implica un aumento de la masa celular que eventualmente conduce a la multiplicación celular. En organismos pluricelulares dicha multiplicación se traduce en un aumento del tamaño del individuo, mientras que en unicelulares que se dividen por fisión o por gemación, lo que ocurre es un aumento de la población.

En bacterias, seres vivos unicelulares que carecen de desarrollo, el ciclo de vida coincide con el ciclo celular y éste puede definirse como el conjunto de procesos que permiten que una célula recién nacida duplique todos sus componentes para que de lugar, tras su división, a dos células hijas idénticas.

Existe gran analogía, además de un discutido grado de homología, entre el ciclo celular bacteriano y el de los organismos eucariontes; así, los dos poseen una fase de crecimiento celular y otra en la que se duplica el genoma o replicación, que es seguida de la separación de los cromosomas replicados para que finalmente se lleve a cabo la división celular (Donachie, 1992, 1993).

Las distintas fases del ciclo celular bacteriano se denominan *B*, *C* y *D*: *B* es el tiempo que transcurre desde que la célula nace hasta que se inicia la replicación (*G1* en eucariontes); *C* es el tiempo dedicado a la replicación del cromosoma (fase *S* en eucariontes) y *D* es el tiempo transcurrido desde el final de la replicación hasta la división celular (*G2* en eucariontes). Hay que señalar que el período *B* puede llegar a desaparecer o, cambiando las condiciones, puede alargarse extraordinariamente. De la misma forma, el período *G1* eucariótico es el más variable, hasta hacerse casi infinito en células que no se dividen. Por último, la mitosis eucariótica tendría su análogo en la segregación cromosómica de procariontes.

La diferencia más notoria entre el ciclo celular bacteriano y el de organismos eucariontes reside en que en bacterias, el tiempo requerido para la compleción de la replicación del cromosoma o periodo *C*, puede ser mayor que el tiempo del ciclo celular o tiempo de generación ( $\tau$ ), produciéndose así un solapamiento de ciclos de replicación (el valor *n* determina el número de ciclos de replicación solapados). Sin embargo, en eucariontes la replicación o fase *S* es siempre inferior a la duración total del ciclo.

## Introducción

---

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

Cuando una población bacteriana crece en medio no limitante, su crecimiento es continuo y exponencial. A lo largo del crecimiento exponencial los valores medios de las cantidades de DNA, RNA o proteínas por célula no cambian. A esto se denomina *crecimiento equilibrado*. Durante su ciclo celular cada célula duplica su masa antes de entrar en división, lo que significa que duplica el contenido de DNA, RNA, proteínas, membranas, etc. Pero a lo largo del ciclo no todos los componentes celulares crecen de la misma manera. Los componentes citoplasmáticos (RNA, proteínas, ribosomas, membranas, etc.) incrementan su número de forma exponencial desde el nacimiento a la división. La síntesis de DNA, por el contrario, no es exponencial sino que ocurre de forma lineal y a velocidad constante (Cooper y Helmstetter, 1968; Helmstetter, 1996; Holly, 1987). Cuando el tiempo requerido para completar la replicación y división supera al transcurrido desde el nacimiento hasta la división de la célula, es decir,  $C + D > \tau$ , las replicaciones que finalizan en un ciclo pueden haber comenzado en el anterior o en dos precedentes. En estas condiciones se da un solapamiento de ciclos de replicación comenzando una ronda de replicación antes de que finalice la que estaba en curso. Por otro lado, si cuando el cultivo está creciendo lentamente ( $C + D < \tau$ ) comenzase una replicación antes de haberse completado el ciclo celular, la cantidad de DNA por célula aumentaría después de cada división hasta que el cultivo dejara de ser viable (Cooper y Helmstetter, 1968; Donachie, 1992, 1993). De este modo, independientemente de la velocidad de replicación, el tiempo transcurrido entre dos inicios consecutivos o tiempo de interiniciación ( $I$ ), ha de ser igual al tiempo de generación  $\tau$ . Se determina así que, durante el crecimiento celular equilibrado, la frecuencia de inicio de la replicación ( $\phi$ ) sea:

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

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

$$n = C / \tau$$

## 2. LA REPLICACIÓN DE *Escherichia coli*

*Escherichia coli* posee un único cromosoma circular de 4.639 kbp (kilopares de bases) que replica una vez cada ciclo celular. El tiempo requerido para la elongación de la replicación del cromosoma, el periodo  $C$ , es de menos de 50 minutos en estirpes creciendo con un tiempo de generación menor a 100 minutos a 37°C, aunque puede variar si la bacteria tiene mutaciones que afecten al proceso de replicación (Helmstetter, 1996). Como este periodo de tiempo no está relacionado con la duración del ciclo celular, el periodo  $\tau$ , las células bacterianas regulan la necesidad de tener dos cromosomas completos antes de la división por dos procedimientos: iniciando la replicación una vez cada ciclo celular, por lo tanto, una vez cada  $\tau$  minutos, y dividiéndose  $C + D$  minutos después de que la iniciación de la replicación ha tenido lugar o  $D$  minutos después de que la replicación ha finalizado (Cooper y Helmstetter, 1968). Esto quiere decir que la replicación bacteriana es un proceso muy regulado.

Todos los elementos requeridos para completar el proceso de replicación tienen que estar disponibles en el inicio; una vez que la replicación se inicia, no se requiere ni síntesis de RNA ni de proteínas y el cromosoma es replicado en su totalidad en ausencia de síntesis de cualquiera de estas dos macromoléculas. Esto significa que todas las proteínas requeridas para el proceso completo tienen que estar presentes en el paso del inicio. Se estima que se requieren al menos 23 proteínas para el inicio y más de 25 para la elongación, cada una con diferente número de copias (Baker y Wickner, 1992; Marians, 1992). Si además de este estricto mecanismo de replicación incluimos los requerimientos para la síntesis de precursores, entonces hay que añadir de diez a quince proteínas más. Por lo tanto, todas estas proteínas tienen que funcionar de forma coordinada y corregulada. La maquinaria de replicación además participa en la corregulación de otros procesos celulares, tales como la estructura del DNA, la fluidez de la membrana y la segregación cromosómica (J. Riola, tesis doctoral, 2005)). Todo esto explica la complejidad del proceso de la replicación cromosómica, que actualmente sigue siendo objeto de investigación. Las diferencias estructurales y funcionales que se han encontrado en el proceso de la replicación han provocado que para facilitar su estudio se divida en tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

### 2.1. INICIACIÓN

La mayoría de los conocimientos que se tienen acerca del inicio de la replicación bacteriana están basados en *E. coli* y especialmente en el trabajo de muchos

## Introducción

años del laboratorio de Kornberg, que utilizó sistemas de replicación *in vitro* dependientes de *oriC* y de DnaA (Kornberg y Baker, 1992; Messer, 2002).

La replicación del cromosoma de *E. coli* se inicia en una secuencia de 260 pares de bases (Asai *et al.*, 1990; Messer y Weigel, 1996) localizada en el minuto 84,57 del mapa genético llamada *oriC* (Berlyn, 1998) (Fig. 1). El origen de replicación de *E. coli* contiene ocho sitios de nueve nucleótidos cada uno a los que se une la proteína DnaA; cinco a los que se une tanto de forma activa como de forma inactiva con igual afinidad (cajas R) (Schaper y Messer, 1995) y tres que unen DnaA preferentemente en su forma activa (McGarry *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2002) (cajas I). En el extremo izquierdo hay una región rica en AT compuesta de tres trecémeros repetidos y un grupo AT. También existen sitios de unión para otras proteínas como IHF y Fis, trece secuencias GATC que son metiladas por la metiltransferasa Dam y otros factores de control, de función aún desconocida, como IcaA, Rob y HNS. Además, esta secuencia presenta regiones muy conservadas en los orígenes de distintas enterobacterias separadas por otros segmentos variables pero de longitud constante (Messer y Weigel, 1996; Messer, 2002).

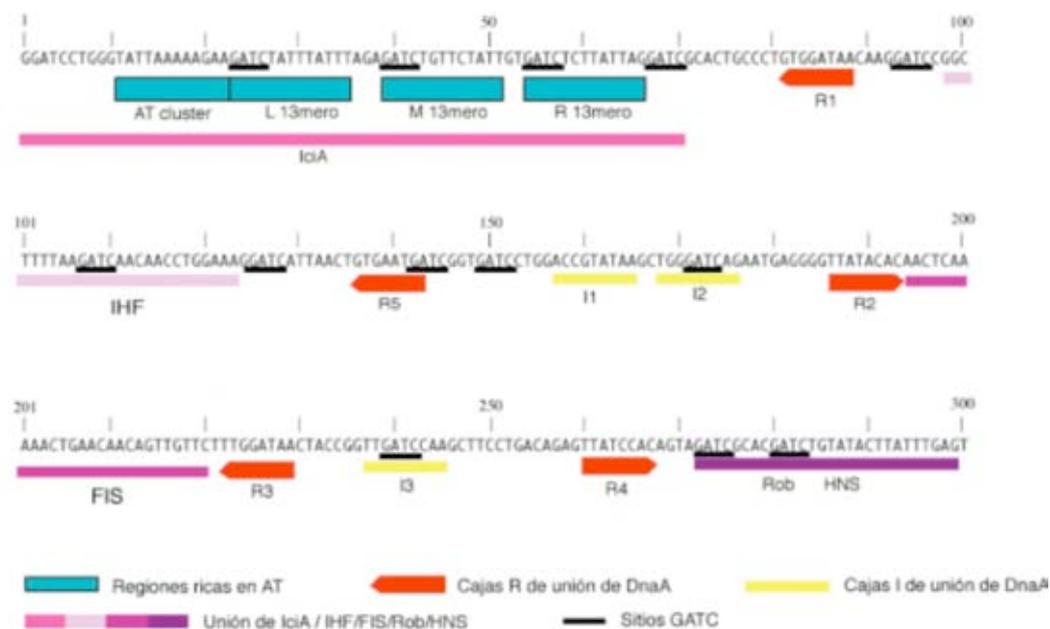


Fig. 1. Esquema de *oriC*. En él se muestran las regiones más características de esta secuencia

La replicación en *oriC* comienza con la unión altamente cooperativa de 18 monómeros de la proteína DnaA a las secuencias de unión de *oriC* (*cajas de DnaA*) para formar un denominado *complejo inicial cerrado* (Messer *et al.*, 2001). Mientras que todas las formas de DnaA se pueden unir a *oriC*, solamente la forma unida a ATP es competente para continuar hacia los siguientes pasos (Sekimizu *et al.*, 1987). Este *complejo cerrado* se puede convertir en un *complejo abierto* por la unión de ATP y por la unión coordinada de las proteínas HU, IHF y Fis a sus sitios de unión específica en *oriC*. La unión de estas proteínas determina un plegamiento del origen que hace que DnaA interactúe con las secuencias ricas en AT de *oriC* desnaturalizándolas y promoviendo una apertura secuencial de la molécula de DNA (Bramhill y Kornberg, 1988; Leonard y Grimwade, 2005) que es estabilizada por la proteína SSB que se une a DNA de cadena sencilla (Krause y Messer, 1999). Para la formación de este *complejo abierto* es importante la estructura terciaria del DNA ya que se requiere una superhélice negativa que es conseguida por la acción de las topoisomerasas I y II (DNA girasa) y por la RNA polimerasa, que provocan un cambio en la topología del DNA. Una vez abierto el DNA, se produce la entrada de la helicasa DnaB. Para que esto ocurra es necesario que DnaA esté unida al origen. Dos complejos formados por una proteína DnaB y seis DnaC permiten la incorporación de dos helicetas al origen, en la que se requiere una interacción física entre DnaA y DnaB (Carr y Kaguni, 2001; Fang *et al.*, 1999). Esta unión determina la formación de un *complejo precebador* (Egelman *et al.*, 1995; Funnell *et al.*, 1987; Learn *et al.*, 1997; Ludlam *et al.*, 2001). En este estadio, las proteínas DnaA y DnaC ya no son requeridas y DnaC abandona el origen inmediatamente después o durante la carga de DnaB con hidrólisis de ATP. Esto activa la función helicasa de DnaB (Wahle *et al.*, 1989) (Fig. 2).

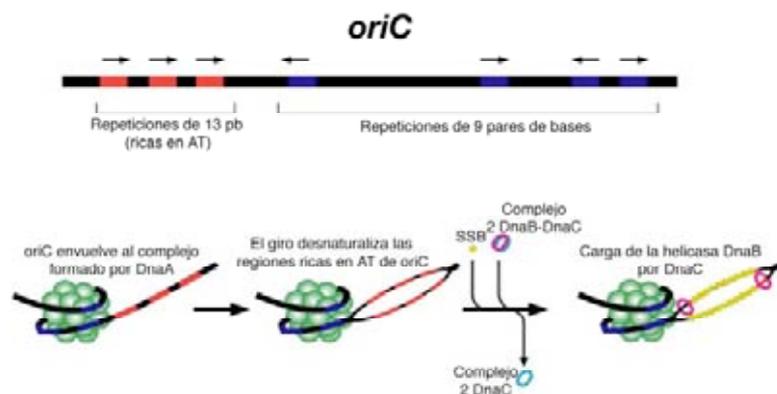
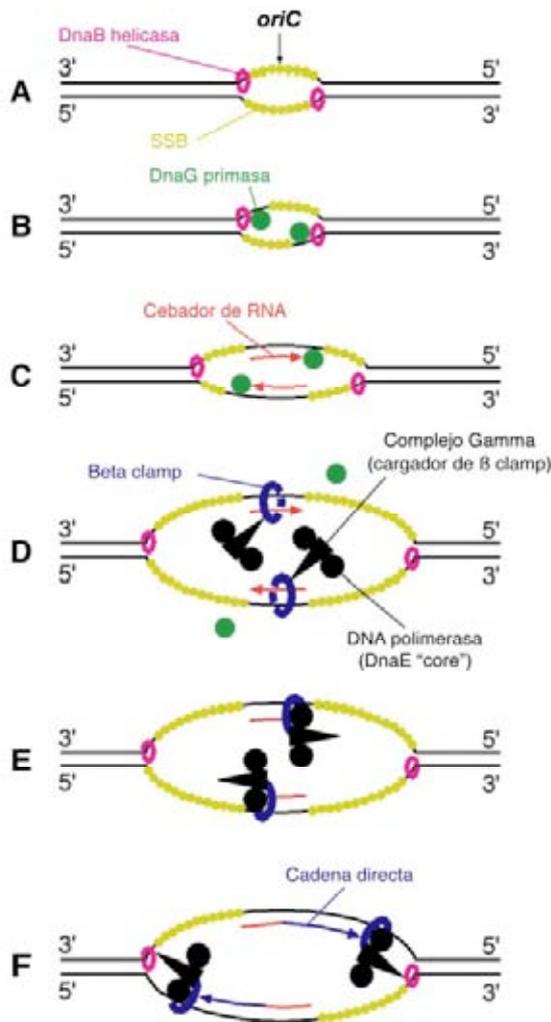


Fig. 2. Apertura de *oriC* e inicio de la replicación.

## Introducción



**Fig. 3.** Montaje del replisoma tras iniciarse la replicación en *oriC*. Una vez abierto *oriC* se produce la entrada de la helicasa con ayuda de DnaC (A). A continuación, la DnaG primasa sintetiza dos cebadores de RNA (B y C) a partir de los cuales la Pol III iniciará la replicación (D). Se montan así dos replisomas que replicarán el cromosoma bidireccionalmente desde *oriC* hasta el término (E y F).

Finalmente, el *complejo precebador* da lugar al *complejo cebador* con la entrada de la DnaG primasa que sintetizará dos cebadores para las dos cadenas directas (Fang *et al.*, 1999). Esta proteína juega un papel importante en la determinación del uso de *oriC* como el lugar de inicio de la replicación y en el inicio de dos puntos de replicación para determinar una replicación bidireccional. La entrada de la DNA polimerasa III y del resto de proteínas necesarias para la replicación determina el final de la iniciación y el comienzo de la elongación (Kelman y O'Donnell, 1995) (Fig. 3).

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

Por ejemplo, la entrada de la polimerasa al final de la iniciación activa la actividad ATPasa intrínseca de DnaA (Katayama *et al.*, 1998; Katayama y Sekimizu, 1999) en cooperación con la proteína Hda que posee homología de secuencia con DnaA (Kato y Katayama, 2001). La inactivación de DnaA por la hidrólisis del ATP que lleva unido es uno de los mecanismos que previene nuevos inicios, ya que mutaciones en DnaA que afectan a la unión o a la hidrólisis de ATP pueden hacer que la proteína sea constitutivamente activa, permitiendo reinicios e incluso provocando letalidad (Katayama y Kornberg, 1994; Katayama y Sekimizu, 1999; Mizushima *et al.*, 1997).

Otro mecanismo que controla que la replicación sólo se inicie una vez por ciclo es el secuestro de los orígenes de replicación por la proteína SeqA (Lu *et al.*, 1994): las adeninas de los sitios GATC son metiladas por la metiltransferasa Dam pero durante el inicio de la replicación las secuencias GATC de *oriC* están sólo hemimetiladas y SeqA se une a este DNA hemimetilado. Estas secuencias se mantienen hemimetiladas y con SeqA unido durante un tercio del ciclo celular impidiendo así que haya reinicios.

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

## 2.2. ELONGACIÓN

Una vez formado el punto de replicación, la progresión de la horquilla de replicación en *E.coli* requiere la acción coordinada de cuatro actividades básicas: *SSB*, *DNA polimerasa*, *DNA helicasa* y *DNA primasa*. La proteína *SSB* es necesaria para

## Introducción

---

mantener unicas las cadenas de DNA recién abiertas (Krause y Messer, 1999), en *E.coli* el cromosoma es replicado por la holoenzima DNA polimerasa III (Johnson y O'Donnell, 2005; Kelman y O'Donnell, 1995), la DnaB helicasa migra por delante de la polimerasa abriendo la doble hélice e interacciona con la holoenzima Pol III (Kim *et al.*, 1996) y la DnaG primasa cataliza la síntesis de los fragmentos de Okazaki e interacciona directamente con la DnaB (Tougu *et al.*, 1994; Tougu y Mariani, 1996a,b). Aunque los polipéptidos que componen la holoenzima polimerasa pueden variar en diferentes bacterias, la composición básica de esta maquinaria de replicación está altamente conservada.

Debido a la estructura antiparalela de la molécula de DNA, la elongación de las nuevas cadenas de DNA crea una asimetría en el punto de replicación por el hecho de que la DNA polimerasa sólo sintetiza en el sentido 5'→3'. Por tanto, una de las cadenas, la directa (*leading*), se puede sintetizar de forma continua, mientras que la complementaria, la cadena inversa (*lagging*), ha de sintetizarse de forma discontinua en fragmentos de unas 2 kb, los denominados fragmentos de Okazaki. Por tanto, la replicación parece requerir dos polimerasas distintas, una con una elevada procesividad (para sintetizar una cadena larga sin separarse del molde) y otra con una procesividad moderada para los fragmentos de Okazaki. Además, como las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis *de novo*, la DNA primasa sintetiza pequeñas secuencias de RNA que son utilizadas para iniciar cada fragmento de Okazaki. Dado que un nuevo fragmento de Okazaki ha de iniciarse cada varios segundos, para asegurar que a esta velocidad la primasa tiene pleno acceso a las cadenas abiertas, su asociación con el punto de replicación se realiza por su unión a la helicasa DnaB unida a la cadena de DNA molde de la cadena inversa (Tougu *et al.*, 1994). A este complejo móvil, junto con otras proteínas asociadas se le denomina, *replisoma* o *replitasa*.

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

El Núcleo Pol III está compuesto por tres subunidades distintas:  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$  (McHenry y Crow, 1979; Studwell-Vaughan y O'Donnell, 1993). La subunidad  $\alpha$ , codificada por el gen *dnaE* tiene la actividad DNA polimerasa en sentido 5'→3' incorporando 8 nucleótidos/segundo (el Núcleo Pol III completo incorpora 20 nucleótidos por segundo) (Maki y Kornberg, 1985); la subunidad  $\epsilon$ , codificada por *dnaQ*, tiene actividad exonucleasa 3'→5' y corrige errores en la polimerización. Sin esta subunidad, la holoenzima reduce su procesividad de 50 kb a unas 1,5 kb (Studwell y

O'Donnell, 1990); y la subunidad  $\theta$ , codificada por *holE*, que no tiene una función bien conocida salvo una ligera estimulación de la subunidad  $\epsilon$  (Studwell y O'Donnell, 1990). Además, el gen *holE* puede ser deletado sin graves consecuencias para la célula (Slater *et al.*, 1994).

La *Abrazadera  $\beta$*  es necesaria para que el núcleo de la polimerasa sea una replicasa eficiente. Esta subunidad  $\beta$  es codificada por *dnaN*, que forma una abrazadera que une el núcleo  $\alpha$  al DNA. Unido a esta subunidad  $\beta$ , el núcleo logra replicar el DNA a una velocidad de unos 750 n/s y alcanza una procesividad de más de 50 kb. Estudios bioquímicos iniciales revelaron que la subunidad  $\beta$  se unía al DNA topológicamente, estableciendo que tenía una forma de anillo que abrazaba a la molécula de DNA (Kong *et al.*, 1992; Stukenberg *et al.*, 1991), asociándose físicamente al núcleo  $\alpha$  de la polimerasa (LaDuca *et al.*, 1986; Reems *et al.*, 1995; Stukenberg *et al.*, 1991, Yao *et al.*, 2000).

El *Complejo  $\gamma$* , cargador de la abrazadera de *E.coli*, es un complejo formado por cinco subunidades que se unen con una estequiometría definida,  $\gamma_3\delta_1\delta'_1\chi_1\psi_1$  y que son codificadas por los genes *dnaX* (47.5 kDa), *holA*, *holB*, *holC* y *holD* respectivamente (Jeruzalmi *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2000). El complejo  $\gamma$  proporciona la energía necesaria para unir la abrazadera  $\beta$  al DNA mediante la hidrólisis de ATP. Una vez que carga la subunidad  $\beta$ , se separa del DNA dejando a la abrazadera ensamblada, que a su vez une al núcleo  $\alpha$  con el DNA (Hingorani y O'Donnell, 1998; Stukenberg *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1999). El mecanismo de carga de la abrazadera  $\beta$  se ha determinado mediante estudios bioquímicos. Cuando la Pol III está a concentraciones intracelulares básicas, una cantidad de complejo cargador está asociada a la holoenzima Pol III pero la mayoría está libre en solución (Leu *et al.*, 2000). El cargador de la abrazadera asociado con la holoenzima contiene una forma diferente del gen *dnaX*. La subunidad  $\gamma$  se produce mediante un salto ribosomal del marco de lectura del RNAm del gen *dnaX* que causa la terminación casi inmediata de la traslación y produce una proteína de 47.5-kDa (Flower y McHenry, 1986; Tsuchihashi y Kornberg, 1990). El producto completo del gen *dnaX* es la subunidad  $\tau$  (71.1-kDa), que contiene la secuencia  $\gamma$  más un dominio C-terminal de 23.6-kDa ( $\tau_C$ ). El péptido  $\tau_C$  de 23.6-kDa consta de dos dominios, IV y V, que unen la DnaB y el núcleo de la Pol III (a través de  $\alpha$ ) respectivamente (Gao y McHenry, 2001a, b). La región  $\tau_C$  no es necesaria para la carga de la abrazadera pero si es esencial para la viabilidad celular (Blinkova *et al.*, 1993), debido probablemente a su capacidad para organizar el replisoma. Para la síntesis de la cadena directa y de la cadena inversa se necesitan al menos dos polimerasas, por lo que se cree que el replisoma de *E. coli* contiene dos núcleos Pol III unidos a un cargador  $\tau_2\gamma_1\delta\delta'\chi\psi$ . Este macrocomplejo se ensambla con un orden específico y es denominado

## Introducción

---

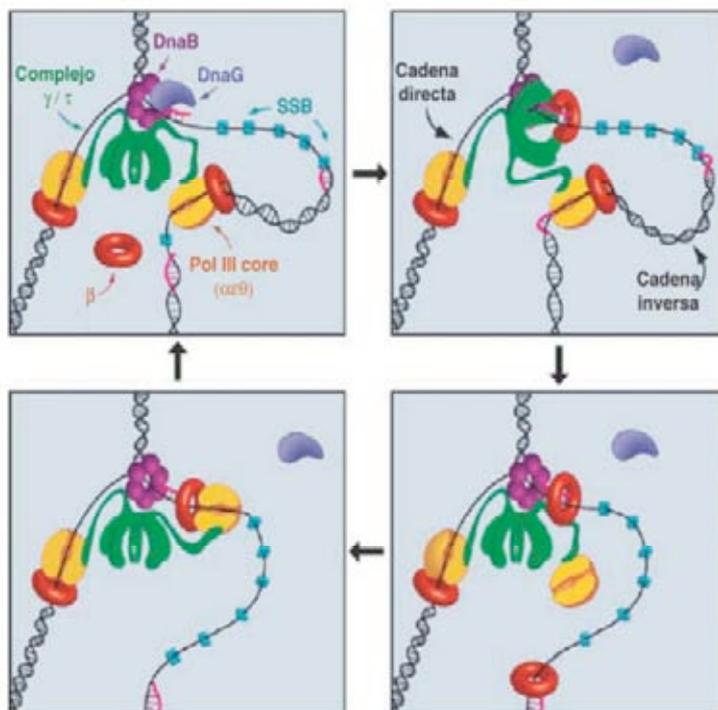
Pol III\* (o Pol III estrella) (Glover y McHenry, 2000; Onrust *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2000). La abrazadera  $\beta$  se asocia con la Pol III\* de un modo dependiente de ATP para formar la Holoenzima Pol III. Las subunidades que forman parte del complejo cargador en una copia le confieren a éste una asimetría y así, los dos núcleos unidos a las dos subunidades  $\tau$  están, de algún modo, en diferentes ambientes (McHenry, 2003). Las consecuencias de esta estructura asimétrica deben de ser mínimas porque un segmento rico en prolina de  $\tau$  separa a los dominios que interactúan con el cargador y la polimerasa, sugiriendo una conexión flexible entre ellos. Se ha propuesto que la estructura asimétrica hace que las dos polimerasas tengan propiedades diferentes, ajustando su funcionamiento para cubrir las diferentes necesidades de la replicación en la cadena directa y en la inversa (Glover y McHenry, 2000, 2001; McHenry y Johanson, 1984; McHenry, 2003).

- **Funcionamiento del replisoma**

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

Cuando la polimerasa de la cadena retardada extiende un fragmento se origina un bucle porque esta polimerasa está conectada con la de la cadena directa (a través del complejo cargador) y ambas extienden la síntesis de DNA en direcciones opuestas. El fragmento de Okazaki, de 1-3 kb, es rellenado en unos pocos segundos, y en este punto el núcleo de la polimerasa tiene que separarse rápidamente del DNA para comenzar

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



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

## Introducción

---

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

### 2.3. TERMINACIÓN

La replicación en *E. coli* es bidireccional y avanza desde un único punto de origen en un cromosoma circular, con lo que los dos puntos de replicación terminan de replicar el cromosoma bacteriano en un punto diametralmente opuesto al inicio. En esta región diametralmente opuesta al inicio están las secuencias terminadoras Ter donde se une la proteína terminadora Tus. Los puntos de replicación pueden entrar en esta región de terminación pero no pueden salir. Los lugares Ter son diez secuencias de unas 20 pares de bases, localizadas desde el minuto 23 al 48 del mapa genético y agrupadas en dos regiones con 5 sitios cada una. Cada grupo tiene una determinada polaridad, es decir, detiene las horquillas de replicación que proceden en una orientación respecto a *oriC* y no supone ningún impedimento para las horquillas que avanzan con la orientación opuesta. Las horquillas de replicación iniciadas en *oriC* avanzan a un lado y otro hasta encontrarse en las regiones Ter. Los 5 sitios Ter que afectan a cada horquilla están situados en el lado opuesto al del avance de elongación respecto al punto diametralmente opuesto a *oriC* con lo que el complejo Tus-Ter bloquea la replicación de una manera polar (Bussiere y Bastia, 1999; Hill, 1996). Así la localización de los sitios Ter fuerza que las dos horquillas se encuentren, asegurando el final del ciclo replicativo (Bussiere y Bastia, 1999). La inversión de regiones del dominio Ter tiene efectos deletéreos, lo que evidencia la importancia de su polaridad (Guijo *et al.*, 2001). Estos lugares Ter se han identificado también en plásmidos y en otras bacterias.

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

En la reanudación de la replicación después del bloqueo impuesto por Ter-Tus están implicados procesos de recombinación (Hou y Hill, 2002; Maisnier-Patin *et al.*, 2001b). Esto se deduce por la entrada del complejo enzimático RecBCD en las proximidades de las horquillas de replicación paradas en las regiones Ter (Horiuchi *et al.*, 1994), por la actividad recombinacional detectada en estas regiones Ter del cromosoma (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995) y por la necesidad de enzimas de recombinación observada para la viabilidad de mutantes con sitios Ter insertados en lugares distintos a las regiones Ter (Bidnenko *et al.*, 2002). Otro resultado que apoya esta afirmación es el hecho de que las horquillas bloqueadas en los sitios Ter pueden promover recombinación ilegítima por procesos que generan intermediarios de DNA lineal (Bierne *et al.*, 1997).

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

## Introducción

---

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

La separación de los cromosomas hermanos requiere que la célula deshaga los círculos concatenados resultantes de la replicación del término (que son desenlazados por la topoisomerasa IV) y que resuelvan los cromosomas dímeros producto de una recombinación homóloga entre los cromosomas, ya que durante toda la replicación se tienen dos copias idénticas del DNA recién sintetizado en una misma estructura, con lo que es fácil suponer un gran número de recombinaciones homólogas. Si el número final de recombinaciones es impar el resultado final de la replicación sería un cromosoma circular dímero. La segregación cromosómica tiene una alta eficacia (en una población exponencial aparecen menos del 0,03% de células anucleadas), por lo que antes de la segregación han de resolverse estos dímeros. Esto se consigue con una recombinación específica de sitio catalizada por las proteínas codificadas por los genes *xerC* y *xerD* (Blakely *et al.*, 1991; Blakely *et al.*, 1993; Colloms *et al.*, 1990), que llevan a cabo una recombinación en la secuencia *dif* localizada en el término de la replicación (Cornet *et al.*, 1996; Perals *et al.*, 2000; Recchia *et al.*, 1999; Steiner y Kuempel, 1998; Webb *et al.*, 1998). Tanto los mutantes carentes de proteína XerC como los  $\Delta dif$  son deficientes en la segregación cromosómica, y este fenotipo se puede suprimir inhibiendo la recombinación homóloga por una mutación en *recA*.

Una vez que los cromosomas están en su forma monomérica, se produce la partición o la migración de los mismos hacia las regiones un cuarto y tres cuartos de la célula. En el cromosoma bacteriano aún no se ha encontrado ninguna secuencia que pueda ser utilizada como zona centromérica ni ningún lugar de anclaje del cromosoma a alguna molécula requerida para el movimiento cromosómico. Aunque la región *oriC* se une de forma temporal a la membrana es dudoso que esta unión pueda tener un papel esencial en la partición de los cromosomas ya que los plásmidos con *oriC* se mantienen de forma muy inestable y se pierden con facilidad en una población bacteriana en crecimiento activo. Sin embargo, trabajos recientes parecen indicar que es la propia hiperestructura de replicación la que actúa a modo de centrómero (J. Riola, tesis doctoral, 2005).

Se han propuesto distintas proteínas cuyo requerimiento se ha relacionado con la partición de los cromosomas. Entre ellas destacan MukB, que se considera que podría regular la superhelicidad y con ella la condensación del DNA junto a MukE y MukF, y de este modo reorganizaría los cromosomas replicados y determinaría su movilidad en buena medida (Hiraga, 2000; Niki *et al.*, 1992; Sawitzke y Austin, 2000; Weitao *et al.*,

2000) y SeqA que forma agregados que influyen decisivamente en la organización tridimensional del DNA (Han *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2003). Esta organización podría afectar a la vez a la movilidad del DNA, a la transcripción de genes implicados en segregación e incluso a la actividad de un hipotético aparato encargado de la segregación cromosómica (Bach *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Hiraga *et al.*, 1998; Sawitzke y Austin, 2000; Weitao *et al.*, 2000).

Otras proteínas, como H-NS, HU, FIS, IciA, o la propia girasa, se encargan de que la topología del DNA sea la correcta durante la replicación y la mutación de cualquiera de ellas altera la segregación cromosómica. Se cree que las funciones de estas proteínas favorece que el cromosoma presente la estructura adecuada en cada momento, de modo que facilitan la segregación del DNA. No se puede descartar sin embargo que no actúen directamente en la segregación, ya que el cambio en la topología de la molécula de DNA que provoca la mutación en estas proteínas puede impedir la expresión de genes estuvieran implicados en segregación de un modo más directo (Gordon y Wright, 2000). Además, la ausencia de uno sólo de los factores relacionados con la separación de los cromosomas no confiere un efecto evidente de segregación por lo que no debe existir por tanto un único motor que lleve a cabo la segregación, sino que se cree que deben ser múltiples los mecanismos que coordinados, contribuyan a asegurar la distribución del material genético entre las células hijas (Fekete y Chatteraj, 2005; Yamaichi y Niki, 2004).

### **3. PROGRESIÓN DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN**

Durante años, se pensó que la carga de la helicasa DnaB por DnaC para iniciar la replicación sólo ocurría en el origen de replicación *oriC* tras la formación de un complejo abierto por la unión de varias moléculas de DnaA a sus sitios de unión específicos. Sin embargo, contrariamente a lo que se había considerado siempre, la replicación del cromosoma bacteriano no es un proceso continuo. La horquilla de replicación, en su avance desde el origen de replicación hasta el término, se puede detener en sitios distintos a Ter al encontrarse con distintos obstáculos, como pueden ser lesiones en el DNA, estructuras secundarias en el cromosoma, proteínas unidas al DNA, etc. o por sufrir una alteración o carencia transitoria de algún componente esencial para la replicación (Maisnier-Patin *et al.*, 2001a). Cuando la horquilla de replicación se detiene de esta forma no programada, la replicación tiene que reanudarse en una secuencia distinta a *oriC* para conseguir la replicación completa del genoma antes de la división celular.

## Introducción

---

El descubrimiento de que la replicación podía ser iniciada de forma independiente de DnaA y en sitios que no eran una secuencia específica de origen abrió un nuevo campo de investigación (Kogoma, 1996, 1997). Así, el destino de las horquillas de replicación paradas ha sido objeto de extensos estudios a lo largo de los últimos diez años. Se han propuesto un gran número de proteínas que actuarían directamente en horquillas bloqueadas *in vivo*. Estas proteínas participan en procesos de recombinación homóloga, en reparación del DNA y en reanudación de la replicación y se ha visto *in vitro* que algunas de ellas se unen directamente a moléculas de DNA con estructura de horquilla que imitan a horquillas de replicación (Flores *et al.*, 2005; Heller y Mariani, 2005; Hishida *et al.*, 2004; Jones y Nakai, 2000; McGlynn y Lloyd, 2002; Sandler y Mariani, 2000).

No existen unas reglas generales que dirijan la actuación de las diferentes proteínas de unión a horquillas bloqueadas; el hecho de que actúen unas proteínas u otras en cada caso concreto o de que una misma proteína pueda desempeñar distintas funciones depende presumiblemente de la causa que provoque la parada y de las condiciones en las que cada horquilla se detiene. Estas cuestiones aún son bastante desconocidas. Lo que sí se conoce es la necesidad de montar un nuevo complejo de replicación tras la reanudación de la horquilla para que la replicación pueda continuar. La proteína encargada de iniciar este ensamblaje de un nuevo replisoma es PriA.

### **3.1. PARADAS Y REANUDACIONES DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN**

La progresión de la horquilla de replicación puede ser alterada por diferentes causas: porque el replisoma se encuentre con una interrupción o hueco en la cadena molde que está copiando (*colapso*), por la presencia de impedimentos físicos o topológicos en el avance del replisoma, o por un deterioro de la procesividad del replisoma debido a una alteración de alguno de sus componentes. En todas estas situaciones se producen horquillas de replicación paradas, que deben ser reanudadas para mantener la viabilidad de la célula, y en estos mecanismos de reanudación de la horquilla de replicación las enzimas de recombinación están directamente implicadas. Esta necesidad de enzimas de recombinación se debe a que la parada de una horquilla de replicación conlleva generalmente la formación de un corte de DNA de doble cadena (DSB) (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Michel *et al.*, 2004). Estas colas de DNA de doble cadena han de ser reincorporadas rápidamente en el cromosoma para que las nucleasas propias de la célula no las degraden, ya que esto conllevaría la degradación del cromosoma y la muerte celular. Esta reincorporación de

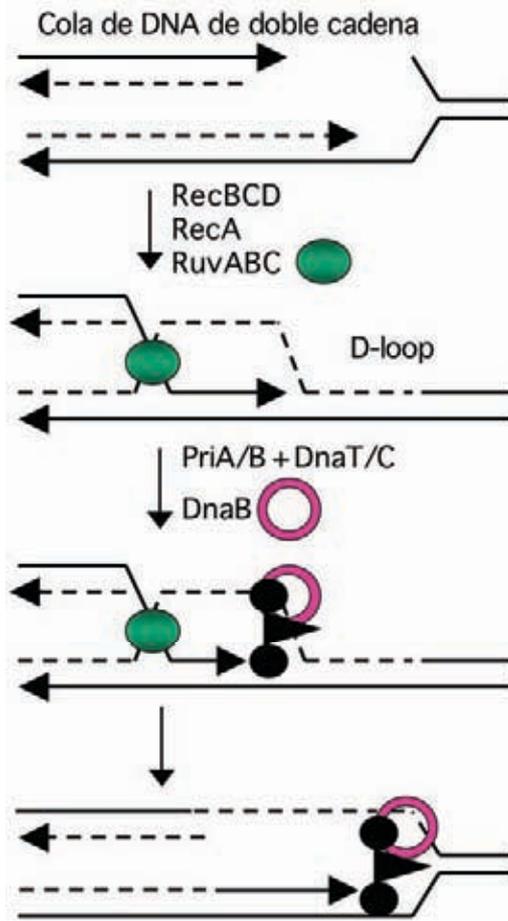
la cola de DNA de doble cadena al cromosoma se lleva a cabo mediante un proceso de recombinación y es precisamente la formación del intermediario de recombinación el punto clave para la reanudación de la progresión de la horquilla de replicación. Por último, una vez reincorporada la cola de DNA es necesario el ensamblaje de un nuevo replisoma en este punto para que se reanude la replicación. Este montaje de un nuevo complejo de replicación es dirigido por la proteína PriA. Así, se conoce que los mutantes *priA* son defectivos para la recombinación homóloga mediada por RecBCD y RecA y por tanto para la reparación mediante recombinación de roturas de doble cadena de DNA. Es decir, la carga de un replisoma mediante el ensamblaje de un primosoma vía PriA es esencial para la conversión de intermediarios de recombinación en productos viables (Kogoma, 1996; Sandler *et al.*, 1996). Aunque la ventaja evolutiva de acoplar reparación de DSBs y el inicio de la replicación no es tan obvia cuando las colas de doble cadena proceden de DNA exógeno (Smith, 1991), la necesidad de una unión tan directa entre ambos eventos es evidente debido a que existe una proporción sustancial de DSBs que se forman espontáneamente durante el crecimiento bacteriano y estas colas de DNA tienen que ser rápidamente reincorporadas al cromosoma para reanudar la replicación.

### **3.1.1. Reanudación a partir de un DSB**

Se ha propuesto que la conversión de una horquilla de replicación en una cola de doble cadena de DNA ocurre cuando la horquilla de replicación se detiene en un hueco en el DNA molde que está replicando (Fig. 5). Este fenómeno se denomina *colapso* (Kuzminov, 1995). Como muestra la figura 5, para que la cola de DNA de doble cadena se reincorpore en el cromosoma es necesaria la acción de las principales proteínas de recombinación RecBCD, RecA y RuvABC (Courcelle *et al.*, 2004; Cox, 2001; McGlynn, 2004):

El complejo RecBCD es la principal vía de reparación de cortes de DNA de la célula. Es una asociación multienzimática con una actividad helicasa altamente procesiva (esta actividad helicasa es conferida por las proteínas RecD y, en menor grado, por RecB) y con una actividad exonucleasa de DNA tanto monocatenario como bicatenario (la actividad exonucleasa es conferida por la proteína RecB). RecBCD puede por tanto degradar una cola de DNA de forma ilimitada (Kuzminov, 1995) o, si la célula no es deficiente en enzimas de recombinación, puede iniciar un proceso de recombinación a partir de esa cola de DNA. Para realizar esto último, RecBCD se une a la cola de DNA bicatenario y con su actividad helicasa separa las dos cadenas de DNA hasta encontrar una secuencia Chi (5'-GCTGGTGG-3'), degradando a su vez la cadena

## Introducción



**Fig. 5.** Formación de roturas de DNA de doble cadena por *colapso* de la horquilla de replicación. Al encontrar un hueco en el DNA molde la replicación se detiene y se origina un corte de DNA de doble cadena. La reanudación de la replicación requiere un proceso de recombinación homóloga mediado por RecA y RecBCD para integrar la cola de DNA al cromosoma y la acción de PriA para ensamblar un nuevo complejo de replicación.

de DNA monocatenario 5' libre que se va generando. De este modo, se origina una cola de DNA monocatenario 3' libre donde el RecBCD carga a la proteína de recombinación RecA (Amundsen y Smith, 2003). RecA es una proteína que, entre otras actividades, tiene una función helicasa. Así, unida al DNA hace que este filamento DNA-RecA invada a una molécula de DNA homóloga e intacta, originando un intermediario de recombinación. Este intermediario de recombinación es resuelto por los complejos RuvAB y RuvABC. El complejo RuvAB reconoce y estabiliza el intermediario de recombinación y tiene actividad helicasa y de migración de la banda, pudiendo desplazar el intermediario formado por RecA. Cuando RuvC se une a RuvAB se forma el complejo RuvABC que tiene actividad endonucleasa y que es el que resuelve el intermediario (West, 1997). En los últimos años se han encontrado evidencias de que en la resolución de este intermediario puede estar también implicada la proteína RecG, que al igual que RuvAB es una helicasa de DNA que puede catalizar la migración de la banda del intermediario de recombinación (Lloyd y Sharples, 1993). No se conoce si existe alguna endonucleasa que actúe cuando es RecG la que cataliza la migración de la banda o si también en este caso es RuvABC la

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

Evidencias directas de este colapso de las horquillas de replicación *in vivo* mostraron que un hueco en un sitio específico del DNA se podía convertir en una DSB en un proceso que requería la replicación del DNA (Kuzminov, 2001). Aunque la recombinación homóloga no es esencial para la viabilidad de una estirpe silvestre de *E.coli*, la reparación mediante recombinación de DSBs es esencial para la viabilidad de ciertos mutantes en proteínas de reparación o de replicación del DNA (Horiuchi y Fujimura, 1995; Kuzminov, 1995). Por ejemplo, mutantes defectivos en la polimerasa I (*polA*) o en la ligasa (*lig*) presentaban defectos en la unión de fragmentos de Okazaki y requerían proteínas de recombinación (RecA y RecBCD) para su viabilidad. Estos mutantes presentaban además un aumento de DSBs debido al colapso que sufrían las horquillas de replicación al encontrarse con interrupciones de cadena sencilla en el DNA. Dobles mutantes *polA priA* eran letales (Lee y Kornberg, 1991), lo que apoyaba la idea de que la reparación de DSBs estaba acoplada con reanudaciones de la replicación en estos mutantes. Se propuso así que la reincorporación de los cromosomas *colapsados* en la cromátida homóloga mediante recombinación es seguida del ensamblaje de un primosoma por la acción de PriA en el intermediario de recombinación que se origina, permitiendo el reinicio de la replicación en la región donde la horquilla de replicación fue originalmente interrumpida (Kuzminov, 1995, 1999).

### **3.1.2. Reanudación a partir de RFR**

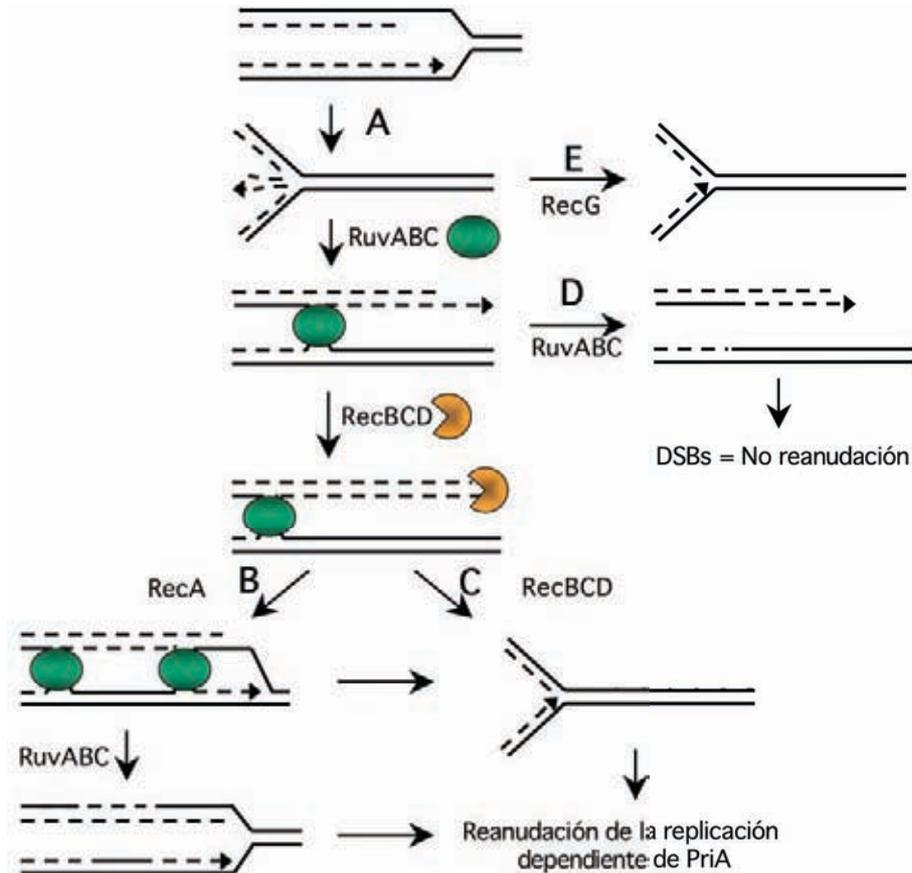
Cuando la parada de la horquilla no se debe a un hueco en la cadena molde y por tanto no se produce un DSB que origine la formación del intermediario de recombinación debe haber otros mecanismos para reanudar la progresión de estas horquillas. Estos mecanismos han de generar colas de DNA de doble cadena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

## Introducción

---

Este modelo fue originalmente propuesto por Higgins y colaboradores (Higgins *et al.*, 1976) y ha sido extensamente demostrado por el laboratorio de Bénédicte Michel (Michel *et al.*, 2004). Según el modelo de la reversión de la horquilla de replicación, cuando la parada de la horquilla de replicación se debe a deficiencias en proteínas del replisoma esta parada va seguida de una rehibridación de las hebras líder y retardada recién sintetizadas (Fig. 6), permitiendo a su vez que las cadenas molde hibriden entre sí, con lo que se origina un intermediario de Holliday que juega un papel crucial en la reanudación de la replicación en bacterias, ya que es un sustrato de varias enzimas de recombinación que ofrecen diferentes vías de resolución de horquillas paradas (Seigneur *et al.*, 1998). La característica de una reversión de la horquilla es la formación de una cola de doble cadena de DNA, sustrato del complejo RecBCD, y la formación de un intermediario de Holliday, sustrato principalmente del complejo RuvABC (Fig. 6-A). En células carentes de actividad RecBCD la cola de doble cadena de DNA no es degradada por la acción exonucleasa del complejo RecBCD (la proteína RecB es la que confiere acción exonucleasa al complejo). En cambio, el intermediario de Holliday es resuelto por RuvABC, con lo que se produce una rotura en el cromosoma (Fig. 6-D), idéntica a la rotura que se origina por el *colapso* de una horquilla en un hueco en el DNA molde pero que en este caso es originada por RuvABC (Seigneur *et al.*, 1998), es decir, no son consecuencia directa de la parada. Estas roturas del cromosoma dependientes de RuvABC en células carentes de actividad RecB pueden ser detectadas por electroforesis en campo pulsante (Michel, 2000; Michel *et al.*, 2001).

Cuando el *RFR* se produce en células con un buen nivel de enzimas de recombinación homóloga (Fig. 6-B), la cola de DNA de doble cadena que se origina por la reversión de la horquilla es procesada y reincorporada en el cromosoma (como ocurría en el *colapso*); el complejo RecBCD degrada la cola de DNA de doble cadena y carga RecA, formándose un intermediario de recombinación que es resuelto por RuvABC (Kowalczykowski, 2000; West, 1997). A continuación se ensambla un primosoma por la acción de PriA reanudándose así la replicación. Aunque tanto RecA como RecB se requieren para esta reacción, sólo RecB es esencial para la viabilidad de mutantes en la Pol III o en mutantes *rep* (Colasanti y Denhardt, 1987; Flores *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002; Michel, 2000; Michel *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2001; Seigneur *et al.*, 1998; Seigneur *et al.*, 2000; West, 1997).



**Fig. 6.** Modelo de la *Reversión de la Horquilla de Replicación* (adaptado de Michel *et al.*, 2004; Seigneur *et al.*, 1998). En el primer paso (A), la horquilla de detiene y sufre una reversión. Esta reversión forma un intermediario de Holliday (se muestran dos representaciones alternativas de esta estructura). En células  $\text{Rec}^+$ , RecBCD encuentra una secuencia Chi e inicia una recombinación homóloga dependiente de RecA (B) y los dos intermediarios de Holliday (uno formado por la reversión y el otro por la recombinación homóloga) son resueltos por RuvABC. Alternativamente, si RecBCD encuentra el intermediario de Holliday antes de encontrar la secuencia Chi o en ausencia de RecA (C), la cola de DNA de doble cadena es degradada hasta el intermediario de Holliday, restableciéndose la estructura en horquilla. En ambos casos, la replicación se reanuda por un proceso dependiente de PriA. En ausencia de RecBCD (D), la resolución del intermediario de Holliday por RuvABC provoca roturas en el cromosoma. La cola de DNA de doble cadena que se forma tras la reversión puede ser también regresionada por la actividad helicasa de RecG (E).

## Introducción

---

Esto indica que la reversión de la horquilla puede ser procesada por una vía alternativa no recombinogénica, y o bien RecBCD puede degradar la cola de DNA hasta el final antes de que actúe RuvABC, deshaciendo el intermediario de recombinación (por ejemplo, si no encuentra una secuencia Chi para iniciar la carga de RecA) volviendo a la estructura original en horquilla y ensamblarse de nuevo aquí el primosoma (Michel *et al.*, 2004; Seigneur *et al.*, 1998) (Fig. 6-C), o RecG puede deshacer el intermediario de Holliday con su actividad helicasa, proporcionando así una estructura en horquilla donde ensamblar el primosoma para reanudar la replicación (Whitby *et al.*, 1994) (Fig. 6-E).

En conclusión, el *RFR* puede promover la reactivación de horquillas de replicación paradas por tres mecanismos: la reincorporación de la horquilla revertida mediante recombinación homóloga, la degradación de la cola de doble cadena y la carga de un primosoma sin necesidad de recombinación o la regresión por RecG de la horquilla que sufrió la reversión. Los tres mecanismos permiten que se reanude la replicación sin que se produzcan roturas en el DNA. Además, el ensamblaje del primosoma vía PriA también está envuelto en el reinicio de la replicación tras la reversión de la horquilla cuando se fuerzan las paradas de las horquillas inactivando las enzimas del replisoma antes mencionadas (Flores *et al.*, 2001; Sandler y Mariani, 2000; Seigneur *et al.*, 1998).

Aunque los procesos por los que una horquilla que ha sufrido una reversión es reanudada son bastante conocidos, aún no está claro qué decide si una horquilla parada debe sufrir una reversión ni qué mecanismos llevan a cabo esta reacción de reversión. *In vitro* se ha visto que las proteínas de recombinación RecA y RecG pueden catalizar la reversión de estructuras en horquilla (McGlynn y Lloyd, 2000; Robu *et al.*, 2001, 2004) y que esta reacción también puede ser dirigida por un superenrollamiento positivo (Olavarrieta *et al.*, 2002; Postow *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados *in vivo* no son tan claros. RecA es requerida para que se produzca la reversión en mutantes en la helicasa replicativa DnaB (Seigneur *et al.*, 2000), pero no se requiere para que haya *RFR* en otros mutantes de replicación (Flores *et al.*, 2001; Grompone *et al.*, 2002; Grompone *et al.*, 2004; Seigneur *et al.*, 2000). Por otro lado se ha propuesto que RecG además de catalizar la reanudación de una horquilla que ha sufrido una reversión, puede ser requerida para formar el intermediario de Holliday a partir de horquillas bloqueadas por una lesión en el DNA por UV (McGlynn *et al.*, 2001; McGlynn y Lloyd, 2002) aunque esta capacidad de catalizar la reversión aún no se ha descrito *in vivo* para RecG. Además, resultados recientes parecen indicar que es la propia actividad helicasa del complejo RuvAB la que puede dirigir la reversión de la horquilla en mutantes *dnaE*, *hold* y *rep* (Baharoglu *et al.*, 2006), y que en mutantes *dnaE* y *dnaN* se requiere la

acción de la helicasa UvrD, implicada en procesos de reparación de huecos en el DNA, para que el *RFR* se lleve a cabo, aunque no sea esta proteína directamente la que catalice la reacción (Flores *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005).

Todo esto apunta a que la formación de un intermediario de Holliday por una reversión de una horquilla parada puede ser catalizada por diferentes vías, dependiendo de la naturaleza de la mutación que causa el bloqueo de la horquilla. Del mismo modo, una vez formado el intermediario de Holliday y dependiendo de la causa que provoque la parada, son múltiples las vías que pueden llevar a cabo la recuperación de esa horquilla parada y la reanudación de la replicación. De forma general, se ha demostrado que la inactivación de enzimas que forman parte del complejo de replicación provoca unas paradas de las horquillas de replicación susceptibles de ser reanudadas por reversión de la horquilla. Sin embargo, cuando la parada de la horquilla es forzada por una inactivación de topoisomerasas tanto del tipo I como del tipo II (Grompone *et al.*, 2003) o por la inserción de sitios Ter ectópicos (Bidnenko *et al.*, 2002), es decir, por causas externas al complejo de replicación propiamente dicho, las paradas de las horquillas no se resuelven según el modelo de la *RFR*.

Por último cabe señalar que además se han descubierto funciones de RecA distintas a su papel de formación de un intermediario de Holliday en el proceso de recombinación homóloga. RecA también se une a las regiones de cadena sencilla generadas en la horquilla de replicación cuando su progresión se ve impedida (Roberts *et al.*, 1982; Sassanfar y Roberts, 1990). La unión de RecA a las regiones de cadena sencilla en las horquillas de replicación bloqueadas no sirve sólo para detectar que la replicación está parada sino también para mantener la integridad estructural de la horquilla de replicación hasta que la replicación pueda continuar (Clark y Margulies, 1965; Howard-Flyers *et al.*, 1969). De este modo, la unión de RecA al DNA de cadena sencilla juega un papel crucial en el mantenimiento de la integridad de las horquillas paradas hasta que sean reparadas.

### **3.2. ENSAMBLAJE DEL REPLISOMA POR *PriA***

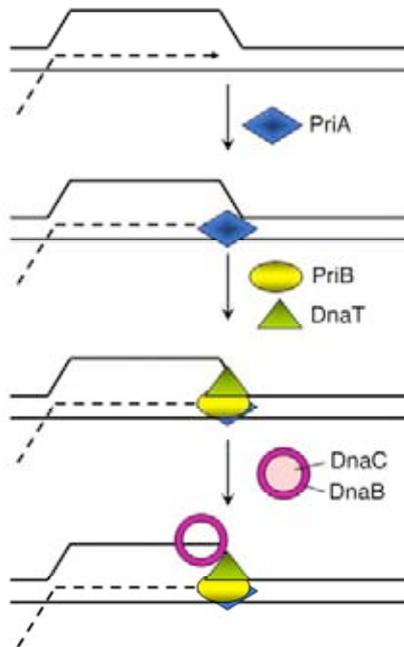
Una vez que la horquilla de replicación ha sido procesada por una u otra vía, es necesario que la replicación se reanude en el lugar donde se detuvo para completar la replicación del cromosoma y permitir de este modo la viabilidad celular. El primer paso para esta reanudación de la replicación es el ensamblaje de un primosoma, que es un intermediario de replicación capaz de abrir la doble hélice de DNA y de sintetizar un cebador para que a partir de él se reanude la replicación. La proteína que dirige el

## Introducción

---

ensamblaje de este primosoma es PriA. El mecanismo molecular del ensamblaje *in vitro* e *in vivo* del primosoma y el papel fisiológico de estas reanudaciones de la replicación han sido objeto de intensos estudios en *E.coli* durante los diez últimos años (Asai y Kogoma, 1994; Jones y Nakai, 2000; Kogoma *et al.*, 1996; Marians, 2000; Sandler y Marians, 2000). *In vitro*, PriA reconoce y se une específicamente a las secuencias PAS (sitios de ensamblaje del primosoma) para iniciar el montaje del primosoma, y este primosoma una vez montado permanece asociado con el replisoma durante la síntesis de DNA. *In vivo* no se conoce si esta asociación se mantiene durante la síntesis. Sin embargo, no se encontraron sitios PAS en el cromosoma, lo que indicaba que tenía que existir alguna otra secuencia o estructura en el DNA que sustituyese a los sitios PAS (Nurse *et al.*, 1991; Zavitz y Marians, 1991). Posteriormente se descubrió que la recombinación homóloga requería la formación de un primosoma y que PriA montaba el primosoma en un intermediario de recombinación que se forma, también conocido como *D-loop* (Kogoma, 1996; Sandler *et al.*, 1996). Por otro lado, recientemente se ha visto que PriA también puede dirigir el ensamblaje de un primosoma directamente en una estructura de DNA en forma de horquilla (Heller y Marians, 2005).

El ensamblaje del primosoma es un proceso ordenado que requiere la acción coordinada de las proteínas PriA, PriB, PriC, DnaT y DnaC. Las proteínas primosomales PriA, PriB, PriC y DnaT se ensamblan para formar un andamio molecular que permite a DnaC cargar a la helicasa DnaB en el DNA. A continuación, a este preprimosoma se une la primasa DnaG, constituyendo así el primosoma completo encargado de sintetizar un cebador. Por último, a esta estructura se une la DNA polimerasa III, con lo que el replisoma queda formado para reanudar la replicación (Sandler y Marians, 2000) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Ensamblaje del primosoma mediado por PriA. Para reanudar la replicación en una región del cromosoma distinta a *oriC*, la proteína PriA junto con PriB y DnaT forman un *andamio* molecular en la horquilla de replicación parada que permite a DnaC cargar a la helicasa DnaB.

#### 4. NDP reductasa

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

##### 4.1. ESTRUCTURA Y CLASES

La catálisis llevada a cabo por esta enzima es un proceso químicamente complicado y requiere la participación de un radical orgánico libre, que es almacenado por la enzima hasta su utilización (Reichard y Ehrenberg, 1983). La NDP reductasa está formada por dos componentes, uno que genera el radical y otro con la actividad reductasa. El generador del radical produce y almacena un radical, que, en un primer paso de la reacción se emplea para oxidar el sustrato a una forma radical. Este

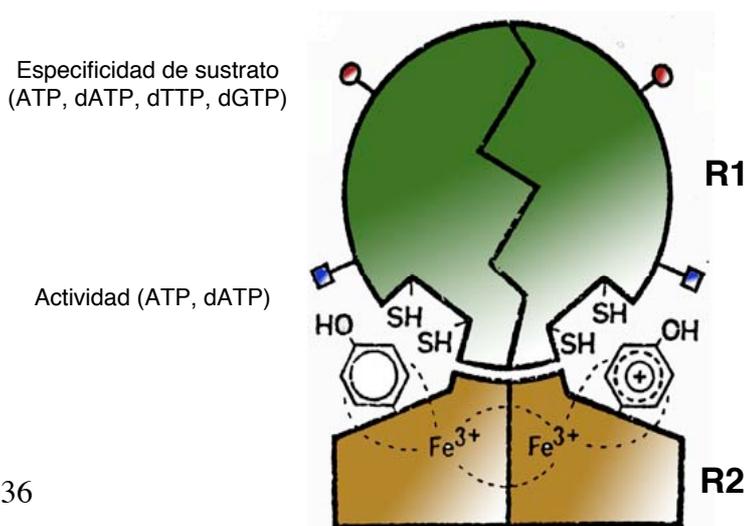
## Introducción

generador del radical no es el mismo para todas las NDPs, mientras que el componente reductasa si es muy similar en todas ellas.

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

- **Clase I:** está formada por dos proteínas homodiméricas, R1 ( $\alpha_2$ ), codificada por el alelo *nrdA*, y R2 ( $\beta_2$ ), codificada por el alelo *nrdB* (Fontecave *et al.*, 1992). La cadena larga  $\alpha$  contiene el sitio activo (en una hendidura central de escasa accesibilidad) y sitios de unión para efectores alostéricos. La cadena pequeña  $\beta$  contiene un centro con dos átomos de hierro próximos a una tirosina con la que interaccionan, generando un radical libre tirosilo estable.
- **Clase II:** tienen una estructura simple ( $\alpha$  o a veces  $\alpha_2$ ) (Panagou *et al.*, 1972; Tsai y Hogenkamp, 1980). Generan el radical a partir de adenosilcobalamina.
- **Clase III:** son heterotetrámeros  $\alpha_2\beta_2$  similares a los de la clase I (Ollagnier *et al.*, 1996). El polipéptido  $\alpha$ , codificado por el gen *nrdD*, contiene un radical glicilo sensible a oxígeno (Sun *et al.*, 1996). La cadena  $\beta_2$ , codificada por el gen *nrdG*, contiene un grupo hierro-azufre que junto con S-adenosilmetionina puede generar el radical glicilo (Ollagnier *et al.*, 1996).

La Clase I ha sido la que más se ha estudiado ya que fue la primera que se descubrió y a este grupo pertenece la NDP reductasa de *Escherichia coli* (Fig. 8), con la que se han llevado a cabo la mayoría de los trabajos (Ekberg *et al.*, 2003; Eklund *et al.*, 2001; Fontecave *et al.*, 1992; Nordlund y Eklund, 1993).



**Fig. 8.** Esquema de la enzima NDP reductasa propuesto por Thelander y Reichard (Thelander y Reichard, 1979). Se muestran los sitios de regulación de la especificidad de sustrato y de actividad. El centro catalítico de la enzima se sitúa entre R1 y R2 con los grupos sulfhidrilos, los radicales tirosilos y su conexión a los átomos de hierro.

#### 4.2. ACCIÓN CATALÍTICA Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD

En el polipéptido  $\alpha$  es donde se lleva a cabo la catálisis enzimática y donde se suceden interacciones alostéricas. Dependiendo de la configuración alostérica, uno de los cuatro ribonucleótidos se une al centro catalítico (Reichard, 1993a, 1997). Además, la reacción enzimática requiere un donador de electrones externo. Estos donadores son pequeñas proteínas (tioredoxinas y glutaredoxinas) con actividad redox (Holmgren y Bjornstedt, 1995).

La unión de uno de los sustratos al sitio activo de la enzima reducida marca el comienzo de la transferencia del radical desde el residuo de tirosina, unido a los dos átomos de hierro oxidados en R2, hasta el centro activo en R1. El radical se transfiere a R1, a una cisteína que toma el hidrógeno del carbono 3' de la ribosa del sustrato, pasando el radical a dicho sustrato. Del carbono 2' se libera el grupo OH quedándose así con el radical y protonado. Entonces aparecen otras dos cisteínas del sitio activo cuyos grupos tioles reducen el carbono 2' de la ribosa gracias al potencial redox de los dos residuos que quedan unidos por puentes disulfuro. Finalmente el átomo de hidrógeno de la primera cisteína vuelve al carbono 3' y el sustrato pasa a ser producto reducido (Chang *et al.*, 2004; Eklund *et al.*, 2001; Jordan y Reichard, 1998). El reductor final del sistema es el NADPH, que pasa sus electrones a las cisteínas que habían quedado oxidadas y unidas por puentes disulfuro. La enzima queda de este modo preparada para la entrada de un nuevo sustrato (Eklund *et al.*, 2001; Jordan y Reichard, 1998).

La actividad de la NDP reductasa depende del ciclo celular en la mayoría de los microorganismos y además su actividad es regulada transcripcionalmente (Bjorklund *et al.*, 1990). Los genes *nrdA* y *nrdB* que codifican las dos subunidades de la enzima de *E. coli* pertenecen a un mismo operón cuya expresión está regulada por el promotor *nrdP* y por proteínas que intervienen en el inicio de la replicación como son Fis y DnaA (Augustin *et al.*, 1994).

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

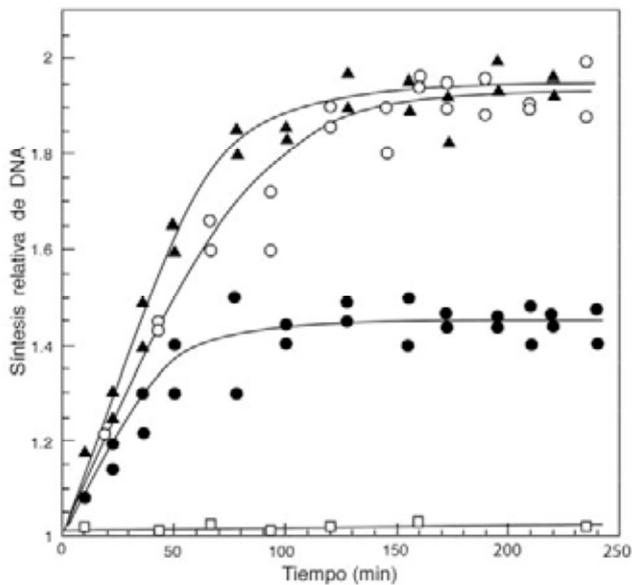
### 4.3. ESTUDIO DE LA NDP REDUCTASA

Los estudios *in vivo* de la NDP reductasa se han realizado inhibiendo la enzima con productos químicos como la hidroxurea (Hu) o con la utilización de mutantes termosensibles.

La hidroxurea es una droga que inhibe el centro activo de la NDP reductasa. Esta droga es una molécula pequeña que debe penetrar en la proteína, donde no tiene sitio de unión. No se conoce si la Hu llega hasta el lugar donde se sitúa el radical tirosilo o si provoca una reacción en cadena que finaliza en el residuo de tirosina sustrayendo el radical. En cualquier caso, la inhibición de la NDP reductasa que provoca la Hu es específica e inmediata, lo que demuestra que el pool de nucleótidos existente en la célula no es suficiente para mantener la replicación del cromosoma (Rosenkranz y Carr, 1966; Rosenkranz *et al.*, 1966).

La mutación en la NDP reductasa mejor conocida en *E.coli* es la mutación *nrdA101*, que codifica una subunidad R1 termosensible. El análisis de los parámetros del ciclo celular de una estirpe de *E. coli nrdA101* (JS1018) y de su estirpe isogénica silvestre para el gen *nrdA* creciendo a 30°C indicó un periodo C de 154 minutos para el mutante y de 74 minutos para la estirpe silvestre (Guzmán *et al.*, 2002). Estos resultados indican que el mutante tiene un tiempo de elongación de la replicación al menos dos veces mayor que el silvestre, incluso a la temperatura permisiva. Esto puede ser debido a la menor actividad de la enzima codificada por el alelo *nrdA101* incluso a 30°C. Esta deficiencia causa en el mutante un mayor solapamiento de ciclos de replicación que en la estirpe silvestre. Además, como se muestra en la figura 9, el análisis de la síntesis de DNA de esta estirpe termosensible muestra que a la temperatura restrictiva la replicación del DNA no se detiene de forma instantánea (Guzman *et al.*, 2002). Cuando el cultivo es cambiado a 42°C sin ninguna droga, la acumulación de radiactividad es del 45 por ciento. Esta síntesis de DNA a la temperatura restrictiva es el resultado de la inhibición de la NDP reductasa por la temperatura tras un periodo de tiempo en el que la enzima mutada sigue siendo activa. La inactivación de la enzima con hidroxurea, que inhibe específicamente el centro activo de la NDP reductasa, demuestra que el pool de nucleótidos que tiene la célula no es suficiente para mantener esta síntesis residual a 42°C, puesto que con hidroxurea la síntesis de DNA se detiene instantáneamente. Asumiendo que la síntesis de DNA continúa tras el cambio a 42°C hasta permitir una acumulación del 45 por ciento, esto indica un periodo de termorresistencia de la enzima de 40-50 minutos con una actividad normal a 42°C (Fig. 9). Como la mutación *nrdA101* codifica un producto génico que es destruido *in vitro* en menos de 2 minutos (Fuchs *et al.*, 1972), este resultado sugiere que alguna estructura protege a la NDP

reductasa mutada de la inactivación térmica durante este periodo de tiempo (Guzmán *et al.*, 2002).



**Fig. 9.** Síntesis de DNA en JS1018 (*nrdA101*). A tiempo cero, distintas alícuotas del cultivo que crecía exponencialmente a 30°C se trataron con rifampicina (O), con hidroximetilurea (□), o con un cambio a 42°C con (▲) o sin (●) rifampicina. Los valores representados se obtuvieron como desintegraciones por minuto (dpm) relativas a las dpm existentes a tiempo cero.

Se podría pensar que la parada de las horquillas de replicación por una elevada temperatura en el mutante *nrdA101* se debe a la inactivación de la NDP reductasa a pesar del periodo de termorresistencia observado. Si esto fuera así, no debería haber efecto de la rifampicina a 42°C. Sin embargo, cuando un cultivo exponencial de JS1018 es cambiado de 30°C a 42°C junto con la adición de rifampicina, todas las horquillas de replicación son funcionales durante todo el periodo C, y la acumulación de DNA es la misma que con el tratamiento de rifampicina a 30°C. En ausencia de síntesis de RNA, o lo que es lo mismo, en ausencia de nuevos inicios de replicación, todas las horquillas de replicación activas en el momento del cambio de temperatura continúan la replicación hasta llegar al término originando cromosomas totalmente replicados (Guzmán *et al.*, 2002).

Estos resultados apoyan el modelo en el que la NDP reductasa estaría protegida de la inactivación térmica por la asociación con otras proteínas durante unos 40-50 minutos, y que sólo cuando se queda desprotegida es inactivada por la temperatura. Estas otras proteínas serían los componentes de la *Hiperestructura de Replicación*.

### 5. HIPERESTRUCTURAS CELULARES

Las enzimas se han estudiado tradicionalmente analizando el mecanismo por el que actúan y cómo llevan a cabo sus reacciones desde un punto de vista individual mediante análisis *in vitro*. No obstante, en los últimos años se han llevado a cabo estudios en los que se trata de conocer dónde y cómo actúan en su entorno natural, esto es, *in vivo*. Así, se ha conocido que muchas rutas metabólicas se llevan a cabo gracias a la acción de enzimas multifuncionales o de complejos multienzimáticos estrechamente asociados. Aunque las uniones que se producen entre las enzimas que forman parte de un complejo multienzimático suelen ser estrechas, normalmente no son enlaces covalentes. Así, ya en 1982 Srere propuso que la mayoría de las rutas metabólicas eran catalizadas por agregados multienzimáticos perfectamente organizados. A estos agregados los llamó *metabolones*. Los intentos de aislar estos metabolones generalmente fracasaban porque las fuerzas o uniones que los estabilizaban no eran fuertes, con lo que no sobrevivían a las diluciones o cambios iónicos a los que se sometían los extractos celulares preparados por métodos tradicionales (Srere, 1987). Por esto, la existencia de estos metabolones a menudo es difícil de demostrar experimentalmente. Aún así, son varias las líneas de investigación que persiguen este objetivo empleando distintas técnicas. Las aproximaciones que se han hecho en este campo incluyen la demostración de la canalización de metabolitos *in vitro*, experimentos de cinética que demuestran una transferencia directa de metabolitos de enzima a enzima, distintas evidencias genéticas que apoyan la especificidad de las interacciones observadas, la colocalización dentro de la célula de distintas enzimas que se suponen asociadas, estudios llevados a cabo *in vivo* de la compartimentación de metabolitos, estudios de *crosslinking* de proteínas, demostración de interacciones de proteínas que han sido aisladas individualmente y que se unen al estar juntas para formar el metabolón y evidencias inmunológicas, particularmente el análisis con anticuerpos anti-idiotipo. Todas estas líneas de evidencias apoyan la existencia de estos complejos multienzimáticos.

Son muchas las ventajas biológicas que conlleva la existencia de estas asociaciones enzimáticas. Las principales serían: el mantenimiento de altas concentraciones de metabolitos en determinadas zonas de las células sin necesidad de una compartimentación dentro de una membrana, la eficiencia que suponen en la regulación coordinada de la síntesis metabólica y el flujo adecuado de metabolitos y favorecer una relativa rapidez en la respuesta que dan los procesos metabólicos a los cambios que se producen en el medio celular. Todas estas características están relacionadas con la capacidad que tienen estos metabolones de canalizar el

intermediario sintetizado por una enzima hasta la siguiente restringiendo la difusión al resto de la célula (Mathews, 1993).

Siguiendo esta idea de asociación enzimática, Norris ha propuesto la existencia de un nivel superior de asociación proteica intermedio entre la macromolécula y la célula: la hiperestructura. Según Norris, una hiperestructura es una asociación de varios complejos proteicos, membranas, DNA y otros componentes celulares que están implicados en una función concreta. Las uniones de estos complejos que forman la hiperestructura serían débiles de forma que sólo permanecerían unidos para ejercer su función metabólica, desensamblándose cuando su actividad no es requerida (Norris *et al.*, 1999). Así, Norris propone la existencia en *E. coli* de una hiperestructura implicada en la replicación del DNA. Esta hiperestructura estaría formada por SeqA, por genes que codifican componentes de la propia hiperestructura, porciones de membrana y enzimas responsables de la síntesis de DNA. La existencia de esta asociación conferiría una mayor eficiencia en el ensamblaje de sus componentes y una canalización de precursores para la optimizar la síntesis de DNA (Norris *et al.*, 2000). Además, estaría implicada en el control del inicio de la replicación ya que SeqA se une a los orígenes de replicación recién replicados, esto es hemimetilados, para impedir reinicios. Por último, esta hiperestructura unida a *oriC* inhibiría la expresión de algunos genes, como *dnaA*, lo que también contribuiría a evitar nuevos reinicios y también estaría implicada en la separación de los dos cromosomas replicados ya que SeqA estaría reclutando genes con secuencias GATC para metilar, favoreciendo la separación de los cromosomas (Norris *et al.*, 2000). Otro modelo de hiperestructura propuesto por Norris sería la formada por DnaA, la membrana celular y otras proteínas implicadas en el inicio de la replicación. Esta hiperestructura sería más funcional en el inicio de la replicación que la acción aislada de los distintos componentes que intervienen en el en este proceso (Norris *et al.*, 2002).

La existencia de una hiperestructura de replicación propuesta por Norris en la que el replisoma estaría asociado al complejo de síntesis de nucleótidos para que los precursores del DNA sean sintetizados en el lugar en el que van a ser utilizados ha sido apoyada por distintas evidencias que se detallan a continuación, siendo una de ellas el trabajo de Guzmán y colaboradores en el que se demuestra que la NDP reductasa tiene que estar protegida por algún tipo de hiperestructura que permite que se mantenga funcional durante cincuenta minutos al ser incubada *in vivo* a 42°C (Guzmán *et al.*, 2002).

### 5.1. COMPLEJO DE SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS (dNTP SINTETASA)

La replicación del DNA es un proceso metabólico particularmente apropiado para esperar algún tipo de organización enzimática (Kornberg y Baker, 1991). En primer lugar, los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) tienen un papel limitado fuera de su función como precursores del DNA. Así, a diferencia de los ribonucleósidos, que tienen múltiples funciones, los dNTPs tienen que estar presentes en cantidades significativas sólo donde van a ser usados para la replicación del DNA. En segundo lugar, *E. coli* replica su cromosoma de forma bidireccional en unos 50 minutos en estirpes creciendo con un tiempo de generación menor a 100 minutos a 37°C (Helmstetter, 1996). Esto quiere decir que cada horquilla de replicación sintetiza DNA a una velocidad de 1500 n/s. Al mismo tiempo, la RNA polimerasa está transcribiendo el DNA con una velocidad media de 45 n/s. Pero contrastando con esta diferencia en la polimerización, el pool de dNTPs es unas 10 veces menor que el pool de NTPs (Pato, 1979). Es decir, los dNTPs no pueden llegar al lugar donde van a ser utilizados a la velocidad a la que se necesitan simplemente por un proceso de difusión (Ji y Mathews, 1991). En tercer lugar, la polimerasa de *E. coli* tiene valores de  $K_m$  bastante altos, con lo que se necesita tener unos niveles de dNTPs muy altos en los sitios de replicación para que la DNA polimerasa pueda funcionar a su máxima velocidad (Mathews, 1976; Mathews y Sinha, 1982). Todos estos factores sugieren por tanto la existencia de gradientes de concentración de dNTPs en los sitios de replicación *in vivo*.

Por todo esto, hace años ya se propuso que las enzimas que participaban en la síntesis de dNTPs tenían que estar organizadas en un complejo multienzimático que actuase de algún modo coordinado en los sitios de replicación. Este complejo facilitaría tanto la síntesis de dNTPs como su flujo hacia los lugares donde la replicación se estaba llevando a cabo, actuando posiblemente de una forma coordinada con el complejo de replicación (Reddy *et al.*, 1977).

Para comprobar este modelo se analizaron lisados celulares y se obtuvieron las primeras evidencias de que estos lisados contenían agregados de los que formaban parte distintas enzimas implicadas en la síntesis de dNTPs (Reddy *et al.*, 1977). En estudios posteriores, distintos trabajos que se han desarrollado fundamentalmente en el laboratorio de Mathews han demostrado que existe un complejo denominado *dNTP sintetasa* del que forman parte distintas enzimas implicadas en la síntesis de estos precursores del DNA. Estos trabajos se llevaron a cabo con el bacteriófago T4 (Flanegan y Greenberg, 1977; Kim *et al.*, 2005a; Mathews, 1972, 1976; Mathews y Sinha, 1982; North *et al.*, 1976; Reddy *et al.*, 1977; Reddy y Mathews, 1978; Tomich *et al.*, 1974). En

1987 se aportaron además las primeras evidencias de que la NDP reductasa estaba formando parte de este complejo de síntesis de nucleótidos (Mathews *et al.*, 1987).

Una vez establecida la existencia de esta dNTP sintetasa y considerando que la acción de este complejo tenía que estar muy ligada al propio proceso de replicación, se trató de conseguir evidencias de una interacción entre estos dos grandes complejos, el complejo de síntesis de nucleótidos y el complejo de replicación. Resultados concluyentes de esta asociación aún no se han conseguido pero son muchas las evidencias que apoyan que ambos complejos tienen que estar estrechamente interrelacionados. En 1993 y analizando también el virus T4 se descubrió que la NDP reductasa de este virus interaccionaba, a través de la subunidad R2, con la proteína DNAP34, codificada por el gen p34 de T4 y que era una proteína de unión a DNA de cadena sencilla (equivalente a SSB de *E. coli*) que se localizaba en los lugares donde se estaba llevando a cabo la replicación. El bloqueo de esta proteína inhibía la síntesis de DNA, sugiriendo que DNAP34 participaba en la replicación (Chase y Williams, 1986; Davis y Mathews, 1993). Así, se demostró la asociación de hasta diez proteínas implicadas en la síntesis de dNTPs (Wheeler *et al.*, 1992; Wheeler *et al.*, 1996), y por la masa molecular de los complejos aislados se dedujo que cada complejo contendría no más de dos copias de cada enzima y que era posible la existencia de varias dNTP sintetetasas por cada punto de replicación para mantener concentraciones suficientes de nucleótidos para mantener la replicación (Wheeler *et al.*, 1996). Además se ha visto una asociación del complejo de síntesis de nucleótidos con las proteínas codificadas por los genes *gpvvsX* y *gpvvsY* de T4, indicando que este complejo puede estar asociado con el complejo que lleva a cabo la replicación dependiente de recombinación, ya que ambas proteínas están envueltas en este proceso (Kreuzer y Morrical, 1994).

Estudios recientes también con T4 han identificado interacciones de varias proteínas del complejo de síntesis de nucleótidos con el DNA, siendo estas interacciones dependientes de la presencia de una proteína gp32 intacta (Kim *et al.*, 2005b). Una de las proteínas a las que hace referencia este trabajo es la NDP reductasa. Todos estos trabajos apoyan la idea de que la proteína gp32 actuaría reclutando enzimas relacionadas con la síntesis de nucleótidos hacia los sitios donde se está llevando a cabo la replicación.

### 5.2. HIPERESTRUCTURA DE REPLICACIÓN

Con todos estos resultados y adoptando la idea de hiperestructura originalmente propuesta por Norris, Guzmán y colaboradores han aportado evidencias *in vivo* de la existencia de una asociación entre las distintas macromoléculas, estructuras y complejos proteicos que intervienen en la replicación. Estos componentes celulares se unirían de forma temporal y funcional generando una hiperestructura de replicación que estaría ensamblada durante la replicación (Guzmán *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2003). Según esta propuesta, la hiperestructura sería una asociación temporal mediante uniones débiles del complejo de síntesis de nucleótidos, el replisoma, la membrana celular, el DNA y otras enzimas implicadas en la replicación del cromosoma. Esta asociación aseguraría la procesividad requerida para la replicación del cromosoma completo y generarían unas concentraciones óptimas de los cuatro desoxirribonucleótidos mediante una canalización y por tanto compartimentación de los precursores. No existen evidencias directas de la existencia de esta hiperestructura, aunque sí hay pruebas indirectas. Como se ha detallado, resultados de nuestro laboratorio demuestran que la NDP reductasa tiene que estar protegida por algún tipo de hiperestructura que permita un periodo de termorresistencia de unos 50 minutos de la enzima cuando un mutante *nrdA101* (con una NDP reductasa termosensible) es incubado a la temperatura restrictiva (Guzmán *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2003). Molina y Skarstad asumieron la existencia de esta hiperestructura para explicar cómo la organización de la *factoría de replicación* dependía del metabolismo de los nucleótidos (Molina y Skarstad, 2004). Además, recientemente se ha demostrado que la incubación de un mutante *nrdA101* a 42°C provoca una segregación incorrecta de los cromosomas así como filamentación celular y una gran proporción de células anucleadas (J.Riola, tesis doctoral, 2005), sugiriendo una relación entre la NDP reductasa (complejo de síntesis de nucleótidos) y la maquinaria de segregación celular, apoyando la idea de que ambas están formando parte de la hiperestructura de replicación.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio de la progresión de las horquillas de replicación en un mutante *nrdA101* para tratar de establecer una relación entre la alteración de la NDP reductasa y una posible alteración de la procesividad de las horquillas de replicación. Verificar una asociación de este tipo supondría establecer evidencias *in vivo* de la asociación de la NDP reductasa con otros componentes del replisoma y por lo tanto fijar un apoyo más al modelo de la Hiperestructura de Replicación.

## *Introducción*

---

*Materialles*



## 1. ESTIRPES BACTERIANAS

La estirpe bacteriana JS1018 se tomó de este laboratorio. Esta estirpe fue originalmente construida por A. Jiménez Sánchez a partir de la estirpe E1011 del laboratorio de Kornberg. Las derivadas de ésta con mutaciones en enzimas de recombinación se construyeron para este trabajo por transducción generalizada con P1, por conjugación o mediante transformación con plásmidos (Tabla 1). Las estirpes de las que se obtuvieron las mutaciones que se introdujeron en JS1018 fueron tomadas de este laboratorio o enviadas por la Dra. Bénédicte Michel, Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Génétique Microbienne, Jouy en Josas, París.

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

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Origen o construcción</b>
JS1018	<i>nrdA101 thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl su</i>	Este laboratorio
JS627	JS1018 $\Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10}$	Transducción de $\Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10}$ desde JJC275 a JS1018
JS628	JS1018 <i>recB258::Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JS1018
JS704	JS1018 $\Delta\text{ruvABC}::\text{Cm}$	Transducción de $\Delta\text{ruvABC}::\text{Cm}$ desde JJC754 a JS1018
JS705	JS1018 $\Delta\text{ruvABC}::\text{Cm recB258}::\text{Tn10}$	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JS704
JS767	JS1018 <i>recG263::Km</i>	Transducción de <i>recG263::Km</i> desde N3793 a JS1018
JS768	JS1018 <i>recG263::Km recB258::Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JS767
JS769	JS1018 $\Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10 } \Delta\text{recBC}::\text{Ap}$	Conjugación $\Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10 } \Delta\text{recBC}::\text{Ap}$ desde JJC1130 a JS1018
JS815	JS1018 <i>recG263::Km } \Delta\text{ruvABC}::\text{Cm}</i>	Transducción de $\Delta\text{ruvABC}::\text{Cm}$ desde JJC754 a JS767
JS861	JS1018 <i>recG263::Km } \Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10}</i>	Transducción de $\Delta(\text{recA-srl})::\text{Tn10}$ desde JJC275 a JS767

## Materiales

JS862	JS1018 <i>recG263(::Km) ΔruvABC::Cm recB258::Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JS815
JS868	JS1018 / pAM- <i>priA</i> <sup>+</sup>	Transformación de JS1018 con pAM- <i>priA</i> <sup>+</sup> aislado de JJC1398
JS890	JS1018 <i>ΔruvABC::Cm Δ(recA-srl)::Tn10 ΔrecBC::Ap</i>	Conjugación <i>Δ(recA-srl)::Tn10 ΔrecBC::Ap</i> desde JJC1130 a JS704
JS891	JS1018 <i>priA2::Km</i> / pAM- <i>priA</i> <sup>+</sup>	Transducción de <i>priA2::Km</i> desde JJC1398 a JS868
JK607	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5</i>	Transducción de <i>nrdA<sup>+</sup></i> con <i>yfaL::Tn5</i> desde BA604 a JS1018
JK625	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5 Δ(recA-srl)::Tn10</i>	Transducción de <i>Δ(recA-srl)::Tn10</i> desde JJC275 a JK607
JK626	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5 recB258::Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JK607
JK706	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5 ΔruvABC::Cm</i>	Transducción de <i>ΔruvABC::Cm</i> desde JJC754 a JK607
JK707	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5 ΔruvABC::Cm recB258::Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JK706
JK777	JS1018 <i>nrdA<sup>+</sup> yfaL::Tn5 recG265(::Cm)</i>	Transducción de <i>recG265(::Cm)</i> desde N4452 a JK706
JT608	JS1018 <i>Δtus::Km</i>	Transducción de <i>Δtus::Km</i> desde TH805 a JS1018
JT630	JS1018 <i>Δtus::Km recB258:: Tn10</i>	Transducción de <i>recB258::Tn10</i> desde JJC777 a JT608
JJC275	<i>hsdR leuB6 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 Δ(recA-srl)::Tn10</i> / mini F <i>recA</i> <sup>+</sup> Ap	B. Michel
JJC754	<i>hsdR leuB6 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 ΔruvABC::Cm</i>	B. Michel
JJC777	<i>hsdR leuB6 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 recB258:: Tn10</i> / pDWS2 (pBR322 <i>recBCD</i> <sup>+</sup> <i>thyA</i> <sup>+</sup> <i>argA</i> <sup>+</sup> )	B. Michel
JJC1130	<i>Hfr PK191 rpsL ΔrecBC::Ap Δ(recA-srl)::Tn10</i> / pDWS2	B. Michel
JJC1398	<i>hsdR leuB6 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 priA2::Km sfiA11</i> / pAM- <i>priA</i> <sup>+</sup>	B. Michel

BA604	MG1655 <i>yfaL::Tn5</i> ( <i>yfaL</i> = b2233)	Este laboratorio
N3793	<i>thr-1 araC14 leuB6(Am) (gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 qsr'-0 glnV44(AS) galK2(Oc) LAM- Rac-0 hisG4(Oc) rfbD1 mgl-51 rpoS396(Am) rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 recG263(::Km) argE3(Oc) thi-1</i>	CGSC #7552
N4452	<i>thr-1 araC14 leuB6(Am) (gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 qsr'-0 glnV44(AS) galK2(Oc) LAM- Rac-0 hisG4(Oc) rfbD1 mgl-51 rpoS396(Am) rpsL31(strR) kdgK51 xylA5 mtl-1 argE3(Oc) thi-1 recG265(::Cm)</i>	CGSC #7553
TH805	TH423 (MG1655) <i>Δtus::Km rstB fumC</i>	Tom Hill

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

## 2. FAGOS

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

## 3. PLÁSMIDOS

El plásmido pAM-priA empleado en este trabajo fue aislado de la estirpe JJC1398, enviada por la Dra. Bénédicte Michel. Este plásmido, derivado del vector pBR322, se replica a partir de un origen de replicación condicional que sólo está activo en presencia de IPTG (Gil y Bouche, 1991) y además lleva un alelo silvestre del gen *priA*. Como marcador, el plásmido contiene el gen *aadA*, que confiere resistencia a espectinomomicina. El IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosidasa) se preparó en agua estéril a una concentración 50 mM y se utilizó a una concentración final 500 μM.

### 4. PRODUCTOS QUÍMICOS

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.

#### 4.1. ANTIBIÓTICOS

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

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

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

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

**Espectinomomicina (Spc).** Preparada a 50 mg/ml en agua y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

**Rifampicina (Rf).** Preparada a 25 mg/ml en metanol. Se utilizó a 150  $\mu\text{g/ml}$ .

**Cefalexina (Cp).** Preparada a 10 mg/ml en agua. Se utilizó a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

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

#### 4.2. PRODUCTOS RADIATIVOS

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

### 4.3. SOLUCIONES Y TAMPONES

#### 4.3.1. Purificación y aislamiento de DNA plasmídico

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

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

**Solución PEG-NaCl.** PEG 8000 20% (p/v) y NaCl 1 M en tampón TE.

**Solución Tris-sacarosa.** Tris HCl 50 mM (pH 8,0) y sacarosa 25% (p/v) en agua destilada.

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

#### 4.3.2. Medida de la síntesis de DNA in vivo

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

#### 4.3.3. Manipulación in vivo de bacterias y fagos

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

La solución salina M9 se preparó disolviendo 60 g de HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 g de H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, 5 g de NaCl y 10 gr de NH<sub>4</sub>Cl, en este orden, en un volumen final de agua destilada de 1.000 ml. Se ajustó su pH a 7,2 y se esterilizó.

**Tampón MC.** Se preparó mezclando MgSO<sub>4</sub> 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en agua estéril.

## *Materiales*

---

### **4.3.4. Electroforesis de DNA**

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

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

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

### **4.3.5. Electroforesis en campo pulsante**

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

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

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

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

### **4.3.6. Citometría de flujo**

**Solución de fijación de bacterias.** Se empleó etanol al 74%. 400 µl de muestra se fijaron con 7 ml de etanol

**Tampón de tinción.** Tris HCl 10 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Se esterilizó pasando el tampón por filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

**Solución de tinción.** Tris HCl 10mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Bromuro de etidio 40 µg/ml y Mitrmicina 200 µg/ml. La solución se pasó a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

## 5. MEDIOS DE CRECIMIENTO

### 5.1. MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS

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

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

**Medio rico Luria-Bertani (LB).** Se disolvieron 10 g de bacto triptona (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid) y 10 g de NaCl en 1.000 ml de agua destilada, el pH de la solución se ajustó entre 7,2 y 7,4 y se autoclavó. En algunas ocasiones este medio era suplementado con timidina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y con glucosa 0,1% (en este caso se le llamó LBTG).

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

### 5.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA EL FAGO P1

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

## *Materiales*

---

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

### **6. ENZIMAS**

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

**RNasa II-A pancreática.** Se preparó a 2 mg/ml en Tris HCl 10 mM (pH 7,5). Se incubó 10 minutos a 90°C para eliminar las posibles DNAsas. La solución se conservó a -20°C. Suministrada por Sigma Chemical Co.

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

*Métodos*



## **1. CRECIMIENTO DE ESTIRPES**

Al inocular una colonia bacteriana en un medio líquido apto para su crecimiento no todas las células comienzan a estar fisiológicamente activas a la vez. Para lograr que las células de un cultivo alcanzaran la fase de crecimiento óptimo para desarrollar los experimentos, se inocularon 2 ml de medio con una colonia de la estirpe con la que se iba a trabajar. El cultivo se creció durante una noche en un baño de agitación orbital a la temperatura y en el medio apropiado, de forma que se consiguieran cultivos turbios pero no en fase estacionaria avanzada. Los cultivos en fase exponencial se obtuvieron por dilución del cultivo nocturno en medio fresco, en la proporción adecuada para cada tipo de experimento, e incubación con aireación en baños de agitación orbital a la temperatura deseada.

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

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

### **1.1. CRECIMIENTO DE LA ESTIRPE JS891**

La mutación *priA* dificulta el crecimiento bacteriano y los mutantes *priA* adquieren con alta frecuencia mutaciones supresoras que restauran el crecimiento normal de la célula (Sandler *et al.*, 1996). Para prevenir la aparición de estas mutaciones

## Métodos

---

supresoras durante la construcción de la estirpe *nrdA101 priA*, el mutante *priA* se construyó en presencia del plásmido pAM-*priA*, que lleva un alelo silvestre del gen *priA* y que se replica a partir de un origen de replicación condicional que sólo está activo en presencia de IPTG. Este plásmido además porta el gen de resistencia a espectinomicina (Gil y Bouche, 1991). De este modo, el mantenimiento en placa de la estirpe *nrdA101 priA* se realizó añadiendo a los medios empleados IPTG a una concentración final 500  $\mu$ M y espectinomicina a una concentración de 50  $\mu$ g/ml, con lo que se evitaba la aparición de mutaciones supresoras ya que la proteína PriA estaba presente. Para realizar un experimento, se obtuvo un cultivo nocturno con IPTG y espectinomicina a partir de una colonia de la placa que también tenía estos dos compuestos. Este cultivo se diluyó mil veces en medio fresco sin IPTG y sin antibiótico y se creció hasta el día siguiente. A continuación, se realizó una nueva dilución 1:200 en medio fresco sin IPTG ni espectinomicina y este cultivo fue empleado para trabajar. Para comprobar la pérdida del plásmido y asegurar así el fenotipo *priA*- se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l del cultivo nocturno desde el que se había hecho la dilución 1:200 y se sembraron en placas de NAT que se incubaron 48 horas. A las colonias que crecieron se les comprobó la sensibilidad a espectinomicina, asegurando así que en el cultivo con el que se trabajó las células carecían del plásmido y no tenían por tanto la proteína PriA.

## 2. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

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

Para la conservación de las estirpes durante periodos de tiempo de hasta dos semanas y para permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas y purificadas, las estirpes se conservaron en placas Petri con el medio sólido adecuado a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las estirpes que iban a ser utilizadas durante cada etapa del trabajo se obtuvieron por extensión de 10 a 20  $\mu$ l del volumen conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  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. Para impedir que las células alcanzaran un estado estacionario avanzado, con el consiguiente cambio fisiológico, alteración de la viabilidad y tasa de mutación, las estirpes fueron traspasadas a placas con medio fresco cada dos semanas.

### **3. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO**

#### **3.1. MARCAJE DEL DNA *in vivo***

La progresión de la síntesis de DNA se determinó mediante la cuantificación de  $^3\text{H}$ -TdR incorporada en el DNA a diferentes tiempos.

La timidina trifosfato (TTP) es un nucleótido específico de la síntesis de DNA. Las células sintetizan este nucleótido a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) que es transformado en timidina monofosfato (TMP) por la enzima timidilato sintetasa, producto del gen *thyA*. Este monofosfato es fosforilado hasta trifosfato (TTP) para ser utilizado en la síntesis del DNA y su exceso es degradado por la timidilato kinasa (tdk) a timidina (TdR) y por la timidina fosforilasa (tpp) el nucleósido pasa a timina (T). Esta vía de degradación puede ser usada para la síntesis de TMP usando mutantes en el gen *thyA*. Estos mutantes requieren por tanto para su crecimiento timina o timidina, que suministradas radiactivas marcan específicamente el DNA. La adición de la base o del nucleósido a una estirpe silvestre hace que la mayor parte sea degradada. Hay varios fenotipos *thy<sup>-</sup>* que por mutaciones simples o dobles en genes que codifican las enzimas usadas en esta ruta requieren diferentes concentraciones de timina o timidina para su crecimiento. El problema con mutantes *thy<sup>-</sup>* radica en determinar con exactitud la concentración de timina o timidina óptima para que un defecto de esta concentración no limite la velocidad de replicación o su exceso perjudique al crecimiento (Pritchard y Zaritsky, 1970; Molina *et al.*, 1998). La concentración óptima de timidina requerida para el crecimiento de las estirpes utilizadas en este trabajo fue de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Para llevar a cabo el marcaje de un cultivo creciendo en medio líquido, se diluyó un cultivo nocturno en el mismo medio de crecimiento al que se había añadido previamente 5  $\mu\text{g/ml}$  de TdR y 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -TdR. La toma de muestras y todos los tratamientos de estos cultivos comenzaron tras un tiempo de incubación en este medio radiactivo no inferior a tres generaciones.

#### **3.2. MEDIDA DE LA SÍNTESIS DE DNA**

Para cuantificar la incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR en el DNA se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  y se depositaron en tubos que contenían 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% a 0°C. Transcurridos no menos de 30 minutos, para permitir la precipitación del material insoluble en el ácido, el volumen de cada tubo se filtró a través de un filtro

## Métodos

---

Wathman GF/C de fibra de vidrio, de 24 mm de diámetro, previamente humedecido en agua destilada. Los tubos se lavaron con TCA al 5%, se filtró este volumen y finalmente los filtros se lavaron dos veces con agua destilada. Estos filtros se secaron a 100°C y posteriormente se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de la mezcla de centelleo. La medida de la cantidad de  $^3\text{H-TdR}$  incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

### **3.2.1. Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial**

El valor de la cantidad de radiactividad incorporada al DNA en las muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del crecimiento es equivalente a la cantidad de DNA presente en el cultivo. De este modo puede hallarse el tiempo de duplicación de la cantidad de DNA a partir de la acumulación de  $^3\text{H-TdR}$ , que en un cultivo con crecimiento equilibrado debe coincidir con el tiempo de generación,  $\tau$ .

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

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

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

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

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

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

donde x es la distancia relativa al origen.

Por tanto (Sueoka y Yoshikawa, 1965):

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

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

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

#### **4. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO**

Para aislar el DNA plasmídico se obtuvo un cultivo denso a partir de una colonia de la estirpe portadora del plásmido en medio rico LB con timidina y con el antibiótico apropiado a 37°C. Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo en tubos eppendorf a 10.000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el medio por aspiración dejando seco el sedimento bacteriano. Las células se resuspendieron en 300 µl de una solución de Tris-sacarosa (apartado 4.3.1. de Materiales) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 300 µl de una solución de EDTA-Triton-Lisozima (apartado 4.3.1. de Materiales), se invirtió el tubo suavemente varias veces y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, para pasar otros 10 minutos a 70°C. El lisado obtenido se centrifugó a 10.000 rpm 30 minutos. El sedimento con restos celulares se eliminó con un palillo de dientes estéril y se procedió a la concentración

## *Métodos*

---

del DNA de la solución. Para ello se añadió un volumen igual de una solución de PEG-NaCl (apartado 4.3.1. de Materiales) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras los cuales, se centrifugó a 10.000 rpm 3 minutos, eliminando el sobrenadante en su totalidad. Para finalizar, el sedimento se disolvió en 50 µl de TE con RNasa II-A a 40 µg/ml, incubándose 10 minutos a 37°C. La solución final de DNA se conservó a 4°C.

### **5. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE DNA**

#### **5.1. PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE EXTRACCIONES CON FENOL/CLOROFORMO**

Tras el tratamiento de lisados celulares con enzimas proteolíticas la eliminación de las proteínas de una solución de ácidos nucleicos se realizó por el procedimiento de extracción de la solución acuosa con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y posteriormente con cloroformo:alcohol isoamílico para eliminar los residuos de fenol de la preparación. A la solución de ácidos nucleicos se añadió un volumen igual de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; los componentes se mezclaron por agitación mecánica hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0°C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase (un mínimo de dos veces). A la solución acuosa final obtenida se añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezclaron y se separaron las fases por centrifugación y finalmente se recuperó la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos en solución.

#### **5.2. CONCENTRACIÓN DE DNA MEDIANTE PRECIPITACIÓN**

Para concentrar soluciones de DNA se procedió normalmente a su precipitación con etanol o isopropanol. Para ello, a la solución de DNA se añadió acetato sódico (pH 5.2) a una concentración final 0,3 M, se mezcló y se añadió un volumen de isopropanol igual al de la solución o el doble de su volumen de etanol y de nuevo se mezcló bien la solución. Se mantuvo a -80°C de 30 a 60 minutos para facilitar la precipitación y el DNA se recuperó centrifugando a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y eliminando el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% y de nuevo se centrifugó en la

mismas condiciones para recuperar el DNA. Se eliminó el sobrenadante y del sedimento se eliminaron los restos de etanol secándolo al vacío (en un Concentrador Centrivap de LABCONCO, modelo 78100-01). El DNA precipitado y seco se resuspendió en el volumen deseado de TE (apartado 4.3.1 de Materiales).

Otro modo de precipitación usado en este trabajo ha sido mediante polietilenglicol (PEG). A la solución de DNA se añadió un volumen igual de una solución de PEG-NaCl (apartado 4.3.1.de Materiales) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras los cuales se centrifugó a 10.000 rpm por 3 minutos, eliminando el sobrenadante en su totalidad. Seguidamente el sedimento se disolvió en el volumen deseado de TE con RNasa II-A a 40 µg/ml y se incubó 10 minutos a 37°C. La solución final de DNA se conservó a 4°C. Este método es más rápido que la precipitación con etanol o isopropanol, pero si se requiere una extrema pureza del DNA y se ha usado previamente este método de concentración durante el protocolo de aislamiento, es aconsejable eliminar el PEG mediante la extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol o isopropanol.

## **6. ELECTROFORESIS DE DNA**

La identificación de plásmidos se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue de 0,8% (p/v). Las electroforesis se realizaron aplicando una intensidad de corriente constante, para evitar el sobrecalentamiento del tampón de electroforesis, que dependió del grado de resolución que se pretendía obtener. Para la preparación del gel y como tampón de electroforesis se utilizó Tris-acetato 1X (TAE) (apartado 4.3.4. de Materiales). Las electroforesis se realizaron en presencia del colorante fluorescente bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml incorporado en el gel, que, aunque reduce la movilidad del DNA, permite su visualización durante y al final de la electroforesis tras la iluminación del gel con luz ultravioleta de onda corta.

Las muestras cargadas en el gel se mezclaron previamente con solución BBFX1 (apartado 4.3.4. de Materiales). Esta solución confiere color e incrementa la densidad de la muestra facilitándose y asegurándose la entrada en los pocillos del gel. A la vez, debido a que el colorante de esta solución, azul de bromofenol, migra hacia el ánodo en un campo eléctrico y aproximadamente igual que un fragmento de DNA lineal de doble cadena de 300 pares de bases, nos permite inferir el recorrido de las muestras

## *Métodos*

---

durante la electroforesis. Por último, las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

### **7. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA MEDIANTE DENSITOMETRÍA DE GELES**

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

### **8. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE**

La electroforesis en campo pulsante es una técnica que permite resolver fragmentos de DNA de distintos tamaños. La electroforesis convencional no permite la resolución de fragmentos de DNA mayores a 20.000 pares de bases. Pero alternando el campo eléctrico entre distintos pares de electrodos orientados espacialmente de forma diferente, fragmentos de DNA del orden de hasta 10 megabases son capaces de reorientarse y moverse de forma diferente según su tamaño a través de los poros de un gel de azarosa.

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

Todos los experimentos llevados a cabo para determinar las roturas cromosómicas de distintas estirpes y en diferentes condiciones se realizaron en medio mínimo M9 con casaaminoácidos (apartado 5.1. de Materiales) suplementado con 5 o con 2 µg/ml de TdR. Para marcar específicamente el DNA y poder cuantificar las roturas cromosómicas se añadió al medio de cultivo 5 µCi/ml de <sup>3</sup>H-TdR.

### **8.1. PREPARACIÓN DE BLOQUES DE DNA**

Cultivos nocturnos de las células a analizar se diluyeron en medio fresco que contenían 2 ó 5 µg/ml de TdR y 5 µCi/ml de <sup>3</sup>H-TdR. Cuando el cultivo alcanzó 0,1 unidades de densidad óptica para los análisis en crecimiento exponencial o tras aplicar el tratamiento deseado una vez alcanzada esta densidad, 1 ml de células se centrifugó a 3.500 rpm y se lavó con 1,5 ml de tampón TM9 (apartado 4.3.3. de Materiales). El sedimento se resuspendió en 100 µl de TEE (apartado 4.3.5. de Materiales) y se mantuvo 10 minutos a 37°C. Estos 100µl de células se mezclaron con 100 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en TEE, previamente fundida se mantenida a 56°C, y de la mezcla se prepararon dos bloques vertiendo la suspensión en moldes adecuados. Tras solidificar, los bloques fueron desmoldados en 2 ml de una solución con 5 mg/ml de lisozima y sarcosyl al 0,05% en TEE (apartado 4.3.5. de Materiales) e incubados con agitación suave a 37°C durante dos horas. A continuación se retiró la solución de sarcosyl-lisozima, se añadió la solución de lisis (apartado 4.3.5. de Materiales) y se incubaron los bloques de células a 56°C con agitación suave toda la noche.

### **8.2. ELECTROFORESIS Y PROCESAMIENTO DEL GEL**

Cada bloque de DNA se cargó en un pocillo de un gel de agarosa al 1% en TAE y todos los pocillos se sellaron con agarosa al 1%. La electroforesis empleada fue suministrada por BioRad, modelo *CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis System*, y las condiciones de migración fueron: 500 segundos de tiempo inicial, 500 segundos de tiempo final, 3 voltios/cm y un ángulo comprendido de 106°. La migración se mantuvo durante 48 horas. El tampón de migración empleado fue TAE y éste se hacía pasar por un refrigerador a 7°C para mantener una baja temperatura durante las 48 horas de migración.

Una vez finalizada la migración, se tiñó el gel con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en TAE para comprobar que el desplazamiento del DNA había sido correcto. A continuación cada calle del gel se cortó en fragmentos de 3 mm de anchura y se

## Métodos

---

fundieron los fragmentos con 800 µl de HCl 0,1 N a 100°C. El volumen correspondiente a cada porción del gel se colocó en un vial con 10 ml de líquido de centelleo para geles (apartado 4.3.5. de Materiales) y se midió la cantidad de radiactividad con un contador de centelleo Beckman LS 3801.

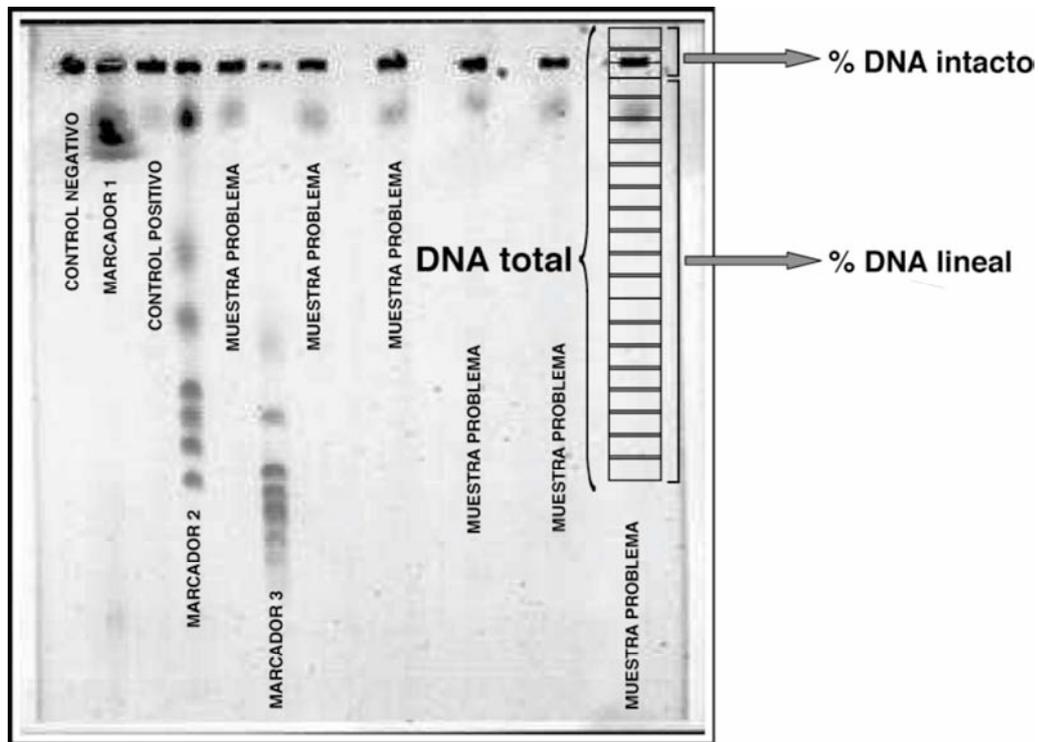
Los valores de radiactividad de los tres primeros fragmentos de cada calle que corresponden al pocillo del gel, al bloque de células y a los 3mm de gel superiores e inferiores al pocillo, hacen referencia a la cantidad de DNA no fragmentado (Fig. 10). La suma de los valores de radiactividad del resto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

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

## 9. ELECTROPORACIÓN

La eficiencia en la introducción del DNA plasmídico dentro de una bacteria es un fenómeno de gran importancia práctica en Biología Molecular. La electroporación provee un método de transformación en *E. coli* con una eficiencia de 10 a 20 veces más alta que la obtenida con los mejores métodos químicos (Dower *et al.*, 1988).

A partir de una dilución aproximada de 1:100 de un cultivo nocturno en LBTG (LB suplementado con timidina y glucosa como se detalla en el apartado 5.1. de materiales) de la estirpe a transformar, se obtuvo un cultivo entre 0,5 y 0,8 unidades de absorbancia creciéndolo con agitación vigorosa. En este momento, se incubó el cultivo a 0°C durante 20 minutos y a continuación se recogieron las células centrifugando a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de agua milliQ a 0°C que del cultivo tomado inicialmente y volvieron a centrifugarse para concentrarlas en la mitad del volumen de agua milliQ a 0°C. Se centrifugaron de nuevo y ahora el sedimento se concentró en 1/50 del volumen del cultivo inicial en glicerol al 10% en agua milliQ a 0°C. Las células volvieron a recogerse por centrifugación y se resuspendieron en un volumen final 1/3 del anterior de la misma solución (la concentración celular debería ser de  $1-3 \times 10^{10}$  células/ml).



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

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

La mezcla de células y DNA se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación de 0,2 cm de Bio-Rad a 0°C, que se colocó en la cámara de electroporación, sometiéndose la suspensión celular a un pulso constante de 4 a 5 milisegundos con una fuerza de 12,5 KV/cm, usando el electroporador de Bio-Rad a 25

## *Métodos*

---

$\mu\text{F}$ , 2,5 KV y 200  $\Omega$ . Posteriormente, se sacó la cubeta de la cámara y se añadió inmediatamente 1 ml de LB TG, se resuspendieron las células con la ayuda de una micropipeta y se transfirieron a un tubo de cristal estéril para su incubación a 30°C durante 2 horas, con suave agitación, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico adquirida por las células transformadas. Finalmente, la selección de los transformantes se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo e incubándolas 48 horas a 30°C.

### **10. TRANSDUCCIÓN**

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

#### **10.1. MULTIPLICACIÓN DE FAGOS**

De un cultivo con una densidad óptica de 0,8 de la estirpe donadora en medio rico LB con glucosa al 0,1% y 5  $\mu\text{g/ml}$  de TdR (LB TG) que contenía  $\text{CaCl}_2$  2,5mM y  $\text{MgSO}_4$  100mM se tomaron alícuotas de 0,1 ml del cultivo y se infectaron con 10 $\mu\text{l}$  de una suspensión de fagos ( $10^9$  fagos/ml). Tras un periodo de 15 minutos de preadsorción a 37°C se adicionaron 3 ml de agar de cobertera precalentado a 45°C y se vertieron en una placa de medio rico LA10 (apartado 5.2. de Materiales) con glucosa al 0,1%, 5  $\mu\text{g/ml}$  de TdR y  $\text{CaCl}_2$  5mM. Después se incubaron de 20 a 24 horas a la temperatura de crecimiento de la estirpe donadora, se recogió el agar de cobertera, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm., se recuperó el sobrenadante y se conservó a 4°C con unas gotas de cloroformo.

Para el recuento del número de fagos se realizó una dilución seriada de una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  en LB TG hasta obtener una suspensión de 1000 a 2000 fagos/ml. A partir de ella se tomó una alícuota de 0,1ml que se añadió a un tubo que contenía 250  $\mu\text{l}$  de un cultivo de la estirpe receptora crecida a la temperatura de crecimiento de la bacteria en LB TG al que se le añadía  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM y  $\text{MgSO}_4$  100 mM antes de la

infección con el fago. Finalmente y tras 15 minutos de incubación a 37°C, la mezcla se sembró con agar de cobertera en placas de LA10 con glucosa al 0,1%, 5 µg/ml de TdR y CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Una vez incubadas de 20 a 24 horas a la temperatura apropiada se procedió al conteo de las calvas.

### **10.2. TRANSDUCCIÓN**

Se obtuvo un cultivo estacionario fresco (densidad óptica de 0,8) de la estirpe receptora en medio rico LBTG al que se le añadió CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y MgSO<sub>4</sub> 1 mM antes de la infección con el fago. Alícuotas de 900 µl de esta suspensión se infectaron con los fagos obtenidos a partir de la estirpe donadora con una multiplicidad de infección de 0,1. Transcurridos 30 minutos de preadsorción a la temperatura de crecimiento de la estirpe receptora, las infecciones se interrumpieron por la adición de 5 ml de LBTG con citrato sódico 5 mM. Tras incubar las bacterias una hora y media con agitación y a la temperatura apropiada, se centrifugaron a 10.000 rpm. durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 µl de MgCl<sub>2</sub> 0,01 M y se sembraron en placas selectivas de NAT, a las que se le habían añadido los antibióticos requeridos en cada caso, y se incubaron a la temperatura adecuada durante al menos 24 horas para seleccionar los transductantes que contenían la construcción deseada.

### **10.3. COMPROBACIÓN DE LOS TRANSDUCTANTES**

Los transductantes obtenidos se verificaron en los siguientes puntos:

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

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

## Métodos

---

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

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

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

### **10.3.3. Comprobación de la sensibilidad a la irradiación con ultravioleta**

La exposición de *E.coli* a agentes que dañan el DNA conduce a la inducción de una serie de respuestas fisiológicas conocidas como respuestas SOS que se deben a la inducción de una veintena de genes. El mecanismo básico del sistema SOS se lleva a cabo mediante la expresión de estos genes controlada por un complejo circuito que implica, entre otras, a la proteína RecA.

La irradiación con UV desencadena en *E.coli* la respuesta SOS para reparar los daños que se producen en el DNA por la irradiación y provoca lesiones que desembocan en cortes de cadena doble en el DNA y que requieren la acción exonucleasa de RecBCD para su reparación por recombinación con una copia homóloga en el cromosoma.

Por todo esto, los mutantes en enzimas de recombinación son más sensibles a la irradiación con luz UV. Para hacer esta comprobación se tomaron células de colonias aisladas de los transductantes y con un palillo estéril se hicieron rayas en placas de medio rico. Media placa se irradió con luz UV con una intensidad de 25 J/m<sup>2</sup> y una vez irradiadas las placas se incubaron a 30°C. Se comprobó así que las estirpes *recA* eran muy sensibles a la irradiación ya que en la mitad de la placa irradiada no había crecimiento. Las colonias *recB* eran también sensibles, pero algo menos que las *recA*, ya que en la mitad de la placa irradiada crecían algunas colonias aisladas. Las estirpes *recG* o *ruvABC* también presentaban cierta sensibilidad a la irradiación con luz UV y esta sensibilidad aumentaba si ambas mutaciones estaban presentes. Además, se observó que

esta sensibilidad era mayor cuando la estirpe, además de las mutaciones en recombinación llevaba el alelo *nrdA101*.

Las bacterias deficientes en las enzimas de recombinación RecA y RecB presentan problemas para su utilización como donadoras en la obtención de fagos. Por eso, en las estirpes donadoras de estas mutaciones (JJC275 y JJC777) la ausencia de RecA o RecB está complementada por la presencia de los plásmidos mini F *recA<sup>+</sup> amp<sup>R</sup>* y pDWS2 (pBR322 *recBCD<sup>+</sup>*) respectivamente. Además, para que las partículas transductantes se integren en el genoma es necesario que se de un proceso de recombinación. Por ello la construcción de mutantes múltiples que carecían de RecA o RecB se realizó de tal manera que la última mutación introducida era la que confería un fenotipo *recA* o *recB*.

## 11. CONJUGACIÓN

La conjugación es el proceso por el que, a través de un contacto físico, una molécula de DNA es transferida de una célula donadora a otra receptora. Este método para transferir mutaciones de una estirpe a otra fue empleado cuando la estirpe a construir tenía que presentar un fenotipo *recA recB*. Ambas mutaciones eran introducidas a la vez mediante un proceso de conjugación en lugar de mediante transducción generalizada con P1 ya que esta era la única forma de lograr que RecA y RecB estuviesen presentes en la célula receptora para llevar a cabo la recombinación necesaria para que las mutaciones *recA* y *recB* se insertasen en el genoma. Una vez producida la recombinación con el DNA de la célula donadora, la estirpe receptora adquiriría el genotipo *recA recB*.

Para llevar a cabo la conjugación, a partir de una dilución aproximada de cien veces de un cultivo nocturno en LB TG se consiguieron cultivos de 0,5 unidades de absorbencia de la estirpe receptora y de la estirpe donadora Hfr. Se mezclaron 0,9 ml de la primera y 0,1 ml de la segunda y se incubaron a 37°C durante 20 minutos y con agitación muy suave. Tras la incubación, se interrumpió la conjugación vorteadando la mezcla durante un minuto y se mantuvo en hielo. Por último, se hicieron diluciones de la mezcla y se sembraron en placas selectivas de NAT. A los conjugantes obtenidos se les realizaron las mismas comprobaciones que a los transductantes, como se detalla en el apartado anterior.

### **12. ANÁLISIS DE VIABILIDAD POR MEDIDA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (cfu)**

Para determinar la viabilidad de una estirpe se sembró por agotamiento dicha estirpe en una placa de NAT a partir de una colonia existente en la placa que se tenía al uso. Como todas las estirpes analizadas eran termosensibles, la placa de NAT se incubó a 30°C durante 48 horas.

Para determinar la viabilidad de una estirpe se recogió una colonia entera de dicha estirpe de una placa de NAT donde se habían sembrado por agotamiento e incubado a 30°C durante 48 horas las bacterias. Para asegurarnos de que tomábamos la colonia entera, se cortó el agar de la placa con una espátula. La colonia se resuspendió en un tubo con 1ml de tampón TM9 y se incubó 1 hora con agitación a 30°C para homogeneizar el medio. Tras la incubación se hicieron diluciones de la suspensión en tampón TM9 y se sembraron estas diluciones en placas de NAT que se incubaron a la temperatura adecuada (30°C ó 37°C, dependiendo de lo que se quisiera analizar). Las colonias que crecieron fueron contadas y estos valores se hicieron relativos a los obtenidos con la estirpe o con la condición con la que se quería comparar.

Cuando estos experimentos se realizaron con la estirpe JS891 (*nrdA101 priA* con el plásmido pAM-*priA*), aunque la placa de conservación de la estirpe contenía IPTG 500 µM y espectinomicina 50 µg/ml para el mantenimiento del plásmido, esta estirpe también se sembró por agotamiento en una placa de NAT sin IPTG ni antibiótico para forzar la pérdida del plásmido y por tanto la expresión del fenotipo *priA*. De esta placa se tomaron las colonias para trabajar y una vez analizada la viabilidad como se detalla anteriormente, se comprobó la pérdida del plásmido de las colonias que crecieron tras sembrar las diluciones analizando la sensibilidad a espectinomicina de estas colonias, asegurando así que en dichas colonias las células carecían del plásmido y no tenían por tanto la proteína PriA.

### **13. CITOMETRÍA DE FLUJO**

#### **13.1. FUNDAMENTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo permite medir la fluorescencia y la dispersión de luz de células individuales en gran número. Así utilizando un fluorocromo que se una con gran

afinidad por determinado constituyente celular puede cuantificarse éste. Por otro lado la dispersión de luz permite obtener información relativa al tamaño y la forma de las células (Boye *et al.*, 1983; Steen, 1980; Steen and Boye, 1981).

En el citómetro de flujo las células son transportadas por un flujo laminar de agua a través de un flujo de luz de longitud de onda próxima al espectro de absorción del colorante empleado. Tanto la emisión del fluorocromo como la luz dispersada son enviadas por medio de un sistema de lentes a fotomultiplicadores que transforman los pulsos de luz en impulsos eléctricos que finalmente son procesados por un ordenador (Sahapiro, 1995).

Aunque fue concebida para realizar estudios con microorganismos, la citometría de flujo ha sido empleada fundamentalmente para estudiar células de mamíferos. Esto ha venido condicionado por dos factores: el diseño de los citómetros disponibles y el tamaño de las células bacterianas. Por eso, siendo el volumen y por tanto las cantidades de macromoléculas en el citoplasma de una bacteria tres órdenes de magnitud inferior al de una célula de mamífero, no ha sido factible emplear la citometría de flujo para estudiar el ciclo celular bacteriano hasta que se han desarrollado instrumentos con mayor sensibilidad.

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

### **13.2. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

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

En cultivos bacterianos los parámetros del ciclo sufren modificaciones cuando se alcanza el tramo final de la fase exponencial. Por eso para minimizar la variabilidad entre distintos experimentos, se recogieron siempre las muestras a 0,1 unidades de densidad óptica, o cuatro horas después de añadir al cultivo rifampicina (150 µg/ml) y cefalexina (50 µg/ml) una vez alcanzada esta densidad. Estas drogas inhiben la síntesis de RNA y por tanto el inicio de la replicación y la división celular respectivamente. De este modo, las bacterias completan las replications que tienen en marcha en el momento del comienzo del tratamiento y no se dividen. El número de cromosomas

## Métodos

---

replicados por célula dependerá así de los ciclos de replicación que estén iniciados en el momento del cambio.

Asimismo se aseguró que tras la inoculación transcurrieran un mínimo de diez generaciones de crecimiento exponencial antes de que el cultivo fuese sometido a tratamiento o fijado para su posterior análisis.

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

### 13.2.2. Tinción

Para la tinción de las células fijadas se empleó una combinación de mitramicina y bromuro de etidio. (apartado 4.3.6. de Materiales). La mitramicina se une al DNA de modo específico mientras que el bromuro de etidio se une indistintamente al DNA y al RNA. Sin embargo, la tinción con mitramicina no permite obtener una señal detectable por el citómetro de flujo. Debido al solapamiento de los espectros de emisión de la mitramicina y de absorción del bromuro de etidio y a que a la longitud de onda de excitación empleada la absorción del bromuro de etidio es prácticamente nula, puede cuantificarse exclusivamente la cantidad de DNA por célula siendo despreciable la fluorescencia correspondiente al bromuro de etidio unido al RNA, ya que la emisión del bromuro de etidio se debe a la excitación de éste por la emisión de la mitramicina.

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

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

**13.2.3. Análisis de las muestras**

Para calibrar el instrumento se utilizaron esferas fluorescentes de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro suministradas por BioRad, que sirvieron para disponer los objetivos y el embudo de inyección de la muestra de modo que el coeficiente de variación fuese inferior a 1,5 y el valor medio de la señal correspondiente a las esferas alcanzara el canal 100 (siendo el intervalo de intensidad de 8 bits; es decir, la intensidad máxima corresponde al canal 256).

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

## *Métodos*

---

# *Resultados*



- **APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL**

En este trabajo se ha analizado la progresión de las horquillas de replicación de un mutante *nrdA101* en condiciones de crecimiento permisivas (30°C) y bajo condiciones restrictivas (42°C). La aproximación experimental utilizada está basada en la asociación extensamente documentada entre la generación de cortes de DNA de doble cadena (DSBs) y la presencia de horquillas de replicación paradas. Cuando la replicación se detiene, la horquilla de replicación parada es un punto susceptible de generar DSBs como paso previo a la reanudación de la replicación (Bidnenko *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Kuzminov, 1995; Michel, 2000; Michel *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005).

La progresión de la horquilla de replicación puede ser alterada por diferentes causas: esta alteración puede ser debida a que el replisoma se encuentre con una interrupción o hueco en la cadena molde que está copiando (*colapso*), también puede deberse a la presencia de impedimentos físicos o topológicos en el avance del replisoma o a un deterioro de la procesividad del replisoma debido a una alteración de alguno de sus componentes. En todas estas situaciones se producen horquillas de replicación paradas que deben ser reanudadas para mantener la viabilidad de la célula.

El proceso de reanudación puede comenzar (i) por la aparición de cortes en el DNA originados por un *colapso* o por la acción de una endonucleasa que reconozca estructuras en forma de horquilla en el DNA (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Michel, 2000; Zheng *et al.*, 2005), o bien (ii) la horquilla puede sufrir una reversión (como se ha descrito en la introducción), originando un intermediario de Holliday que puede ser resuelto por distintas vías por las que puede o no concluir en una rotura del cromosoma. Cuando en la célula no está presente RecBCD para iniciar la principal vía de procesamiento de estas horquillas, el intermediario de Holliday que se origina tras la reversión es resuelto por RuvABC. En este caso, los DSBs se producen en ausencia de la actividad exonucleasa de RecBCD y son dependientes de la actividad endonucleasa de RuvABC (Fig. 6) (Seigneur *et al.*, 1998).

Basándonos en lo expuesto, se puede establecer que la aparición de DSBs dependientes de la actividad endonucleasa de RuvABC en células carentes de actividad exonucleasa RecBCD es debida a la resolución de un intermediario de Holliday que se formó tras la reversión de una horquilla de replicación parada. Esto implica que los cortes dependientes de RuvABC que se detectan en un mutante sin la proteína RecB son debidos al procesamiento de las horquillas de replicación paradas. El grupo de Bénédicte Michel ha revisado la generación de reversiones de las horquillas de

## Resultados

---

replicación en varios mutantes de replicación que tenían por tanto afectada la progresión de las horquillas de replicación, como sucede en mutantes *rep*, *dnaB* (Michel *et al.*, 1997; Seigneur *et al.*, 1998), *hold* (Flores *et al.*, 2001) o *dnaN* a 37°C (Grompone *et al.*, 2002), y en todos los casos se produce un aumento de DSBs dependientes de RuvABC en un fondo genético *recB*. En estos casos, el aumento de DSBs indica un aumento de horquillas paradas que han sufrido reversión. Así, este aumento está inversamente correlacionado con la procesividad de las horquillas de replicación afectadas en estos mutantes. De una forma resumida, se establece que “DSBs dependientes de RuvABC = Horquilla de Replicación Parada que ha sufrido una reversión”

Siguiendo este razonamiento, en este trabajo se han cuantificado los DSBs en una estirpe *nrdA101 recB* bajo distintas condiciones de crecimiento y se ha analizado si estos cortes eran dependientes de RuvABC. Estos análisis se hicieron empleando la electroforesis en campo pulsante (PFGE) como se detalla en el apartado 8 de *Métodos*. Células marcadas con <sup>3</sup>H-TdR fueron fijadas en bloques de agarosa para evitar en lo posible cortes del cromosoma debidos a la manipulación. Una vez fijadas se procedió a la lisis celular y tras esta lisis, los bloques de agarosa con las células se cargaron en los pocillos del gel. Tras la migración del DNA debida al campo eléctrico se cortó cada calle del gel en porciones que posteriormente fueron fundidas. Finalmente, se cuantificó la radiactividad presente en cada porción. En estas condiciones experimentales, sólo el DNA lineal penetra en el gel, mientras que el cromosoma circular intacto no sale del pocillo. De este modo, la cantidad (porcentaje) de DNA lineal formado *in vivo* se puede estimar midiendo la proporción de DNA que penetra en el gel (Michel *et al.*, 1997) ya que al estar las células inmovilizadas, los cortes presentes en el DNA se van a deber fundamentalmente a procesos fisiológicos de las células y no a la manipulación de las mismas.

## Capítulo 1

### **Análisis de la progresión de las horquillas de replicación en un mutante *nrdA101* creciendo exponencialmente a 30°C.**

#### **Resumen:**

En este capítulo se analizó la progresión de las horquillas de replicación de un mutante *nrdA101 recB* en condiciones de crecimiento exponencial a 30°C. Se observa un aumento de DSBs dependientes de RuvABC con respecto a su estirpe isogénica silvestre para el alelo *nrdA*. Esto indica un aumento de horquillas de replicación paradas cuya reanudación procede por *RFR*. El aumento de horquillas paradas no está relacionado con una posible actividad parcial a temperatura permisiva de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101*.

Estos resultados sugieren que el aumento de paradas en las horquillas de replicación en un mutante *nrdA101* podría ser causado por la disminución de la procesividad de la maquinaria de replicación en presencia de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101*.

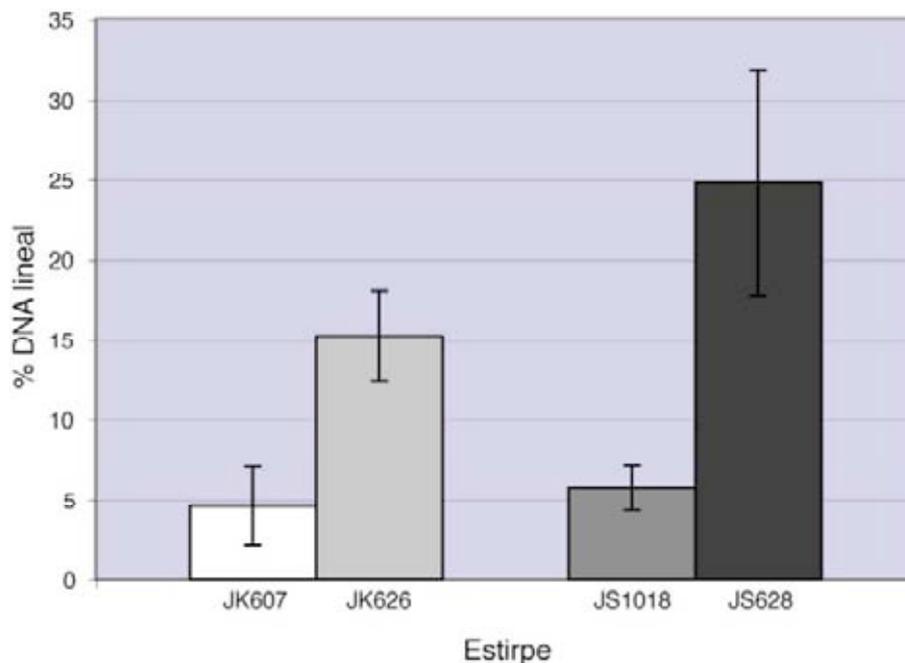
## *Resultados*

---

### 1.1. UNA ESTIRPE *nrdA101* CRECIENDO A 30°C AUMENTA LOS DSBs

Para determinar si la presencia del alelo *nrdA101* provoca paradas adicionales de las horquillas de replicación creciendo a temperatura permisiva, se midió la cantidad de DNA lineal cuantificando los DSBs en JS628 (*nrdA101 recB*) y en su estirpe isogénica JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*).

Los resultados de la figura 11 muestran que la cantidad de DNA lineal en JS628 es un 69 por ciento mayor que en la estirpe silvestre para la NDP reductasa, indicando que la presencia de este alelo causa un aumento significativo de DNA lineal a 30°C ( $p=7,7 \times 10^{-7}$ ). Además, los cortes en el cromosoma sólo se originan en ausencia de la actividad exonucleasa del complejo RecBCD (comparar JK607 con JK626 y JS1018 con JS628). Esto indica que si la principal vía de procesamiento de colas de DNA de doble cadena en la célula está activa, estos cortes no aparecen.



**Fig. 11.** DNA lineal de JK607, JK626, JS1018 y JS626 creciendo exponencialmente a 30°C. Representación en diagrama de barras del porcentaje de DNA lineal cuantificado en las estirpes JK607 (*nrdA<sup>+</sup>*) en blanco, JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) en gris claro, JS1018 (*nrdA101*) en gris oscuro y JS626 (*nrdA101 recB*) en negro creciendo exponencialmente a 30°C

## Resultados

### 1.2. LOS DSBs EN UNA ESTIRPE *nrdA101* SON DEPENDIENTES DE *RuvABC*

Como ya se ha señalado, la linearización de los cromosomas tras el bloqueo de la replicación puede deberse a diferentes causas. Resultados de los últimos años parecen indicar que cuando la parada de la horquilla se debe a alteraciones en la maquinaria de replicación se produce una reversión de esta horquilla parada para su posterior reanudación. Este proceso se caracteriza por la necesidad de la actividad del complejo RuvABC para que se produzcan los cortes del cromosoma en estirpes sin actividad exonucleasa RecBCD, es decir, en estirpes *recB*.

Para determinar si los cortes observados en la estirpe *nrdA101 recB* eran dependientes de la acción del complejo RuvABC en ausencia de actividad RecBCD, se midieron los niveles de DSBs en JS705 (*nrdA101 recB ruvABC*) y en JK707 (*nrdA<sup>+</sup> recB ruvABC*). Como se muestra en la tabla 2, cuando los DSBs se estimaban en fondos genéticos *recB ruvABC*, los niveles de DNA lineal disminuían drásticamente respecto al porcentaje de DNA lineal presente en JS628 ( $p=1,7 \times 10^{-13}$ ). y JK626 ( $p=3,3 \times 10^{-4}$ ) respectivamente.

**Tabla 2.** Porcentaje de DNA lineal obtenido durante el crecimiento exponencial a 30°C.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>% DNA lineal a 30°C</b>	<b>n</b>
JK607	<i>nrdA<sup>+</sup></i>	4,58 ± 2,5	5
JK626	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10</i>	15,18 ± 2,8	16
JK707	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	6,74 ± 2,6	5
JS1018	<i>nrdA101</i>	5,72 ± 1,4	4
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	24,79 ± 6,8	25
JS705	<i>nrdA101 recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	5,94 ± 2,4	11

*n* es el número de repeticiones

Como RuvABC es una resolvasa específica de intermediarios de Holliday y está actuando en horquillas de replicación paradas (Seigneur *et al.*, 1998), estos resultados indican que a temperatura permisiva, el mutante *nrdA101* tiene un número de horquillas de replicación paradas mayor que la estirpe *nrdA<sup>+</sup>* y que en estas horquillas paradas se está produciendo una reversión. Se genera así un intermediario de Holliday que es resuelto por la acción de RuvABC, ya que en ausencia de esta resolvasa, aunque se produzcan reversiones, los intermediarios de Holliday no son resueltos y no hay cortes cromosómicos. Es decir, la acción de RuvABC en el intermediario de recombinación que se origina tras la reversión es impedida en presencia de RecBCD, debido posiblemente a que RecBCD actúa en la cola de DNA de doble cadena antes de que RuvABC catalice la resolución del intermediario de Holliday (Flores *et al.*, 2001; Seigneur *et al.*, 1998).

### **1.3. EL AUMENTO DE DSBs EN LA ESTIRPE *nrdA101* NO ESTÁ RELACIONADO CON UN MENOR SUMINISTRO DE NUCLEÓTIDOS**

Resultados previos de este laboratorio han demostrado que la mutación *nrdA101* provoca un enlentecimiento de la replicación; el periodo *C* de JS1018 (*nrdA101*) creciendo a 30°C es de 157 minutos mientras que el periodo *C* de su estirpe isogénica JK607 (*nrdA<sup>+</sup>*) es de 98 minutos. Estos resultados podrían indicar que hay una menor disponibilidad de nucleótidos (dNTP) en el mutante provocada por una actividad parcial de la enzima mutada a 30°C, lo que podría desembocar en una frecuencia mayor de horquillas paradas y esto en un aumento de los DSBs.

Para comprobar si un menor aporte de dNTP inducía un aumento de las paradas en la progresión de las horquillas de replicación se midieron los DSBs en la estirpe silvestre creciendo con una concentración limitante de timidina (TdR), para simular una menor disponibilidad de nucleótidos debida a una actividad parcial de la NDP reductasa a 30°C. Este planteamiento se basó en el hecho de que en estirpes mutantes en el gen *thyA* el uso de una concentración de timidina inferior a la requerida disminuye la velocidad de la replicación (aumenta *C*) sin afectar a la velocidad de crecimiento (Pritchard y Zaritsky, 1970). La concentración óptima de timidina para el crecimiento de una estirpe es la menor concentración que permite el crecimiento con un *C* mínimo (Molina *et al.*, 1998).

## Resultados

Para la estirpe JK607 la concentración óptima de timidina fué de 5 µg/ml con la que su periodo C corresponde a 98 min y la subóptima fué de 2 µg/ml con la que su periodo C es de 151 min (Tabla 3). En estas condiciones de crecimiento se cuantificaron los DSBs en JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) y en JK707 (*nrdA<sup>+</sup> recB ruvABC*) para determinar, primero, si existían diferencias en estos cortes y, segundo, para comprobar si los cortes eran dependientes de RuvABC, esto es, si se producían tras una reversión de las horquillas de replicación paradas.

**Tabla 3.** Periodo C en función de la concentración de timidina en el medio de cultivo.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>Concentración de timidina</b>	<b>Periodo C (min)</b>
JK607	<i>nrdA<sup>+</sup></i>	5µg/ml	98
JK607	<i>nrdA<sup>+</sup></i>	2µg/ml	151
JS1018	<i>nrdA101</i>	5µg/ml	157

La tabla 4 muestra unos valores similares de DSBs ( $p=0,30$ ) en la estirpe JK626 (*nrdA<sup>+</sup> recB*) independientemente de la concentración de timidina del medio, esto es, independientemente del aporte de dNTP.

**Tabla 4.** Porcentaje de DNA lineal en función de la concentración de timidina.

<b>Concentración de timidina</b>	<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>% DNA lineal a 30°C</b>	<b>n</b>
5µg TdR	JK626	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10</i>	15,18 ± 2,8	16
	JK707	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	6,74 ± 2,6	5
2µgTdR	JK626	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10</i>	17,31 ± 5,8	3
	JK707	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	1,75 ± 0,3	2

*n* es el número de repeticiones

Como en ambos casos los cortes son dependientes de RuvABC (comparar JK626 con JK707 en las dos condiciones de crecimiento), estos resultados indican que el aumento del periodo C de 98 (*nrdA*<sup>+</sup> con 5µg/ml TdR) hasta 151 minutos (*nrdA*<sup>+</sup> con 2µg/ml TdR) por la bajada de nucleótidos no aumenta los cortes de DNA de doble cadena, mientras que el aumento del periodo C de 98 (*nrdA*<sup>+</sup> con 5µg/ml TdR) a 157 minutos (*nrdA101* con 5µg/ml TdR) por la presencia de una NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* aumenta los cortes un 69 por ciento respecto a los cortes de una estirpe con la enzima silvestre (Tabla 2). Esto sugiere que la baja disponibilidad de dNTP debida a una actividad parcial de la NDP reductasa no parece ser la causa del aumento de las horquillas paradas observada en el mutante *nrdA101* a temperatura permisiva.

Para explicar los resultados obtenidos en este capítulo proponemos que la presencia de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* a 30°C alteraría la progresión de la horquilla de replicación disminuyendo la procesividad del replisoma. Esto sugiere la asociación de la NDP reductasa con otras proteínas presentes en la maquinaria de replicación, apoyando el modelo propuesto por Guzmán et al. (Guzman et al., 2002). En este contexto, una NDP alterada por la mutación *nrdA101* generaría una hiperestructura de replicación más lábil y consecuentemente una replicación con mayor número de paradas.

## *Resultados*

---

## Capítulo 2

### **Análisis del RFR (reversiones de las horquillas de replicación) en un mutante *nrdA101* a 30°C**

#### **Resumen:**

En este capítulo se analizó la implicación de las proteínas RecA y RecG en el RFR observado en el mutante *nrdA101*. En ausencia de RecG los DSBs no se deben a la acción de RuvABC, luego en la estirpe *nrdA101 recG* no se originan intermediarios de Holiday tras la parada de la replicación. En ausencia de la proteína RecA los DSBs siguen siendo dependientes de RuvABC, por lo que RecA no parece estar implicada en el RFR que conlleva la formación de intermediarios de Holiday.

## *Resultados*

---

## **2.1. LA REVERSIÓN DE LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN EN UN MUTANTE *nrdA101* ES DEPENDIENTE DE *RecG* E INDEPENDIENTE DE *RecA***

Aunque el conocimiento de los mecanismos por los que se procesa una horquilla de replicación que ha sufrido una reversión es extenso, todavía no está claro qué actividad enzimática lleva a cabo dicha reversión. La formación de un intermediario de Holliday mediante la reversión de una horquilla puede ser catalizada por diferentes vías dependiendo de la naturaleza de la causa que provoca la parada de la replicación. Al menos dos proteínas pueden promover activamente la reversión, *RecA* y *RecG* (McGlynn y Lloyd, 2002; Robu *et al.*, 2001, 2004). Se ha visto que la reversión de la horquilla depende de *RecA* cuando la replicación se detiene por la inactivación de la *DnaB* helicasa (Seigneur *et al.*, 2000), pero esto no ocurre si la replicación se detiene por ausencia de la helicasa *Rep* (helicasa no esencial para la replicación) o en mutantes *hold* (deficientes en el cargador de la abrazadera  $\beta$  de la polimerasa) (Michel *et al.*, 2004). Por otro lado, la helicasa *RecG* también puede catalizar la reversión de una horquilla parada *in vitro* (McGlynn *et al.*, 2001; McGlynn y Lloyd, 2002), aunque *in vivo* esta actividad de *RecG* aún no se ha observado.

Para analizar si *RecA* o *RecG* estaban implicadas en la reversión de las horquillas paradas en un mutante *nrdA101* creciendo a 30°C se midieron los cortes de doble cadena de las estirpes JS769 (*nrdA101 recA recB*) y JS768 (*nrdA101 recG recB*). Como se muestra en la tabla 5, el porcentaje de DNA lineal obtenido fue de 25,81 y de 21,53 para JS769 y JS768 respectivamente, que son valores similares ( $p=0,71$  y  $0,35$ ) al 24,79 por ciento obtenido en JS628 (*nrdA101 recB*). Todo esto apuntaría a que, en el mutante *nrdA101*, los cortes de DNA de doble cadena son independientes de *RecA* o *RecG*, ya que en ausencia de estas dos proteínas los niveles de DNA lineal a 30°C no se modifican. Sin embargo, para establecer que en una horquilla parada se ha producido una reversión, los cortes observados en ausencia de *RecB* tienen que ser generados por *RuvABC*. Para determinar si estos cortes se producían tras la reversión de horquillas de replicación, se analizó el porcentaje de DNA lineal en las estirpes JS890 (*nrdA101 recA recB ruvABC*) y JS862 (*nrdA101 recG recB ruvABC*). Los resultados presentados en la tabla 5 indican que los cortes de JS769 (*nrdA101 recA recB*) sí son dependientes de *RuvABC*, ya que la ausencia de esta endonucleasa disminuye el nivel de cortes (comparar JS769 con JS890,  $p=0,01$ ). Es decir, la ausencia de *RecA* no afecta a la reversión de las horquillas de replicación paradas en una estirpe *nrdA101* creciendo a 30°C. Sin embargo, los cortes que se producen en ausencia de *RecG* no parecen deberse a la resolución por *RuvABC* del intermediario de Holliday que se formaría tras una

## Resultados

reversión, ya que la ausencia de esta nucleasa específica no disminuye los niveles de DNA lineal (comparar JS768 y JS863,  $p=0,13$ ).

**Tabla 5.** Porcentaje de DNA lineal en la estirpe *nrdA101* en ausencia de RecG o de RecA.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>% DNA lineal a 30°C</b>	<b>n</b>
JS1018	<i>nrdA101</i>	5,72 ± 1,4	4
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	24,79 ± 6,8	25
JS705	<i>nrdA101 recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	5,94 ± 2,4	11
JS627	<i>nrdA101 Δ(recA-srl)::Tn10</i>	10,40 ± 2,84	5
JS769	<i>nrdA101 Δ(recA-srl)::Tn10 recB258::Tn10</i>	25,81 ± 6,83	8
JS890	<i>nrdA101 Δ(recA-srl)::Tn10 recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	12,98 ± 6,63	4
JS767	<i>nrdA101 recG263(::Km)</i>	4,49 ± 0,58	4
JS768	<i>nrdA101 recG263(::Km) recB258::Tn10</i>	21,53 ± 7,24	6
JS862	<i>nrdA101 recG263(::Km) recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	28,28 ± 5,6	4

*n* es el número de repeticiones

Estos resultados indican que RecG parece estar implicada en la reversión de horquillas de replicación paradas en un mutante *nrdA101* creciendo a 30°C. La ausencia de RecG impide que se originen estas reversiones pero no afecta a la progresión de la horquilla ya que los niveles de DSBs de la estirpe JS768 (*nrdA101 recG recB*) son similares a los de JS628 (*nrdA101 recB*).

### 2.2. LA INACTIVACIÓN DE RuvABC SUPRIME LA LETALIDAD DE LA ESTIRPE *nrdA101 recB* SÓLO SI RecG ESTÁ PRESENTE

El modelo de la *Reversión de la Horquilla de Replicación* tiene tres puntos fundamentales. El primero es la generación de DSBs dependientes de RuvABC en una estirpe deficiente en RecB. En los apartados anteriores se ha demostrado que esto ocurre

en la estirpe *nrdA101 recB*. El segundo punto es el requerimiento de la actividad exonucleasa de RecBCD para procesar la cola de DNA de doble cadena que se genera tras la reversión. Además, en ausencia de esta actividad, RuvABC generaría DSBs letales para la célula. Y en tercer lugar, la letalidad provocada por la ausencia de RecB es revertida en ausencia de RuvABC ya que se evitarían los DSBs que provoca esta resolvasa cuando no está presente la actividad exonucleasa de RecBCD (Seigneur *et al.*, 1998).

Con el fin de medir el efecto de la ausencia de estas enzimas de recombinación en la viabilidad del mutante *nrdA101* a 30°C, se llevaron a cabo experimentos de análisis de viabilidad por medida de unidades formadoras de colonias en el doble mutante *nrdA101 recB* con o sin RuvABC. Como se muestra en la tabla 6, la inactivación de RecB compromete el crecimiento de la estirpe *nrdA101* y este efecto es revertido por la inactivación adicional de RuvABC, como predice el modelo de la *Reversión de la horquilla de Replicación*. Estos resultados muestran que la generación de cortes por el complejo RuvABC parece ser la causa de la letalidad del mutante *nrdA101* cuando RecB está inactivado.

**Tabla 6.** Viabilidad de la estirpe *nrdA101* en ausencia de proteínas de recombinación.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>Cfu relativas a <i>nrdA101</i> a 30°C</b>	<b>n</b>
JS1018	<i>nrdA101</i>	1 (4,8x10 <sup>7</sup> cfu/ml)	24
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	0,059	12
JS705	<i>nrdA101 ΔruvABC::Cm recB258::Tn10</i>	0,849	9
JS862	<i>nrdA101 recG263::Km ΔruvABC::Cm recB258::Tn10</i>	0,143	8
JS767	<i>nrdA101 recG263::Km</i>	0,573	9
JS768	<i>nrdA101 recG263::Km recB258::Tn10</i>	0,104	15

*n* es el número de colonias probadas

*cfu* = unidades formadoras de colonias

## Resultados

---

Además, puesto que la ausencia de RecG parece impedir el *RFR*, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias de estirpes *nrdA101 recG* con y sin la actividad de los complejos RecBCD y RuvABC con el fin de determinar cómo la proteína RecG compromete la viabilidad de la estirpe *nrdA101*. La tabla 6 incluye los resultados de viabilidad obtenidos para la estirpe *nrdA101* en ausencia de RecG. Cuando se analizó la viabilidad en ausencia de esta proteína se observó que, aunque la ausencia de RecB es también perjudicial para la estirpe *nrdA101 recG*, esta viabilidad no se recuperaba tras la inactivación adicional del complejo RuvABC (Tabla 6, comparar JS768 con JS862).

Es decir, la recuperación de la viabilidad del mutante *nrdA101 recB* por la inactivación de RuvABC sólo es posible en presencia de RecG. Estos resultados junto con los datos de porcentaje de DNA lineal presentados en la tabla 5 indican que, aunque los DSBs pueden ser la causa de la baja viabilidad tanto de la estirpe *nrdA101 recB* como del mutante *nrdA101 recG recB*, las enzimas que provocan estos cortes no son las mismas en ambas estirpes; mientras que en presencia de RecG los cortes son producidos por la actividad endonucleasa de RuvABC, en ausencia de RecG los cortes deben producirse por alguna otra actividad endonucleolítica de la célula. De este modo, la eliminación de la causa que provoca los cortes permite restaurar la viabilidad celular. En presencia de RecG se produce *RFR* y RuvABC es la enzima que rompe el DNA con lo que su eliminación restaura los valores de viabilidad y disminuye los niveles de cortes cromosómicos. En ausencia de RecG no se producen reversiones y por lo tanto no es RuvABC la que corta los cromosomas, con lo que su eliminación ni recupera la viabilidad ni disminuye los niveles de DNA lineal.

En conjunto, los resultados de las tablas 5 y 6 parecen señalar que RecG está directamente implicada en el proceso de la reversión de las horquillas de replicación paradas en la estirpe *nrdA101* ya que en ausencia de esta proteína las reversiones de las horquillas no se producen. No obstante, hay que hacer notar que en ausencia de esta enzima la procesividad de la horquilla no se vería afectada ya que el nivel de DSBs en un entorno *recB* es similar en presencia o en ausencia de RecG.

### **2.3. LOS DSBs EN UN MUTANTE *nrdA101* EN AUSENCIA DE *RecG* SE DEBEN A CORTES DIRECTOS EN LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN PARADA**

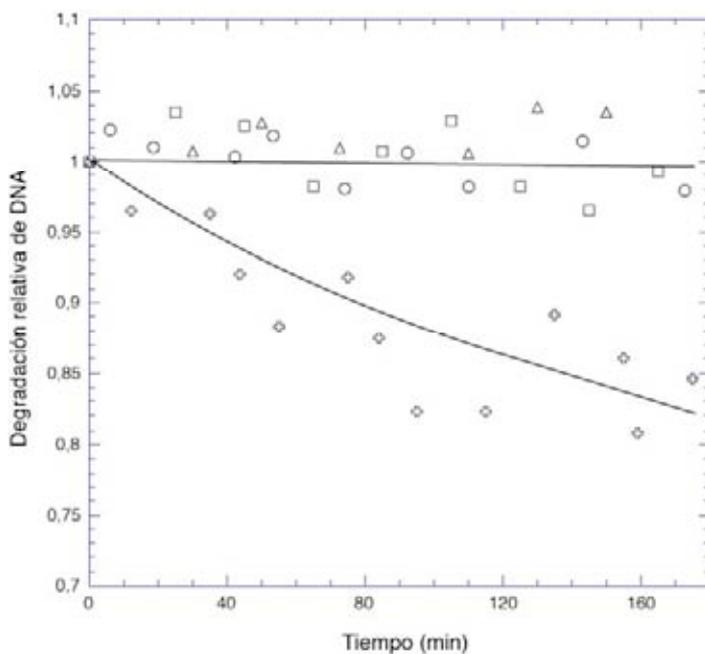
Como se ha visto en los apartados anteriores de este capítulo, los cortes de DNA de doble cadena que se producen en la estirpe *nrdA101 recG recB* no dependen de la acción del complejo RuvABC ya que la estirpe *nrdA101 recG recB ruvABC* presenta unos niveles similares de cortes a los de la estirpe *nrdA101 recG recB*. Esto parece indicar que la horquilla de replicación parada en el mutante *nrdA101* no sufre una reversión en ausencia de *RecG* y por tanto, los cortes de DNA de doble cadena en la estirpe *nrdA101 recG* deben ser generados por una rotura directa de la horquilla de replicación parada en lugar de ser producidos tras la formación de un intermediario de Holliday en la horquilla detenida.

Para comprobar si esto ocurría de este modo, se determinó la existencia de degradación de DNA en estirpes *nrdA101* y *nrdA101 recG* con un fondo genético deficiente en *RecA* pero con actividad exonucleasa del complejo *RecBCD*: si en ausencia de *RecG* se produjese una rotura directa del cromosoma en la horquilla parada se originaría una cola de DNA de doble cadena que sería un sustrato directo de la actividad exonucleasa de *RecBCD*. Al no estar presente *RecA* para procesar esta cola y reincorporarla en el cromosoma, la degradación del DNA por *RecBCD* sería en principio ilimitada (Kuzminov, 1995; Miranda y Kuzminov, 2003) y de este modo detectable experimentalmente. Si por el contrario, en ausencia de *RecG* se produjese una reversión de la horquilla parada, se originaría también una cola de DNA de doble cadena susceptible de ser degradada por *RecBCD*, pero en ausencia de *RecA* esta degradación sería limitada ya que la cola de DNA tiene un pequeño tamaño y por tanto no sería detectable (Flores *et al.*, 2001).

Siguiendo este planteamiento se analizó la degradación de DNA que se producía en estirpes *nrdA101* y *nrdA101 recG* deficientes en *RecA* y con actividad exonucleasa *RecBCD*. Para determinar este nivel de degradación, se cuantificó la cantidad de  $^3\text{H-TdR}$  existente en distintas muestras de cultivos de las distintas estirpes incubados a 30°C en medio marcado con timidina tritiada que a tiempo cero fueron transferidos a un medio sin  $^3\text{H-TdR}$ . Para eliminar la  $^3\text{H-TdR}$  se filtró una alícuota del cultivo, se lavó con un volumen de medio fresco y sin  $^3\text{H-TdR}$  cinco veces mayor al volumen filtrado y se resuspendió en un volumen de medio fresco y sin  $^3\text{H-TdR}$  igual a la alícuota tomada para filtrar.

## Resultados

La figura 12 muestra que en la estirpe *nrdA101* no se produce degradación del DNA ni en presencia ni en ausencia de las enzimas RecA o RecG. Sin embargo, cuando RecG no está presente en un fondo genético deficiente en RecA se produce una degradación de DNA de aproximadamente el 20 por ciento. Estos resultados apoyan la hipótesis de que en ausencia de RecG no se produce una reversión de la horquilla de replicación paradas y que los DSBs se generan directamente en la horquilla de replicación. De este modo, en ausencia de RecA estas colas de DNA de doble cadena que se forman tras los cortes no pueden ser reincorporadas al cromosoma y son degradadas por la actividad exonucleasa del complejo RecBCD. Este hecho es otra evidencia más de que en ausencia de RecG no se producen reversiones de las horquillas paradas, ya que si éstas se dieran, la cola de DNA que se formaría tendría poca longitud y su degradación por RecBCD en ausencia de RecA no sería detectable.



**Fig. 12.** Degradación de DNA en estirpes con actividad RecBCD. Cultivos creciendo exponencialmente a 30°C en medio mínimo M9 con casaaminoácidos y <sup>3</sup>H-TdR fueron filtrados y lavados a tiempo cero y las células se incubaron en el mismo medio sin <sup>3</sup>H-TdR. JS1018 (*nrdA101*), (O); JS627 (*nrdA101 recA*), (□); JS767 (*nrdA101 recG*), (Δ); JS861 (*nrdA101 recG recA*), (◊). Los valores de dpm se calcularon relativos a las dpm del tiempo cero.

Los resultados presentados en este capítulo parecen indicar que RecG es la proteína que dirige la reversión de las horquillas de replicación paradas en un mutante *nrdA101*. En ausencia de esta enzima las reversiones no se producen y los cortes de DNA observados en el mutante *nrdA101 recG* son producidos por otra endonucleasa distinta a RuvABC.

## Capítulo 3

### ***Análisis de la progresión de las horquillas de replicación en un mutante termosensible *nrdA101* incubado a 42°C***

#### **Resumen:**

Se comprobó que el periodo de termorresistencia que presenta la NDP reductasa de una estirpe *nrdA101* incubada a 42°C está relacionado con la procesividad de la maquinaria de replicación antes de realizar el cambio de temperatura. Además, se muestra que durante este periodo de termorresistencia no se producen paradas y reanudaciones de la replicación ya que la síntesis de DNA a 42°C es la misma en presencia o ausencia de las enzimas de recombinación RecA, RecB, RecG y RuvABC o de PriA.

Estos hechos apoyan la idea de que la NDP reductasa está protegida de la inactivación térmica por la hiperestructura de replicación; la síntesis de DNA se detendría a 42°C de la misma forma que lo haría a 30°C, dependiendo de la procesividad que presente la maquinaria de replicación antes del cambio de temperatura. Una vez desmontada la hiperestructura de replicación a 42°C, la NDP reductasa quedaría desprotegida y sería inactivada por la temperatura.

## *Resultados*

---

Una vez establecida la necesidad de las enzimas de recombinación en la progresión de la horquilla de replicación del mutante *nrdA101* a temperatura permisiva, nos planteamos estudiar el posible papel de estas enzimas en la progresión de las horquillas de replicación del mutante a temperatura restrictiva.

- **RESULTADOS PRELIMINARES**

Cuando la estirpe *nrdA101* creciendo a 30°C se incubaba a 42°C, la síntesis de DNA continúa durante 50 minutos y la replicación se va parando al azar a lo largo del cromosoma, dando un aumento de DNA del 45 por ciento con respecto al DNA que había antes del cambio (Guzman *et al.*, 2002). Como la mutación *nrdA101* codifica un producto génico que *in vitro* es inactivado en menos de dos minutos a la temperatura restrictiva (Fuchs *et al.*, 1972), este comportamiento *in vivo* ha sido explicado por una protección de la NDP reductasa por otras proteínas que, junto con ella, estarían formando parte de una hiperestructura de replicación. Una vez que esta hiperestructura se desmonta a 42°C, la NDP reductasa quedaría desprotegida y consecuentemente, inactivada por la temperatura (Guzman *et al.*, 2002).

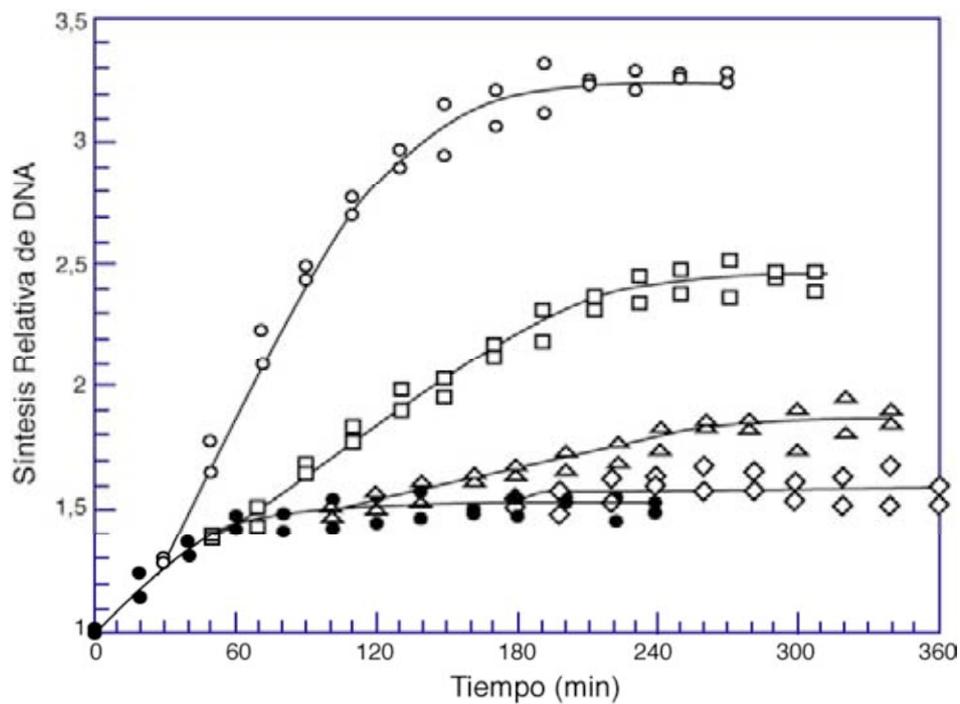
### **3.1. LA NDP REDUCTASA CODIFICADA POR EL ALELO *nrdA101* PERMANECE ACTIVA *in vivo* AL MENOS 50 MINUTOS TRAS LA INCUBACIÓN A 42°C**

Los resultados preliminares de este laboratorio comentados anteriormente indican que la NDP reductasa está protegida de la inactivación térmica durante 40-50 minutos. Para verificar esta hipótesis se analizó la capacidad de reanudar la replicación de la estirpe JS1018 (*nrdA101*) tras distintos tiempos de incubación a 42°C. El procedimiento experimental se desarrolló como se refiere a continuación: distintas alícuotas de un cultivo de JS1018 (*nrdA101*) incubado a 42°C fueron transferidas de nuevo a 30°C a distintos tiempos y a estas alícuotas se les añadió rifampicina. La rifampicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de RNA y por tanto la de proteínas; de este modo, la NDP reductasa presente al incubarse de nuevo a 30°C es la misma proteína que fue incubada a 42°C.

En la figura 13 se muestra cómo al incubarse de nuevo a 30°C una alícuota de un cultivo de JS1018 que fue incubado a 42°C y en la que tras el cambio de temperatura además se inhibe la síntesis de proteína, la replicación sólo se reanuda si el periodo de incubación a 42°C fue de menos de una hora. Como esta reanudación de la replicación

## Resultados

viene determinada por la disponibilidad de una NDP reductasa funcional, estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que durante los primeros cincuenta minutos de incubación a 42°C la NDP reductasa no se inactiva y permanece totalmente funcional para continuar la replicación al ser incubada de nuevo a 30°C. Como el producto génico codificado por el alelo *nrdA101* es inactivado *in vitro* en menos de dos minutos (Fuchs *et al.*, 1972), estos resultados sólo pueden explicarse por una protección *in vivo* de la enzima codificada por este alelo. Una vez que la proteína queda expuesta a la temperatura es inactivada y por tanto deja de ser funcional para la replicación incluso aunque el cultivo se crezca de nuevo a 30°C.

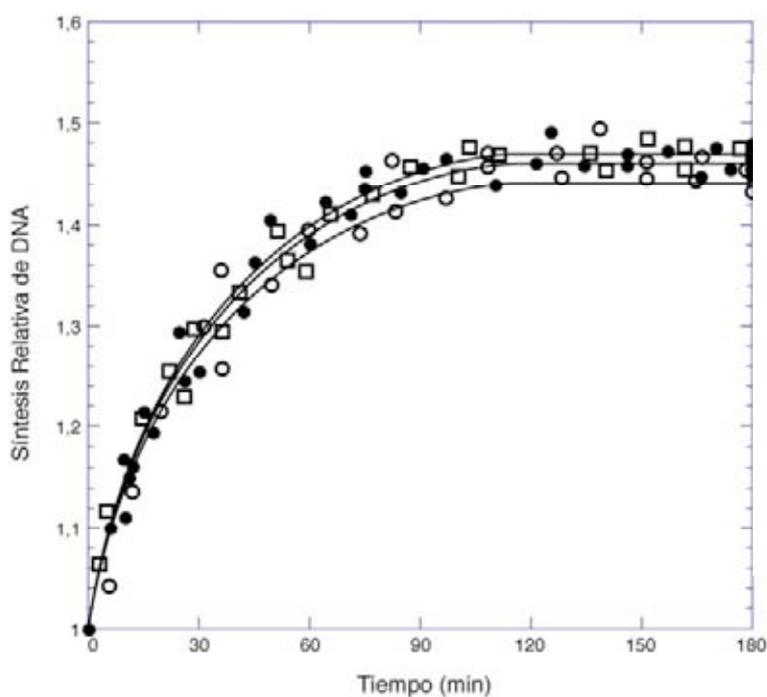


**Fig. 13.** Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS1018 en presencia de rifampicina a 30°C tras incubación durante distintos tiempos a 42°C. La estirpe JS1018 creciendo a 30°C en medio mínimo M9 con casaaminoácidos fue incubada a 42°C (●) a tiempo cero. Tras el cambio a 42°C, distintas alícuotas del cultivo fueron de nuevo incubadas a 30°C y se adicionó rifampicina. Estos cambios se realizaron 30 (○), 50 (□), 100 (△) y 180 (◇) minutos después de la incubación a 42°C. Los valores de dpm se calcularon relativos a las dpm en el momento del cambio.

### 3.2. LA SÍNTESIS DE DNA A 42°C EN EL MUTANTE *nrdA101* NO DEPENDE DE ENZIMAS DE RECOMBINACIÓN NI DE LA PROTEÍNA PriA

Según los resultados obtenidos en el apartado anterior, si la NDP reductasa estuviera protegida por una asociación con otras proteínas presentes en la hiperestructura de replicación, la progresión de las horquillas durante los primeros 50 minutos a 42°C en un mutante *nrdA101* debe proceder sin paradas y reanudaciones. Una parada desmontaría la maquinaria de replicación dejando desprotegida a la NDP reductasa, provocando su inactivación y la detención de la síntesis de DNA.

Para verificar un posible papel de las enzimas de recombinación durante la progresión de la horquilla de replicación tras el cambio de temperatura se analizó la síntesis a 42°C de estirpes *nrdA101* que además carecían de las proteínas de recombinación RecA, RecB, RuvABC o RecG, o de la proteína PriA necesaria para reensamblar un primosoma. Este análisis se desarrolló midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-TdR de cultivos que creciendo exponencialmente a 30°C, fueron cambiados a 42°C a tiempo cero. Los resultados de la figura 14 muestran que la ausencia de RecA o de PriA no afecta a la cantidad de DNA sintetizado a 42°C por el mutante *nrdA101*. Los mismos resultados se obtuvieron cuando las proteínas RecB, RuvABC o RecG estaban ausentes; en todos los casos la síntesis de DNA a 42°C fue la misma.



**Fig. 14.** Síntesis de DNA de JS1018, JS627, y JS891 incubadas a 42°C. Cultivos bacterianos de JS1018 (*nrdA101*) (●), JS627 (*nrdA101 recA*) (○) y JS891 (*nrdA101 priA2*) (□) creciendo exponencialmente a 30°C en medio mínimo M9 con casaaminoácidos fueron incubados a 42°C a tiempo cero. Los valores representados se obtuvieron como dpm relativas a las dpm existentes a tiempo cero.

## Resultados

---

Está bien documentado que una vez que la horquilla de replicación se para se necesitan enzimas de recombinación y la proteína PriA para procesar y reanudar la horquilla de replicación mediante el reensamblaje de un nuevo replisoma (Courcelle *et al.*, 2004; Cox, 2001; McGlynn, 2004; Michel *et al.*, 2004). Los resultados presentados indican que las enzimas de recombinación y PriA no se necesitarían para la progresión de la horquilla, por lo que el complejo de replicación no se desensamblaría durante la síntesis de DNA a 42°C en el mutante *nrdA101*. En esta estirpe, la síntesis de DNA observada sería la que se produjese durante el tiempo que el replisoma permanece unido al DNA después del cambio de temperatura.

Estos resultados sugieren que una vez detenida la replicación a 42°C, el replisoma se desensamblaría dejando desprotegida a la NDP reductasa termosensible. Esta sería inactivada por la temperatura y consecuentemente, dejaría de estar disponible para reanudar la replicación a 42°C, independientemente de la presencia o ausencia de las proteínas que llevan a cabo esta reanudación.

### **3.3. LA SÍNTESIS DE DNA A 42°C EN EL MUTANTE *nrdA101* ESTÁ RELACIONADA CON LA PROCESIVIDAD DE LA REPLICACIÓN**

Basándonos en los resultados del apartado anterior podemos hipotetizar que la síntesis de DNA a 42°C en el mutante *nrdA101* procede sin la desorganización del complejo de replicación. De este modo, esta síntesis dependerá del tiempo que el replisoma puede permanecer unido al DNA, esto es, de su procesividad. Si esta procesividad a 42°C viniese determinada por la procesividad del replisoma antes del cambio de temperatura, condiciones que variasen el tiempo que el complejo de replicación se mantiene unido al DNA alterarían también la síntesis de DNA del mutante a 42°C.

Para determinar si esta síntesis a 42°C estaba condicionada por la mayor o menor procesividad que tuviese la hiperestructura de replicación antes del cambio, se buscaron condiciones en las que se variase esta procesividad para determinar si había un efecto en la síntesis de DNA a 42°C.

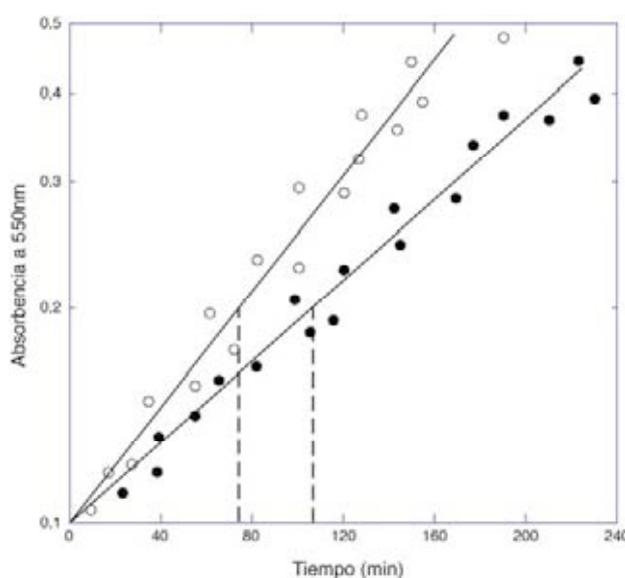
### 3.3.1. LA REPLICACIÓN DE JS1018 A 37°C

Dado que el mutante JS1018 (*nrdA101*) no es viable a 42°C y a 30°C presenta una replicación con más paradas que una estirpe *nrdA*<sup>+</sup>, se planteó la hipótesis de que el crecimiento de esta estirpe a una temperatura semirrestringida (37°C) podría ofrecer un sistema de estudio en el que se pudiera relacionar la mayor alteración de la NDP reductasa con la menor procesividad de la hiperestructura de replicación.

#### 3.3.1.1. Parámetros de ciclo celular de JS1018 creciendo a 37°C

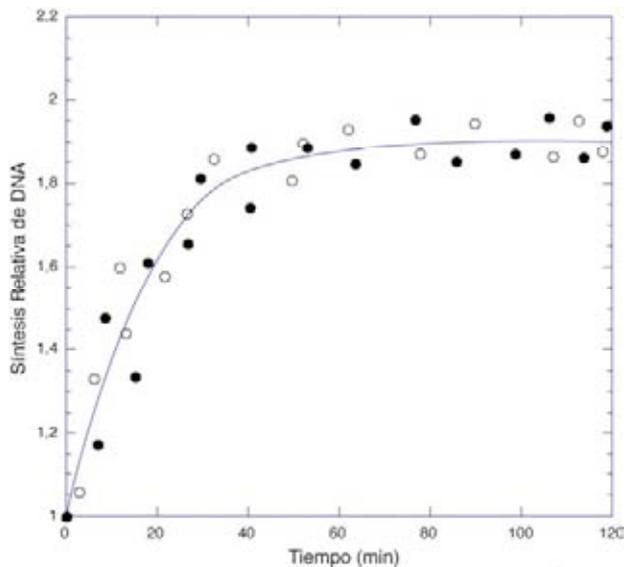
Según lo expuesto anteriormente, se analizó el crecimiento de JS1018 (*nrdA101*) para determinar los parámetros de ciclo del mutante creciendo tanto a 30°C como a 37°C.

El tiempo de generación ( $\tau$ ) del mutante *nrdA101* creciendo a 30°C y a 37°C, fue determinado por medida de la densidad óptica a distintos tiempos. La representación en una escala semilogarítmica de las densidades ópticas obtenidas en las distintas mediciones frente al tiempo de cada medición permite obtener el tiempo de generación o  $\tau$  de ese cultivo. Este valor viene dado por el tiempo que tarda en duplicarse la densidad óptica, que es equivalente al tiempo que tarda en duplicarse la masa del cultivo o lo que es lo mismo, el tiempo que tarda una célula en dividirse. En la figura 15 se observa que el mutante *nrdA101* presenta un tiempo de generación mucho mayor cuando crece a 37°C indicando que el crecimiento del cultivo está más comprometido a esta temperatura semirrestringida.



**Fig. 15.** Tiempo de generación de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C. Representación en escala semilogarítmica del crecimiento de un cultivo de JS1018 (*nrdA101*) incubado a 30°C (○) o a 37°C (●) en medio mínimo M9 con casaaminoácidos. A distintos tiempos se tomaron alícuotas del cultivo y se midió la absorbancia a

## Resultados



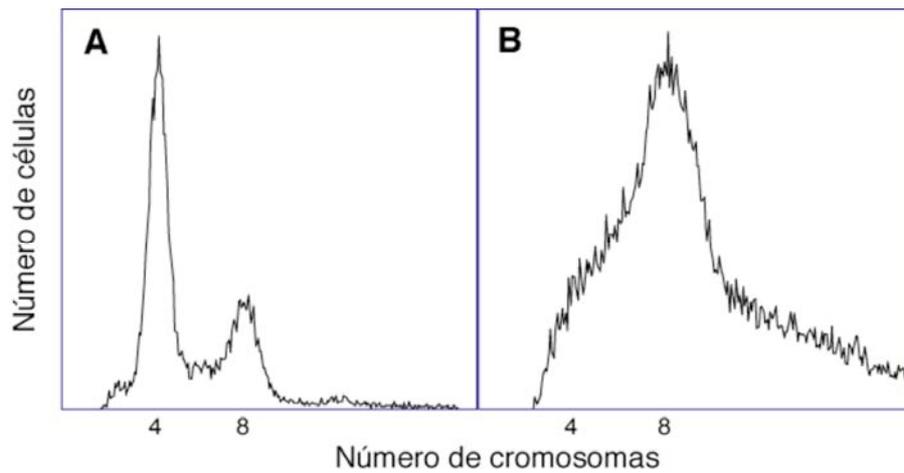
**Fig. 16.** Síntesis de DNA de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C tras inhibir nuevos inicios de replicación. La síntesis de DNA se determinó midiendo la incorporación de timidina radiactiva en células creciendo en medio mínimo con casaaminoácidos a 30°C (○) o a 37°C (●). A tiempo cero, una alícuota del cultivo se trató con rifampicina para impedir nuevos inicios de replicación y se mantuvo a la misma temperatura. Los valores representados se obtuvieron como dpm relativas a las dpm existentes a tiempo cero.

Para analizar el tiempo que tarda esta estirpe en replicar su cromosoma creciendo a las dos temperaturas, esto es, el periodo  $C$ , se midió la síntesis residual de DNA tras la adición de rifampicina. La figura 16 muestra la misma síntesis residual a 30°C que a 37°C para JS1018, lo que indica el mismo valor de  $n$  en ambas condiciones de crecimiento. Sin embargo, como el tiempo de generación es distinto en ambos casos y el periodo  $C$  viene determinado por el producto de  $n$  y  $\tau$ , los resultados obtenidos señalan que el periodo  $C$  de JS1018 aumenta significativamente cuando la estirpe crece a 37°C.

Los distintos valores obtenidos en el análisis de los parámetros de ciclo de JS1018 creciendo a estas dos temperaturas se resumen en la tabla 7. Como se puede observar, el tiempo de generación ( $\tau$ ) de JS1018 creciendo a 37°C es casi 30 minutos mayor que creciendo a 30°C y a esta temperatura semirrestrictiva la estirpe tarda una hora más en replicar su cromosoma ( $C$ ). Además, hay que hacer notar que los valores de  $n$  y de  $C$  a 37°C mostrados en esta tabla están subestimados ya que como se observa en la figura 17, al realizar las citometrías de flujo de estos cultivos tras la adición de rifampicina, no hay picos correspondientes a cromosomas completos. Esto indica que la síntesis de DNA tras la adición de rifampicina a 37°C se detiene antes de finalizar la replicación del cromosoma.

**Tabla 7.** Parámetros de ciclo celular de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C.

<b>JS1018 (<i>nrdA101</i>)</b>		
<b>Parámetros de ciclo</b>	<b>Crecimiento 30°C</b>	<b>Crecimiento 37°C</b>
<b><math>\tau</math> (min)</b>	75	104
<b><math>n</math></b>	2,10	2,10
<b><math>C</math> (min)</b>	157	218



**Fig. 17.** Citometrías de flujo de JS1018. Se analizó la citometría de flujo de la estirpe *nrdA101* tras la adición de rifampicina y cefalexina durante 4h a un cultivo exponencial creciendo a 30°C (A) o a 37°C (B).

De estos resultados se puede concluir que la replicación a 37°C de la estirpe *nrdA101* es más lenta que a 30°C y que tiene dificultades para llegar al término en presencia de rifampicina. Esto sugiere que a 37°C la progresión de la horquilla de replicación en un mutante *nrdA101* está aún más comprometida que a 30°C.

## Resultados

### 3.3.1.2. Análisis de la procesividad de las horquillas de replicación a 37°C

Lo expuesto anteriormente indica que la estirpe JS1018 (*nrdA101*) creciendo a 37°C replica su cromosoma con más dificultad que creciendo a 30°C. Para determinar si esta alteración de la replicación se debía al hecho de que las horquillas sufriesen más paradas a temperatura semirrestrictiva, se intentó determinar la cantidad de cortes de DNA de doble cadena de la estirpe *nrdA101 recB* creciendo a 37°C y si estos cortes dependían de la acción de RuvABC, ya que un aumento de estos cortes dependientes de RuvABC indicaría un aumento de horquillas de replicación paradas que habrían sufrido una reversión. Sin embargo, no se pudo determinar este nivel de DSBs porque a 37°C la estirpe *nrdA101 recB* no mantenía un crecimiento adecuado (los cultivos crecían o no con un 50 por ciento de probabilidad y cuando crecían, lo hacían con un tiempo de generación de más de tres horas). No obstante, como se observa en la tabla 8, sí se pudieron cuantificar los DSBs en el mutante triple *nrdA101 recB ruvABC* creciendo a 37°C y el nivel de cortes fue similar al encontrado en el mutante sencillo *nrdA101*, siendo ambos más elevados que los detectados en las mismas estirpes creciendo a temperatura permisiva .

**Tabla 8.** Porcentaje de DNA lineal en la estirpe *nrdA101* creciendo a 30°C y a 37°C.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>% DNA lineal</b>		
		<b>30°C</b>	<b>37°C</b>	<b>n</b>
JS1018	<i>nrdA101</i>	5,72 ± 1,4	14,78 ± 3,6	4 / 3
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	24,79 ± 6,8	ND	25 / 0
JS705	<i>nrdA101 recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	5,94 ± 2,4	14,30 ± 4,5	11 / 4

*n* es el número de determinaciones

Como la existencia de *RFR* en las horquillas paradas viene también determinada por una disminución de la viabilidad en mutantes *recB* y esta bajada de la viabilidad es revertida por la ausencia adicional de RuvABC, se analizó la viabilidad de la estirpe *nrdA101 recB* a 37°C en presencia y en ausencia del complejo RuvABC. Los resultados de la tabla 9 muestran que cuando la estirpe *ndA101* crece a 37°C tiene una absoluta necesidad de RecB para ser viable (comparar JS628 a 30°C y a 37°C). Además, esta pérdida de viabilidad en el doble mutante es revertida por la ausencia de la actividad endonucleasa de RuvABC.

## Resultados

Por último, se analizó la necesidad de la proteína PriA para la viabilidad del mutante a 37°C. PriA es absolutamente requerida para organizar un replisoma y reanudar la replicación una vez que el complejo de replicación se ha desorganizado en una horquilla parada y tiene que volver a montarse. En la tabla 9 puede observarse que PriA es necesaria para la viabilidad de una estirpe *nrdA101* a 30°C, como ocurre en otros mutantes de replicación, pero además es imprescindible si el mutante es incubado a 37°C.

**Tabla 9.** Viabilidad del mutante *nrdA101* a 30°C y a 37°C en ausencia de proteínas de recombinación y de PriA.

<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo Relevante</b>	<b>Cfu relativas a <i>nrdA101</i> a 30°C</b>	<b>Cfu relativas a <i>nrdA101</i> a 37°C</b>	<b>n / n</b>
JS1018	<i>nrdA101</i>	1 (4,8x10 <sup>7</sup> cfu/ml)	1 (6,3x10 <sup>3</sup> cfu/ml)	24 / 24
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	0,059	0,0086	12 / 12
JS704	<i>nrdA101 ΔruvABC::Cm</i>	0,301	0,0483	12 / 12
JS705	<i>nrdA101 ΔruvABC::Cm recB258::Tn10</i>	0,849	4,138	9 / 9
JS891	<i>nrdA101 priA2::Kam</i>	0,171	0,0010	8 / 8

*n* es el número de colonias probadas

*cfu* = unidades formadoras de colonias

A la vista de: (i) la imposibilidad de medir DSBs del cromosoma en una estirpe *nrdA101 recB* creciendo a 37°C y la posibilidad de medirlos en las estirpes *nrdA101* y *nrdA101 recB ruvABC*, (ii) los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad en ausencia de proteínas de recombinación (Tabla 9) y (iii) la absoluta necesidad de PriA para la viabilidad de una estirpe *nrdA101* a temperatura semirrestrictiva (Tabla 9), se podría sugerir que existe una mayor cantidad de horquillas paradas a 37°C que estas horquillas probablemente sufren una reversión para ser reanudadas.

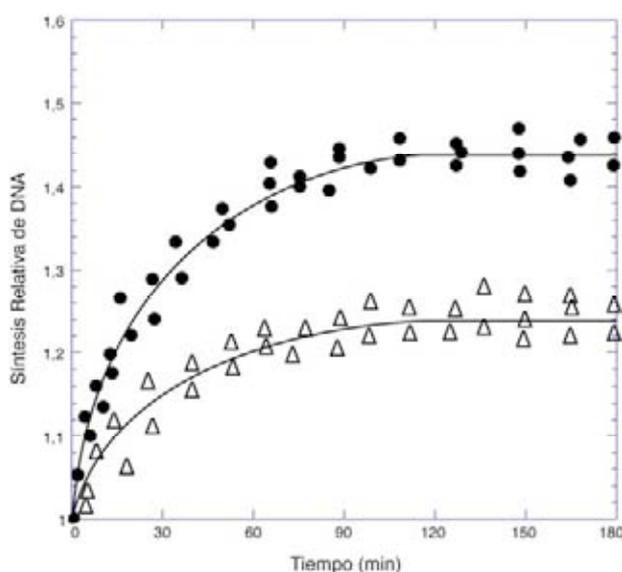
## Resultados

### 3.3.2. LA DISMINUCIÓN DE LA PROCESIVIDAD DE LA REPLICACIÓN DISMINUYE LA ACUMULACIÓN DE DNA DESPUÉS DEL CAMBIO A 42°C

Los resultados del apartado anterior apuntan a que la replicación del DNA en un mutante *nrdA101* creciendo a 37°C es menos procesiva y se para con más frecuencia que cuando el mutante se incubaba a 30°C. Esta bajada en la procesividad de la replicación provocaría un aumento de horquillas paradas que conllevarían DSBs que impedirían el crecimiento adecuado de la estirpe *nrdA101 recB* a esta temperatura semirrestrictiva. De este modo, el crecimiento de JS1018 (*nrdA101*) a 37°C ofrece una condición experimental para comprobar si el periodo de termorresistencia de la NDP reductasa a 42°C depende del tiempo que la hiperestructura permanece ensamblada antes de caerse.

Para comprobar esta hipótesis se determinó la capacidad de sintetizar DNA a 42°C de cultivos de la estirpe *nrdA101* que previamente habían estado creciendo exponencialmente a 30°C o a 37°C. La figura 18 muestra que la temperatura previa de crecimiento afecta a la cantidad relativa de DNA acumulada tras el cambio a 42°C, siendo menor cuando la temperatura previa de crecimiento era mayor.

Este resultado indicaría que una menor procesividad de la hiperestructura de replicación antes del cambio de temperatura disminuye el periodo de termorresistencia tras la incubación a 42°C.



**Fig. 18.** Síntesis de DNA de JS1018 a 42°C tras crecer exponencialmente a 30°C o a 37°C. Los cultivos bacterianos creciendo exponencialmente a 30°C (●) o a 37°C (△) en medio mínimo M9 con casaaminoácidos se incubaron a 42°C a tiempo cero. Los valores representados se obtuvieron como dpm relativos a las dpm existentes a tiempo cero.

### **3.3.3. EL AUMENTO DE LA PROCESIVIDAD DE LA REPLICACIÓN INCREMENTA LA ACUMULACIÓN DE DNA DESPUÉS DEL CAMBIO A 42°C**

El doble mutante *nrdA101 Δtus* tiene una síntesis residual de DNA a 42°C del 80 por ciento en lugar del 45 por ciento que presenta el mutante sencillo *nrdA101* (Guzman *et al.*, 2002). Tus es la proteína encargada de detener la replicación en las secuencias Ter, que se localizan en la región diametralmente opuesta a *oriC* en el cromosoma y que son el lugar donde finaliza la replicación. Otras secuencias parcialmente homólogas a Ter podrían existir a lo largo del cromosoma donde Tus también podría unirse aunque fuese con menor afinidad, frenando el movimiento de la horquilla y facilitando la desorganización de una hiperestructura de replicación alterada por la presencia de una NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* (Guzman *et al.*, 2002). Independientemente del comportamiento del doble mutante a 30°C, lo significativo para este trabajo fue el establecer una condición en la que se producía un aumento del periodo de termorresistencia de la NDP reductasa que permitía una síntesis residual a 42°C de casi el doble en el mutante *nrdA101 Δtus* respecto al mutante sencillo *nrdA101*.

Para determinar si la procesividad del doble mutante *nrdA101 Δtus* a 30°C era mayor que la del mutante sencillo *nrdA101* se midieron los cortes de DNA de doble cadena de la estirpe JT630 (*nrdA101 Δtus recB*), ya que una bajada en el nivel de DSBs de este mutante respecto a los detectados en el mutante *nrdA101 recB* significaría una menor cantidad de horquillas de replicación paradas. Así, se observó que el porcentaje de DNA lineal en JT630 (*nrdA101 Δtus recB*) fue de un 12,64 por ciento, que es significativamente menor que los niveles de DSBs que la estirpe JS628 (*nrdA101 recB*), cuyo nivel de roturas fue del 24,79 por ciento ( $p=0,02$ ). Esta disminución del DNA lineal en JT630 indica una menor cantidad de horquillas de replicación paradas, lo que supondría una mayor procesividad de la maquinaria de replicación en ausencia de Tus.

Los resultados de estos dos últimos apartados indican que la síntesis de DNA a 42°C de un mutante *nrdA101* se correlaciona directamente con la procesividad que presenta el replisoma antes del cambio de temperatura, por lo que apuntarían a que la NDP reductasa está interaccionando, directa o indirectamente, con otras proteínas que forman parte del replisoma apoyando el modelo propuesto por Guzmán *et al.* 2002.

## *Resultados*

---

## Capítulo 4

### ***Análisis de las horquillas de replicación paradas por inactivación de la NDP reductasa***

#### **Resumen:**

Se determinó la capacidad de reanudar la replicación de las horquillas paradas en un mutante *nrdA101* tras ser incubado bajo distintas condiciones restrictivas para la NDP reductasa. La inactivación química de la enzima, que detiene la replicación instantáneamente, provoca un aumento de los DSBs dependientes de RuvABC mientras que la incubación del mutante a 42°C no provoca un aumento tan elevado de estos cortes en el DNA. Esto parece indicar que la horquilla parada a 42°C esta conformada de algún modo que entorpece tanto el RFR como la posibilidad de que la horquilla sea cortada por alguna enzima endonucleolítica.

Además, la capacidad de reanudar la síntesis de DNA tras eliminar la condición restrictiva es diferente dependiendo del tratamiento aplicado y la necesidad de enzimas de recombinación para esta reanudación varía si la estirpe es silvestre o posee la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101*.

## *Resultados*

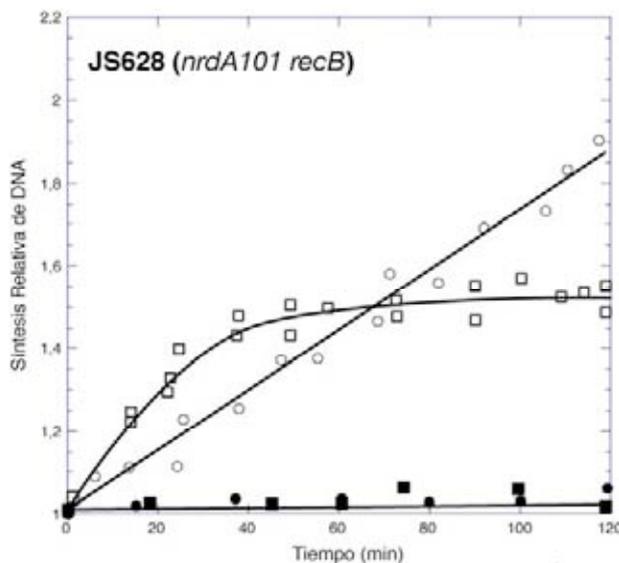
---

#### 4.1. GENERACIÓN DE RFR EN UNA HORQUILLA PARADA POR INACTIVACIÓN DE LA NDP reductasa

Durante los últimos años el grupo de la Dra. Bénédicte Michel ha analizado la existencia de *RFR* en las horquillas de replicación paradas en distintos mutantes de replicación (revisado en Michel *et al.*, 2004). En los capítulos 1 y 2 de este trabajo se ha demostrado la existencia de estas reversiones en el mutante *nrdA101* creciendo exponencialmente a 30°C. Con el fin de analizar si se generaba *RFR* al inhibir la NDP reductasa se cuantificaron los DSBs presentes al incubar el mutante en condiciones restrictivas para esta enzima y si estos cortes eran dependientes de RuvABC.

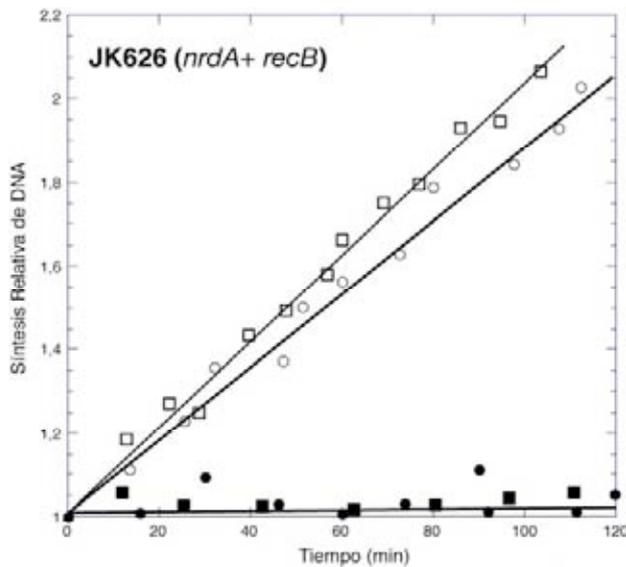
##### 4.1.1. LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN PARADAS POR LA INACTIVACIÓN DE LA NDP reductasa INDUCEN RFR

La hidroxiiurea (Hu) es una droga que inhibe específicamente el centro activo de la NDP reductasa deteniendo la replicación de forma inmediata, tanto en la estirpe *nrdA101* (Fig. 9) como en la silvestre y en sus derivadas carentes de la proteína RecB (Fig. 19 y Fig. 20) debido a la interrupción del aporte de nucleótidos (Neuhard, 1967).



**Fig. 19.** Síntesis de DNA de JS628. A tiempo cero, alícuotas de un cultivo creciendo a 30°C (○) en medio mínimo M9 con casaaminoácidos fueron tratadas con Hu a 30°C (●) o a 42°C (■) o fueron incubadas a 42°C sin ninguna droga (□). Los valores representados se obtuvieron como dpm relativos a las dpm existentes a tiempo cero.

## Resultados



**Fig. 20.** Síntesis de DNA de JK626. A tiempo cero, alícuotas de un cultivo creciendo a 30°C (○) en medio mínimo M9 con casaaminoácidos fueron tratadas con Hu a 30°C (●) o a 42°C (■) o fueron incubadas a 42°C sin ninguna droga (□). Los valores representados se obtuvieron como dpm relativas a las dpm existentes a tiempo cero.

Para analizar qué ocurría con las horquillas de replicación paradas al inhibir la NDP reductasa y determinar el nivel de inducción de *RFR* generado por la inactivación de esta enzima, se midieron los DSBs en las estirpes JK626 (*nrdA*<sup>+</sup> *recB*) y JS628 (*nrdA101* *recB*) tras dos horas de incubación con Hu a 30°C. Los resultados mostrados en la tabla 10 indican que la inactivación de la NDP reductasa por Hu induce un aumento de DSBs tanto en la estirpe *nrdA*<sup>+</sup> como en la estirpe *nrdA101* (comparar JK626 con y sin Hu,  $p=7,2 \times 10^{-5}$  y JS628 en las mismas condiciones,  $p=0,001$ ) indicando que se produce un aumento de horquillas paradas. Este resultado era lo esperable ya que como se observa en las figuras 19 y 20 la replicación está detenida tras dos horas de incubación con la droga. Además, los cortes observados en JK626 y JS628 eran dependientes de RuvABC (Tabla 10, comparar JK626 y JS628 a 30°C y con Hu 30°C con JK707 y JS705 en las mismas condiciones), señalando que estas horquillas paradas sufren una reversión formando un intermediario de Holliday que en ausencia de la actividad exonucleasa RecBCD es cortado por RuvABC, ya que cuando no está presente esta endonucleasa, los niveles de DNA lineal disminuyen dramáticamente.

Consecuentemente, estos resultados muestran que cuando la replicación se detiene por una inhibición de la NDP reductasa (adición de Hu), esto es, por carencia de nucleótidos, las horquillas paradas sufren una reversión, al igual que ocurre cuando la replicación se detiene por deficiencias en otras enzimas de la maquinaria de replicación (revisado en Michel *et al.*, 2004).

Tabla 10. Porcentaje de DNA lineal tras la inhibición de la NDP reductasa.

Estirpe	Genotipo Relevante	% DNA lineal			n
		30°C	Hu 30°C 2h	42°C 2h	
JK626	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10</i>	15,18 ± 2,8	30,33 ± 3,2	13,97 ± 7,1	16 / 3 / 5
JK707	<i>nrdA<sup>+</sup> recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	6,74 ± 2,6	3,68 ± 2,1	2,63 ± 0,7	5 / 4 / 2
JS628	<i>nrdA101 recB258::Tn10</i>	24,79 ± 6,8	40,88 ± 0,8	32,09 ± 6,0	25 / 10 / 5
JS705	<i>nrdA101 recB258::Tn10 ΔruvABC::Cm</i>	5,94 ± 2,4	5,55 ± 0,9	3,34 ± 2,28	11 / 7 / 4

n es el número de determinaciones

#### 4.1.2. LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN PARADAS AL INCUBAR UN MUTANTE *nrdA101* A 42°C INDUCEN MENOS DSBs QUE AL INHIBIR LA NDP reductasa CON Hu

Como ya se ha visto, la hidroxuurea (Hu) detiene la replicación de forma inmediata y la incubación a 42°C del mutante *nrdA101* permite la síntesis de DNA durante 50 minutos (Guzman *et al.*, 2002). Sin embargo, como se observa en la figura 19, tras dos horas de incubación a 42°C la replicación de JS628 se ha detenido y todas las horquillas de replicación están paradas, como ocurre tras la incubación con Hu.

Con el fin de determinar la capacidad de generar RFR al incubar un mutante *nrdA101* a la temperatura restrictiva, se midieron los DSBs de una estirpe *nrdA101 recB* tras incubar el mutante a 42°C durante dos horas. Los resultados de la tabla 10 muestran que cuando los DSBs se midieron en estas condiciones, sólo se encontró un aumento de cortes del 29 por ciento, (comparar JS628 a 30°C y a 42°C,  $p=0,006$ ), en lugar del aumento del 65 por ciento observado al inactivar a la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* con Hu (comparar JS628 a 30°C y a 30°C con Hu) o del 100 por ciento observado al inactivar la NDP reductasa silvestre con Hu (comparar JK626 a 30°C y a 30°C con Hu). En cualquier caso, los DSBs que se observaron a 42°C también eran dependientes de RuvABC ya que la ausencia de esta endonucleasa disminuía estos cortes del DNA (comparar JS628 y JS705 a 42°C).

## Resultados

---

Por último, se analizaron los DSBs en las estirpes *nrdA<sup>+</sup> recB* y *nrdA101 recB* incubadas con Hu pero a 42°C y se observó que, al igual que a 30°C, la inactivación química de la NDP reductasa detiene la síntesis de DNA (Fig. 19 y Fig. 20) y provoca un aumento de los DSBs que alcanzan un valor del 32,86 por ciento en el silvestre *nrdA<sup>+</sup> recB* y del 45,19 por ciento en el mutante *nrdA101 recB*, indicando que la Hu ejerce su acción inhibitoria independientemente de la temperatura.

Como tras dos horas de tratamiento con Hu y después de dos horas de incubación a 42°C todas las horquillas de replicación están paradas, las diferencias en los niveles de DSBs encontrados en las dos condiciones parecen indicar que a 42°C las horquillas paradas deben tener una conformación no susceptible de ser cortadas por una endonucleasa y no tienen capacidad de generar una reversión como se ha descrito en otros mutantes de replicación termosensibles (Michel *et al.*, 2004). Podemos concluir por tanto que las horquillas paradas tras la inactivación térmica de la NDP reductasa no tienen la misma capacidad de generar *RFR* que las horquillas paradas por la inactivación química.

### **4.2. LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN PARADAS BAJO DISTINTAS CONDICIONES RESTRINGIDAS PARA LA NDP reductasa EN EL MUTANTE *nrdA101* NO TIENEN LA MISMA CAPACIDAD DE REANUDAR LA REPLICACIÓN**

En el apartado anterior se establece que la capacidad de generar *RFR* que tienen las horquillas de replicación paradas en un mutante *nrdA101* no es la misma dependiendo de la causa que ha provocado esta parada.

Como ya se ha detallado, el *RFR* es uno de los mecanismos por el que las horquillas paradas comienzan a procesarse para su posterior reanudación. Por esto, se analizó la capacidad para reanudar la replicación de las horquillas detenidas en el mutante *nrdA101* bajo distintas condiciones restrictivas para la NDP reductasa una vez que dicha condición había sido eliminada. Además, la necesidad de enzimas de recombinación para estos procesos de reanudación de la replicación está altamente documentada, por lo que se analizó cuáles de las principales enzimas de recombinación, esto es, RecA, RecB, RecG y RuvABC eran necesarias para reanudar la replicación tras condiciones restrictivas en el mutante *nrdA101* y en la estirpe silvestre *nrdA<sup>+</sup>*.

Estos experimentos se realizaron siguiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR de cultivos de las distintas estirpes creciendo en medio mínimo M9 con casaaminoácidos incubados a 30°C con Hu o a 42°C con o sin Hu. Para eliminar la condición restrictiva, el cultivo incubado a 42°C fue transferido a un matraz previamente precalentado a 30°C y los cultivos con Hu se filtraron, se lavaron con medio fresco, se resuspendieron en un volumen de medio fresco con  $^3\text{H}$ -TdR igual al volumen filtrado y se incubaron de nuevo a 30°C en ausencia de la droga.

### **4.2.1. UNA ESTIRPE *nrdA*<sup>+</sup> NO REQUIERE ESPECÍFICAMENTE NINGUNA ENZIMA DE RECOMBINACIÓN PARA REANUDAR LA REPLICACIÓN**

La figura 21 muestra cómo en una estirpe silvestre la inhibición de la NDP reductasa con Hu es totalmente reversible y la replicación se reanuda al eliminar la droga. Los resultados además parecen indicar que en este proceso de reanudación no interviene específicamente ninguna de las proteínas de recombinación RecA, RecB, RecG o RuvABC ya que en ausencia de cualquiera de estas enzimas la recuperación de las horquillas es la misma que en el silvestre (Fig. 21). Es decir un mutante *recA*, *recB*, *recG* o *ruvABC* reanuda la replicación tras la eliminación de Hu con la misma eficacia que una estirpe *rec*<sup>+</sup>. De estos resultados podemos concluir que la reanudación de la síntesis de DNA en una estirpe *nrdA*<sup>+</sup> tras la eliminación de Hu a 30°C no requiere enzimas de recombinación o no requiere ninguna enzima específicamente, pudiendo usar distintas vías de forma alternativa para reanudar la replicación.

### **4.2.2. UNA ESTIRPE *nrdA101* REQUIERE *RecA* Y *RecB* PARA REANUDAR LA REPLICACIÓN**

Cuando se analiza la reanudación de la replicación en el mutante *nrdA101*, los resultados son muy diferentes dependiendo del tratamiento aplicado:

Por un lado, en la figura 22-A se observa que tras dos horas de incubación a 42°C la replicación no se reanuda en JS1018 (*nrdA101*) al transferir los cultivos de nuevo a 30°C, independientemente de si están presentes o no las enzimas de recombinación. Esto ya se analizó en el capítulo 3 de este trabajo, donde se demostraba que la NDP reductasa permanecía funcional a 42°C sólo durante cincuenta minutos.

## Resultados

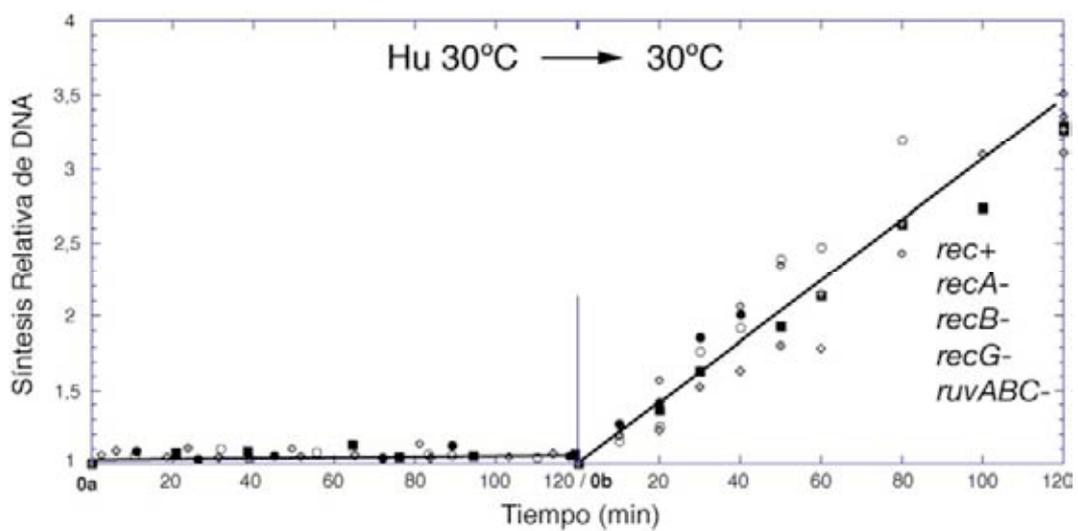
---

Por otro lado, la parada de la replicación por Hu también es totalmente reversible en el mutante *nrdA101*, aunque a diferencia de lo que ocurre en el silvestre, para que la replicación se recupere tras la eliminación de la Hu es necesario que las enzimas de recombinación RecA y RecB estén presentes (Fig. 22-B). Es decir, un mutante *nrdA101 recG* o *nrdA101 ruvABC* reanuda la replicación tras el tratamiento con Hu a 30°C con la misma eficacia que una estirpe *nrdA101 rec<sup>+</sup>*, mientras que un mutante *nrdA101 recA* o *nrdA101 recB* es incapaz de reanudar la replicación.

Además, cuando se analizó la reanudación de la replicación tras combinar los dos tratamientos restrictivos para la NDP reductasa, esto es, la incubación a 42°C junto con la adición de Hu, se observó que las horquillas de replicación no se recuperaban tras eliminar estas dos condiciones (Fig. 22-C), con independencia de la presencia o ausencia de las enzimas de recombinación.

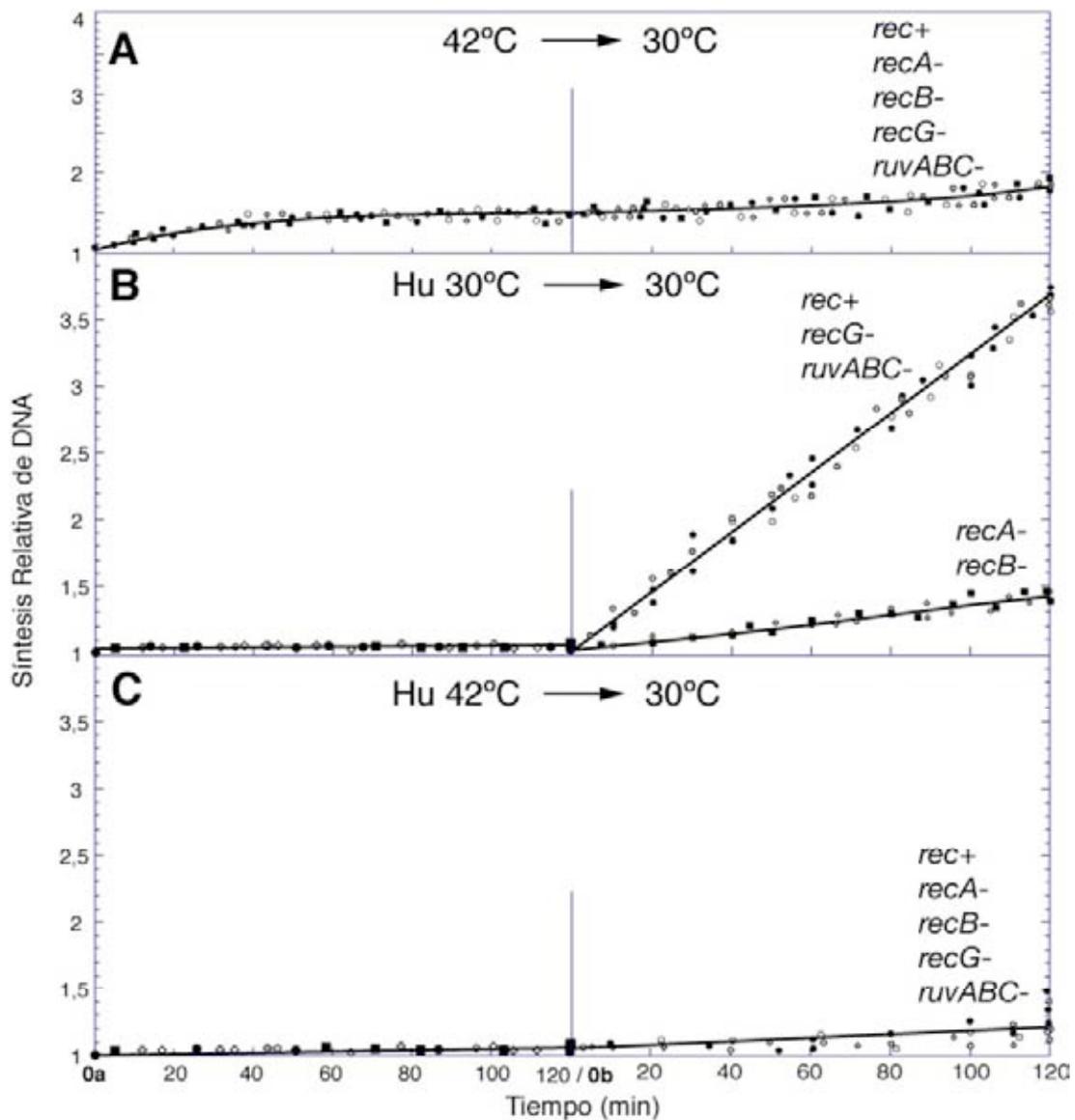
Estos datos indican que, mientras que la inhibición por Hu es totalmente reversible tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *nrdA101*, la incubación durante dos horas a 42°C del mutante impide reanudar la replicación al eliminar la condición restrictiva.

Estos resultados en conjunto señalan que la NDP reductasa mutada de JS1018 al ser inactivada por la temperatura es incapaz de reanudar la replicación al ser incubada de nuevo a 30°C. En cambio, la inhibición por Hu a 30°C parece ser un proceso que, aunque afecte tanto a una NDP reductasa silvestre como a una mutada, debe generar horquillas de replicación paradas conformadas de diferente manera en el mutante y en el silvestre, ya que para que estas horquillas reanuden la replicación tras eliminar la droga sólo son necesarias las enzimas de recombinación RecA y RecB si la NDP reductasa presente es la codificada por el alelo *nrdA101*.



**Fig. 21.** Recuperación de horquillas de replicación paradas en estirpes *nrdA*<sup>+</sup>. A tiempo 0<sub>a</sub>, cultivos de estirpes *nrdA*<sup>+</sup> carentes de RecA, RecB, RecG o RuvABC creciendo a 30°C fueron tratados con Hu. Tras dos horas de tratamiento (tiempo 0<sub>b</sub>), se filtraron los cultivos, se resuspendieron en medio fresco sin Hu y se incubaron a 30°C. Los valores representados se obtuvieron como desintegraciones por minuto (dpm) relativas a las dpm existentes a tiempo cero. Las estirpes analizadas fueron: JK607 (*nrdA*<sup>+</sup>) (●), JK625 (*nrdA*<sup>+</sup> *recA*) (■), JK626 (*nrdA*<sup>+</sup> *recB*) (◄), JK777 (*nrdA*<sup>+</sup> *recG*) (○) y JK706 (*nrdA*<sup>+</sup> *ruvABC*) (†).

## Resultados



**Fig. 22.** Recuperación de horquillas de replicación paradas en estirpes *nrdA101*. A tiempo 0<sub>a</sub>, cultivos de estirpes *nrdA101* carentes de RecA, RecB, RecG o RuvABC creciendo a 30°C fueron incubados a 42°C (A) o tratados con Hu a 30°C (B) o a 42°C (C). Tras dos horas de tratamiento (tiempo 0<sub>b</sub>), el cultivo de 42°C se cambió a 30°C y los cultivos con Hu se filtraron, se resuspendieron en medio fresco sin Hu y se incubaron a 30°C. Los valores representados se obtuvieron como desintegraciones por minuto (dpm) relativas a las dpm existentes a tiempo cero. Las estirpes analizadas fueron: JS1018 (*nrdA101*) (●), JS627 (*nrdA101 recA*) (■), JS628 (*nrdA101 recB*) (◊), JS767 (*nrdA101 recG*) (○) y JS704 (*nrdA101 ruvABC*) (⊕).

# *Discusión*



El papel de la NDP reductasa en la replicación cromosómica de *Escherichia coli* es evidente dado que su actividad enzimática es la única que reduce los NDP a dNDP, los precursores de la síntesis de DNA. A partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se ha propuesto que la NDP reductasa funciona formando parte de la hiperestructura de replicación (Guzmán et al. 2002). En este trabajo se presentan pruebas que evidencian una asociación entre la NDP reductasa y la horquilla de replicación, relacionando la presencia de una NDP reductasa alterada con un ensamblaje/desensamblaje alterado de esta hiperestructura, cuyos efectos se manifiestan en diferentes situaciones en las que la progresión de la horquilla de replicación se ve comprometida.

- *El avance de la horquilla a 30°C.* Un mutante *nrdA101* creciendo a temperatura permisiva tiene una frecuencia superior de paradas de las horquillas de replicación que no es debido al posible menor aporte de dNTP. Estos resultados indican que la progresión de las horquillas de replicación en *Escherichia coli* está comprometida cuando la NDP reductasa presente es la codificada por el alelo *nrdA101*.
- *El avance de la horquilla a 42°C.* La síntesis de DNA que lleva a cabo un mutante *nrdA101* a temperatura restrictiva se realiza sin requerimiento de enzimas de recombinación ni de PriA, lo que implica que durante el periodo de tiempo que la replicación permanece activa a 42°C el replisoma no se desensambla. Estos resultados sugieren que la actividad de la NDP reductasa a 42°C está relacionada con la integridad del replisoma.
- *La capacidad de generar RFR* en las horquillas paradas difiere dependiendo de la forma de inactivar a la NDP reductasa, observándose un impedimento para la reversión de la horquilla parada cuando la NDP reductasa es inactivada por la temperatura. La capacidad de reanudar la replicación al eliminar la condición restrictiva presenta distintos requerimientos dependiendo de si la NDP reductasa presente es la silvestre o la codificada por el alelo *nrdA101*.

Estas observaciones apoyan la propuesta de que la NDP reductasa no funciona aisladamente sino como componente de una hiperestructura: la maquinaria de replicación.

### **LA NDP reductasa CODIFICADA POR EL ALELO *nrdA101* COMPROMETE LA PROGRESIÓN DE LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN A 30°C**

La parada de una horquilla de replicación conlleva normalmente la formación de un DSB como paso previo a su reanudación (Bidnenko *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Kuzminov, 1995; Michel, 2000; Michel *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005). Cuando el corte se debe a que la maquinaria de replicación se encuentra con un hueco en la cadena molde que está replicando (*colapso*) (Fig. 5) (Kuzminov, 1995) o a la llegada de una segunda ronda de replicación (Bidnenko *et al.*, 2002), los DSBs que se originan no se deben a la acción de ninguna endonucleasa. Sin embargo, cuando estos cortes son generados tras una reversión de la horquilla de replicación (*RFR*) para su posterior reanudación (Fig. 6), los DSBs son producidos por la endonucleasa RuvABC (revisado en Michel *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha utilizado la detección de DSB dependientes de RuvABC en un fondo génico sin actividad exonucleasa del complejo RecBCD (*recB*) como herramienta para estudiar la progresión de las horquillas de replicación en estirpes *nrdA101*. Según el modelo del *RFR* (Fig. 6), la existencia de estas roturas sería un indicador de la cantidad de horquillas de replicación paradas, ya que cada vez que la replicación se para genera una horquilla de replicación que puede sufrir una reversión como primer paso para su reanudación. Si esto ocurre, se forma un intermediario de Holliday que es un sustrato específico de la resolvasa RuvABC, que generará una rotura del cromosoma sólo detectada si la estirpe carece de la actividad exonucleasa del complejo RecBCD. A este modelo se ajusta el destino de las horquillas de replicación paradas en mutantes de replicación como *dnaBts* o *dnaEts* a 42°C, o en mutantes que afectan a la progresión de la horquilla de replicación como *rep*, *hold* o *dnaNts* a 37°C (Michel *et al.*, 2004). Todos estos mutantes requieren RecBC para ser viables y sufren roturas de DNA de doble cadena dependientes de RuvABC en ausencia de RecBC (Flores *et al.*, 2001; Grompone *et al.*, 2002; Uzest *et al.*, 1991). En este trabajo mostramos que un mutante *nrdA101 recB* tiene un aumento de roturas de DNA de doble cadena a 30°C al compararlo con las roturas de una estirpe *nrdA<sup>+</sup> recB* (Fig. 11). Además, se ha verificado que en la estirpe *nrdA101 recB* la existencia de roturas de DNA de doble cadena es dependiente de la actividad de RuvABC, lo que indica que son generadas tras la resolución del intermediario de Holliday que se forma por la reversión de la horquilla de replicación parada (Tabla2). El hecho de que se den reversiones en las horquillas de replicación tiene otras implicaciones que hemos comprobado, como alteraciones en la viabilidad de la estirpe *nrdA101* cuando además no están presentes otras enzimas de recombinación. Se ha encontrado una alta letalidad de la estirpe

*nrdA101 recB* a 30°C que se recupera tras la inactivación de RuvABC (Tabla 6), lo que sugiere la acumulación de DSB dependientes de la actividad de RuvABC.

Como la síntesis de dNTPs podía estar alterada en el mutante *nrdA101* incluso a 30°C (Fuchs *et al.*, 1972), dos explicaciones podrían argumentar la mayor frecuencia de las paradas de las horquillas de replicación en el mutante:

- Podrían deberse al menor suplemento de nucleótidos existente como consecuencia de la actividad parcial de la enzima incluso a 30°C.
- También podrían ser consecuencia de una menor procesividad de la maquinaria de replicación ensamblada en presencia de una NDP reductasa alterada codificada por el alelo *nrdA101*.

Nuestros resultados muestran que en una estirpe *nrdA*<sup>+</sup> creciendo con concentraciones subóptimas de timidina los niveles de roturas de DNA de doble cadena no varían (Tablas 3 y 4). Esto indica que el aumento de horquillas paradas observado en un mutante *nrdA101* creciendo a 30°C no es causado por una actividad limitada de la NDP reductasa como suministradora de nucleótidos y apunta a que el aumento de horquillas paradas en el mutante se debe a la presencia de una maquinaria de replicación alterada que provocaría paradas más frecuentes de la replicación en el mutante comparadas con las paradas de las horquillas en presencia de una maquinaria silvestre. Esta interpretación se ve apoyada por los resultados encontrados en mutantes de replicación que inactivan enzimas implicadas en la progresión de las horquillas. Se ha verificado que la reacción de *Reversión de las Horquillas de Replicación* ocurre en varios de estos mutantes:

- En mutantes en la helicasa Rep (Michel *et al.*, 1997; Seigneur *et al.*, 1998). La helicasa Rep no es esencial para la replicación, pero facilita la progresión de las horquillas eliminando proteínas que están unidas al DNA y que serían un obstáculo para el avance de las horquillas (Matson *et al.*, 1994). Rep además es requerida para obtener valores del periodo C fisiológicos (Colasanti y Denhardt, 1987; Lane y Denhardt, 1975).
- En mutantes *holD*, que están afectados en la subunidad  $\Psi$  del complejo  $\gamma$  de la DNA Pol III (Flores *et al.*, 2001). Mutaciones en la subunidad  $\Psi$  afectan a la carga de la polimerasa de la cadena retardada y por lo tanto provocan que la maquinaria de replicación se detenga más frecuentemente.

## Discusión

---

- Tras la inactivación parcial de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la Pol III por incubación a 37°C de mutantes *dnaEts* y *dnaNts* respectivamente (Grompone *et al.*, 2002). La subunidad  $\beta$  forma un dímero con cada cromátida hermana y es responsable de la procesividad y de la rápida progresión de la holoenzima (Kelman y O'Donnell, 1995).

Las horquillas de replicación pueden sufrir reversión por distintas vías, dependiendo probablemente de la causa que provoca la parada. En este trabajo se muestran distintas evidencias que apuntan a que, en ausencia de la proteína RecG, no se producen reversiones de las horquillas de replicación paradas en el mutante *nrdA101* creciendo a 30°C. En primer lugar, las roturas de DNA de doble cadena que se observan en ausencia de RecG (en la estirpe *nrdA101 recG recB*) no son dependientes de la actividad endonucleasa de RuvABC, lo que indica que en esta estirpe, no se forma un intermediario de Holliday tras la parada, esto es, no se produce una reversión de la horquilla. En segundo lugar, la reversión de la letalidad de la estirpe *nrdA101 recB* que se observa en ausencia de RuvABC y que probablemente se deba a la ausencia de roturas de DNA de doble cadena que se produce en la estirpe *nrdA101 recB ruvABC*, no se aprecia si la estirpe carece de la proteína RecG (Tabla 6). Hay que hacer notar que, aunque el *RFR* no se produzca en ausencia de RecG, en estas condiciones podemos observar roturas de DNA de doble cadena en la estirpe *nrdA101 recG recB* y una alta necesidad de RecB para la viabilidad celular. Esto indica que la frecuencia de horquillas paradas no está afectada por la ausencia de RecG, aunque las reanudaciones cursen de forma diferente.

El hecho de encontrar roturas cromosómicas en ausencia de *RFR* nos llevaron a investigar las causas que generan las roturas en esta estirpe. Los resultados del análisis de la degradación del DNA que se producían en la estirpe *nrdA101* y *nrdA101 recG* en presencia de la actividad exonucleasa del complejo RecBCD y en ausencia de la proteína RecA, indicaron que cuando la horquilla parada no puede sufrir una reversión para procesar su reanudación es muy susceptible de sufrir una rotura de forma directa, llevada a cabo posiblemente por alguna endonucleasa de la célula (Horiuchi *et al.*, 1994; Horiuchi y Fujimura, 1995; Michel, 2000; Zheng *et al.*, 2005). En los últimos años se ha propuesto que la proteína SbcCD podría llevar a cabo esta rotura, ya que a pesar de estar catalogada como una exonucleasa, *in vitro* se ha visto que puede realizar cortes endonucleolíticos en DNA de cadena sencilla presente en estructuras en forma de horquilla (Connelly y Leach, 1996; Connelly *et al.*, 1998; Connelly *et al.*, 2003; Cromie *et al.*, 2001). Cuando esto ocurre, la degradación de DNA es detectable experimentalmente ya que la acción exonucleolítica del complejo RecBCD puede ser *a priori* ilimitada si RecA no está presente para integrar la cola de DNA que se genera tras

la rotura (Kuzminov, 1995; Miranda y Kuzminov, 2003). Además, esta actividad exonucleolítica de RecBCD también podría verse fomentada en ausencia de RecA debido que esta proteína también se une a las regiones de cadena sencilla generadas en la horquilla de replicación cuando su progresión se ve impedida (Roberts *et al.*, 1982; Sassanfar y Roberts, 1990) para mantener la integridad estructural de la horquilla de replicación por sí misma hasta que la replicación pueda continuar (Clark y Margulies, 1965; Howard-Flanders *et al.*, 1969). Esta degradación en ausencia de RecA se observó en la estirpe *nrdA101 recG recA* pero no se detectó en la estirpe *nrdA101 recA* si RecG estaba presente, es decir, si se producía una reversión (Fig. 12). Esto apoya la hipótesis de que RecG es necesaria para que se produzcan las reversiones en las horquillas ya que, tras una reversión, la cola de DNA de doble cadena que se forma y que es susceptible de ser degradada por RecBCD es de pequeño tamaño y la degradación en ausencia de RecA no es detectable (Flores *et al.*, 2001).

Aunque está descrita la capacidad de RecA para genera reversiones cuando la replicación se detiene por la inactivación de la DnaB helicasa (Seigneur *et al.*, 2000), esta capacidad de RecG sólo se había observado *in vitro* (McGlynn *et al.*, 2001; McGlynn y Lloyd, 2002). En este trabajo se ha demostrado que cuando las horquillas de replicación se detienen en la estirpe JS1018 las reversiones que se producen en las horquillas paradas en este mutante son catalizadas por esta enzima, dándose por primera vez evidencias *in vivo* de esta actividad descrita *in vitro* para RecG. Estos resultados podrían sugerir que, tras la parada de la horquilla de replicación a 30°C el desensamblaje de la maquinaria de replicación en presencia de la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* a 30°C dificulta la reversión de la horquilla lo que sería solventado por la actividad helicasa de RecG.

### **LA ACTIVIDAD DE LA NDP reductasa CODIFICADA POR EL ALELO *nrdA101* A 42°C ESTÁ RELACIONADA CON LA PROCESIVIDAD DEL REPLISOMA**

Una vez establecida la primera evidencia que relaciona a la NDP reductasa directamente con la progresión de la horquilla de replicación e indirectamente con la hiperestructura de replicación, se estudió qué causas permitían la progresión de la horquilla de replicación a 42°C en el mutante *nrdA101* y si estaban relacionadas con el ensamblaje de la maquinaria de replicación. Cuando una estirpe *nrdA101* creciendo a 30°C es incubada a 42°C puede mantener la replicación durante 50 minutos, dando un incremento de DNA del 45 por ciento respecto al DNA existente antes del cambio de

## Discusión

---

temperatura. Además, las horquillas de replicación se van deteniendo al azar a lo largo de todo el cromosoma (Guzman *et al.*, 2002). Este comportamiento se ha interpretado como un periodo de termorresistencia de la enzima debido a la protección interactiva de la NDP reductasa con otras proteínas en la hiperestructura de replicación; una vez que la hiperestructura se desensambla, la NDP reductasa quedaría desprotegida y consecuentemente, sería inactivada por la temperatura. Según este modelo, el periodo de termorresistencia de la enzima a 42°C viene dado por el periodo de tiempo en el que la hiperestructura de replicación permanece ensamblada, es decir, por su procesividad. En este trabajo se presentan dos evidencias que relacionan el periodo de termorresistencia con la procesividad de la hiperestructura de replicación:

Por un lado, se demostró que al incubar un mutante *nrdA101* a 42°C, la NDP reductasa permanece funcional unos 50 minutos (Fig. 13). Después de este tiempo, la enzima no puede continuar la replicación aunque se incube de nuevo a 30°C en presencia de rifampicina, indicando que tras una hora de incubación a 42°C toda la NDP reductasa presente en la célula ha quedado expuesta a la temperatura y se ha inactivado. Además, también se ha visto que el periodo de termorresistencia no está afectado en estirpes con el alelo *nrdA101* que además carecen de las proteínas de recombinación RecA, RecB, RecG o RuvABC, o de la proteína PriA, encargada de ensamblar un primosoma en sitios diferentes a *oriC*. Como estas proteínas intervienen en diferentes vías que reanudan las horquillas de replicación paradas o directamente actúan en el ensamblaje de un nuevo primosoma y el periodo de termorresistencia no se ve afectado por su ausencia, esto indica que ninguna de ellas es requerida para la síntesis de DNA a 42°C (Figs. 14). Este hecho indica que durante el periodo de termorresistencia la replicación continúa a 42°C mientras que la maquinaria de replicación se mantenga ensamblada. No obstante, una vez que se desensambla esta hiperestructura, la NDP reductasa quedaría libre y sería inactivada por la temperatura haciendo imposible la reanudación de la replicación ya que la NDP reductasa no estaría disponible, independientemente de que estén presentes o no las enzimas de recombinación o PriA.

Por otro lado, hemos observado que la síntesis de DNA a 42°C está relacionada con la procesividad de la replicación antes del cambio a la temperatura restrictiva:

- Como el mutante JS1018 (*nrdA101*) no es viable a 42°C y a 30°C presenta una replicación menos procesiva que la de una estirpe silvestre, se analizó la replicación de la estirpe *nrdA101* creciendo a 37°C. A esta temperatura la replicación está más comprometida: el periodo C aumenta de 157 a 218 minutos (Tabla 7) y este enlentecimiento de la replicación parece deberse a un

aumento en las paradas de las horquillas de replicación. No se pudo medir las roturas de DNA de doble cadena de la estirpe *nrdA101 recB* a 37°C porque a esta temperatura la esta estirpe no mantiene un crecimiento balanceado, sin embargo este aumento de las paradas se deduce del hecho de que a 37°C la actividad RecBC era absolutamente requerida para que las células fuesen viables pero sólo cuando la actividad RuvABC estaba presente (al igual que se observaba a 30°C), sugiriendo que a esta temperatura la cantidad de horquillas paradas sería mayor. El hecho de que la estirpe *nrdA101 recB ruvABC* sí presentase un crecimiento balanceado a 37°C y que el nivel de cortes de DNA fuesen los mismos que los observados en la estirpe *nrdA101* también apoya esta hipótesis (Tablas 8 y 9). Además, se observó un absoluto requerimiento de PriA para el crecimiento a 37°C de la estirpe *nrdA101*, que indica la necesidad de la capacidad de reanudar las horquillas de replicación paradas a esta temperatura. Como este requerimiento de PriA es mucho mayor a 37°C que a 30°C, esto también parece indicar que la cantidad de horquillas paradas a 37°C es mayor (Tabla 9). A partir de estos resultados sugerimos que en estas condiciones el mutante *nrdA101* podría tener una hiperestructura de replicación menos procesiva que la de una estirpe a 30°C. Los resultados en la figura 18 muestran que la síntesis residual de DNA de cultivos de JS1018 (*nrdA101*) a 42°C es menor cuando los cultivos crecieron a 37°C que cuando crecieron a 30°C indicando que la síntesis a 42°C del mutante *nrdA101* es menor cuando la procesividad de la replicación antes de la incubación a la temperatura restrictiva era menor.

- Por otro lado, hemos mostrado que en una estirpe *nrdA101 Δtus* los DSBs a 30°C disminuyen respecto a los del mutante sencillo *nrdA101*. Esta estirpe *nrdA101 Δtus* tiene un periodo de termorresistencia mayor y la síntesis residual de DNA a 42°C es de un 80 por ciento, a diferencia de la síntesis de un 45 por ciento del mutante sencillo *nrdA101* (Guzman *et al.*, 2002). Esto parece indicar que, en ausencia de la proteína Tus, las horquillas de replicación se pararían con menos frecuencia dando menos roturas de DNA de doble cadena en ausencia de RecB, lo que permitiría un periodo de termorresistencia mayor y por tanto una mayor síntesis residual de DNA a 42°C.

Estos resultados apoyan el modelo propuesto por Guzmán *et al.*, (Guzman *et al.*, 2002) y establecen nuevas evidencias que relacionan a la NDP reductasa con la hiperestructura de replicación. El mutante *nrdA101* mantendría la síntesis de DNA a 42°C mientras la NDP reductasa estuviese protegida por la hiperestructura ensamblada.

## Discusión

---

Estos resultados implican que las horquillas tras la incubación a 42°C se paran por causas fisiológicas, no por la inactivación térmica de la NDP reductasa, ahora bien la inactivación de la enzima haría imposible la reanudación de la replicación. En otras palabras, la NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* afectaría a la procesividad de la hiperestructura de replicación a la temperatura permisiva como un mutante *rep*, esto es, reduciendo dicha procesividad, y afectaría a la reanudación de la replicación a la temperatura restrictiva como un mutante *priA<sub>ts</sub>*, es decir, impidiendo esta reanudación.

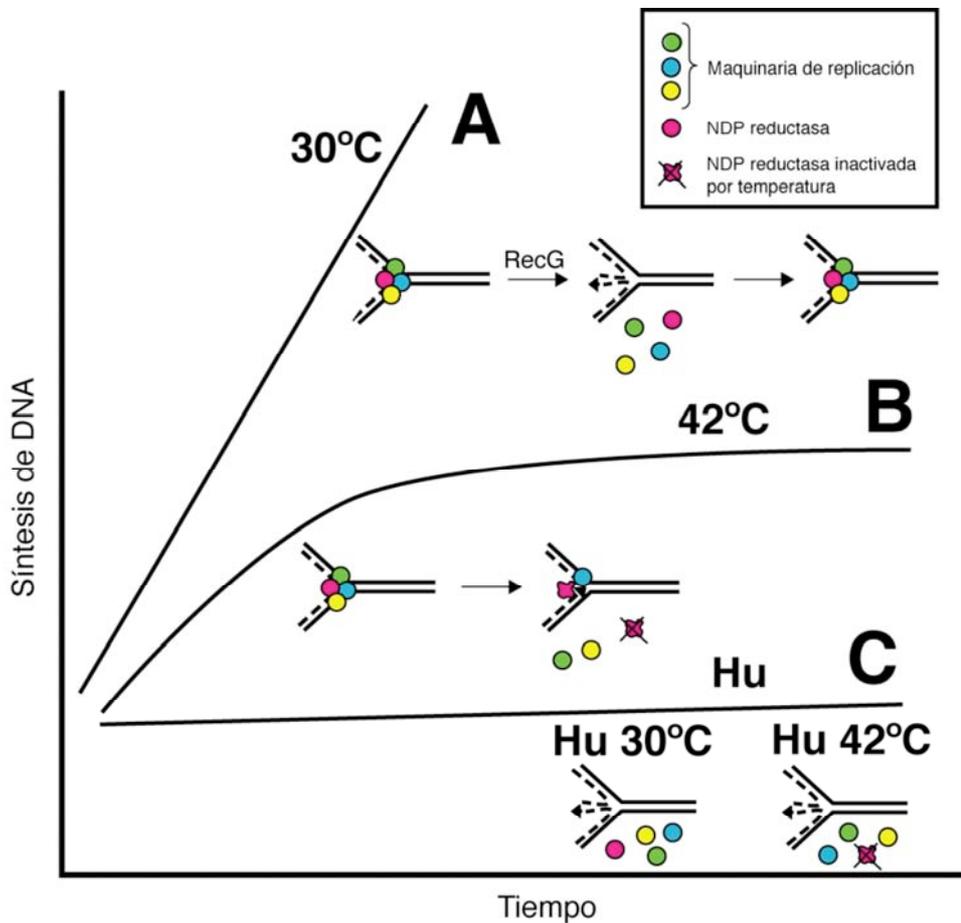
### **LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE LA NDP reductasa CODIFICADA POR EL ALELO *nrdA101* ENTORPECE LA REVERSIÓN DE LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN**

El análisis de la capacidad de las horquillas paradas de sufrir una reversión para su posterior reanudación ofrece pruebas adicionales que relacionan directamente a la NDP reductasa con alteraciones en la horquilla de replicación. Encontramos por un lado, que la falta de nucleótidos resultante de la adición de hidroxidurore provoca un aumento de horquillas paradas que generan DSBs, tanto en una estirpe silvestre como en un mutante *nrdA101* (Tabla 10), y por otro lado, que las horquillas paradas por inactivación de la NDP reductasa son reanudadas por un proceso de reversión, ya que el aumento de DSBs observado en la estirpe silvestre y en el mutante sin actividad exonucleasa RecBCD disminuye cuando la endonucleasa RuvABC no está presente. Este resultado está de acuerdo con lo observado en otros mutantes de elongación termosensibles incubados a 42°C, como son *dnaE<sub>ts</sub>* y *dnaB<sub>ts</sub>* (Grompone *et al.*, 2002; Seigneur *et al.*, 1998; Seigneur *et al.*, 2000). Por lo tanto, concluimos que la inactivación de la NDP reductasa induce reversiones de las horquillas de replicación como se ha descrito para la inactivación de otras enzimas de replicación que detienen la síntesis de DNA instantáneamente.

Sin embargo, cuando se analizó la capacidad de generar *RFR* de las horquillas de replicación al incubar una estirpe *nrdA101* a 42°C, se observó que los DSBs en este caso sólo aumentaban un 29 por ciento respecto a los encontrados creciendo a 30°C, a diferencia de lo que ocurría tras la adición de Hu, donde el aumento de los DSBs era de más de un 60 por ciento (Tabla 10). Tras dos horas de incubación a esta temperatura la replicación del mutante *nrdA101* se ha detenido y todas las horquillas están paradas (Fig. 9 y Fig. 19), y una horquilla parada es susceptible de generar un DSBs tanto a través de una reversión como por la posibilidad de ser cortada directamente por alguna

endonucleasa celular distinta a RuvABC . Sin embargo, al incubar un mutante *nrdA101* a 42°C durante dos horas no se observa un aumento tan señalado de DSBs como el observado al tratar los cultivos con Hu. Este fenotipo del mutante *nrdA101* no es muy común entre los mutantes de replicación, pero tampoco es único; el mutante termosensible *dnaN159* no induce DSB tras la incubación a 42°C a (Grompone *et al.*, 2002). Este resultado apoya nuestra proposición de que las causas que provocan las paradas son distintas en ambas condiciones; mientras que la Hu detiene la replicación por carencia de nucleótidos, las paradas de la replicación a 42°C se producirían de una forma natural, por las mismas causas que provocan paradas a 30°C. Sin embargo, una vez producida la parada la NDP reductasa quedaría desprotegida y sería inactivada impidiéndose por tanto las reanudaciones. El hecho de que los DSBs no aumenten tanto al incubar al mutante a 42°C indica que la horquilla parada de forma natural a 42°C tiene que estar de algún modo protegida para impedir la posibilidad de ser cortada directamente o tras sufrir una reversión. Nosotros proponemos que la alteración que sufre la NDP reductasa al quedar desprotegida tras la parada impide que alguna de las proteínas que forman parte de la maquinaria de replicación o incluso la propia enzima alterada se separen del DNA, imposibilitando el *RFR* y protegiendo de posibles cortes llevados a cabo por endonucleasas celulares. Sin embargo, cuando la replicación se detiene por inactivación de la NDP reductasa, es decir, por carencia de nucleótidos la horquilla sufre una reversión tanto a 30°C como a 42°C como primer paso para su posterior reanudación, al igual que ocurre tras la inactivación de otras enzimas de replicación que detienen la síntesis de DNA instantáneamente.

Además, la estructura de la horquilla parada por la adición de Hu en una estirpe silvestre y en un mutante *nrdA101* debe presentar algunas diferencias. Las enzimas de recombinación RecG y RuvABC no intervienen en la reanudación de la síntesis de DNA en ninguna de las dos estirpes (Fig. 21 y Fig. 22-B), como ocurre tras provocar paradas de la replicación por irradiación con luz UV (Donaldson *et al.*, 2004). Sin embargo, para que se reanude la replicación son necesarias las enzimas de recombinación RecA y RecB sólo si la NDP reductasa que forma parte de la hiperestructura de replicación es la codificada por el alelo *nrdA101*. Para explicar esto proponemos que RecA no tenga simplemente una función de recombinación en la reanudación de la replicación en la estirpe *nrdA101*, sino que su principal función sea la de proteger la horquilla parada (Clark y Margulies, 1965; Howard-Flanders *et al.*, 1969). Como la NDP reductada codificada por el alelo *nrdA101* está alterada incluso a temperatura permisiva, es



**Fig. 23.** Capacidad del mutante *nrdA101* de generar *RFR* bajo distintas condiciones restrictivas para la NDP reductasa. En crecimiento exponencial (A), cuando la replicación se detiene se produce una reversión de la horquilla que permite reanudar la replicación y continuar la síntesis de DNA. Cuando el mutante es incubado a 42°C (B), la replicación continúa el tiempo que la hiperestructura de replicación permanece ensamblada. Cuando ésta se desorganiza, la NDP reductasa queda inactiva, imposibilitando la reanudación de la replicación. En estas condiciones, proteínas de la maquinaria de replicación o la propia NDP reductasa alterada quedarían unidas al DNA, dificultando que se produzca *RFR* e impidiendo que la horquilla sufra una rotura directa por alguna endonucleasa celular. Cuando la replicación se detiene por inactivación de la NDP reductasa tras la adición de Hu tanto a 30°C como a 42°C (C), la horquilla parada genera *RFR* para su posterior reanudación.

posible que la reanudación de la replicación sea más lenta que la de la estirpe silvestre y por tanto la horquilla tenga que estar protegida y estabilizada durante este tiempo que tarda la replicación en reanudarse. Además, es posible que sea la actividad helicasa de RecBCD la que elimine RecA de la horquilla para iniciar la reanudación, ya que en ausencia de RecB la replicación no se reanuda aunque RecA esté protegiendo la horquilla parada.

### **LA NDP reductasa COMO COMPONENTE DE LA HIPERESTRUCTURA DE REPLICACIÓN**

Conscientes de los límites que conllevan las evidencias presentadas en este trabajo, los resultados apoyan la asociación de la NDP reductasa con la hiperestructura de replicación *in vivo*, ofreciendo pruebas independientes que apoyan el modelo de la hiperestructura de replicación propuesto previamente por Guzmán *et al.*, donde la NDP reductasa es un componente estructural y funcional de dicha hiperestructura (Guzmán *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2003).

Estudios de la estructura cuaternaria de la NDP reductasa de *E. coli* usando agentes de *cross-linking* han mostrado que existen interacciones entre esta enzima y otras proteínas del complejo de síntesis de dNTPs (Mathews *et al.*, 1987). La asociación de este complejo con el replisoma generaría la *Hiperestructura de Replicación* que facilitaría tanto la biosíntesis de dNTPs como su llegada a la horquilla de replicación. De acuerdo con la propuesta de Norris (Norris *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2002), la hiperestructura de replicación sería una asociación temporal del complejo de síntesis de nucleótidos, el replisoma, la membrana celular, el DNA y otros factores que intervendrían en la replicación. Todos estos componentes se mantendrían asociados mientras que la replicación se estuviese dando. Esta estructura aseguraría la procesividad requerida para la replicación del cromosoma completo, donde sería crucial tener una contribución balanceada así como las concentraciones requeridas de los cuatro desoxinucleótidos, que se conseguiría gracias a una canalización y compartimentación de los metabolitos. Varias investigaciones apoyan la relación propuesta entre el complejo de síntesis de nucleótidos y el replisoma. Molina y Skarstad asumieron esta hiperestructura de replicación propuesta para explicar cómo la organización de la *factoría de replicación* dependía del metabolismo de los nucleótidos (Molina y Skarstad, 2004). Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que la incubación del mutante *nrdA101* a 42°C provoca una segregación cromosómica aberrante, filamentación celular y una frecuencia de células anucleadas elevada,

## Discusión

---

sugiriendo una relación entre la NDP reductasa y la maquinaria de segregación cromosómica que se apoya en la existencia de esta hiperestructura de replicación (J. Riola, tesis doctoral, 2005). Además, estudios en el fago T4 han aportado evidencias indirectas que apoyan la unión entre el complejo de síntesis de dNTPs y el replisoma a través de una proteína de unión a DNA (SSB) codificada por el gen 32 del fago (Kim *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 1996) y también se ha descubierto una SSb del virus *vaccinia* que interacciona específicamente con la NDP reductasa codificada por el virus (Davis y Mathews, 1993).

En conjunto, los resultados que se presentan en este trabajo relacionan a la NDP reductasa con la progresión de la horquilla de replicación y no pueden ser explicados mediante un papel aislado de la NDP reductasa como suministradora de nucleótidos. En este sentido, la hiperestructura de replicación presente en un mutante *nrdA101* está alterada respecto a la de una estirpe silvestre, lo que demuestra que esta enzima tiene un papel no sólo funcional, sino también estructural en esta hiperestructura.

*Conclusiones*



1. Un mutante *nrdA101* sufre más paradas de la replicación que una estirpe silvestre creciendo exponencialmente a 30°C. Este aumento en las paradas no se debe a una posible limitación de nucleótidos por la presencia de una NDP reductasa alterada codificada por el alelo mutado. Proponemos que el aumento de las paradas de la replicación se debe a que la presencia de una NDP reductasa codificada por el alelo *nrdA101* altera la velocidad de la replicación y la procesividad del replisoma.
2. Las horquillas paradas en el mutante *nrdA101* creciendo exponencialmente a 30°C sufren una reversión para su posterior reanudación, al igual que ocurre con las horquillas paradas en mutantes de replicación que están afectados en la progresión de la horquilla de replicación.
3. La reversión de las horquillas paradas en un mutante *nrdA101* creciendo exponencialmente a 30°C es catalizada por la proteína RecG, observándose por primera vez *in vivo* esta actividad descrita *in vitro*.
4. La síntesis de DNA observada a 42°C en el mutante *nrdA101* se produce de forma continua; durante el tiempo que la NDP reductasa permanece funcional no hay reanudaciones de las horquillas de replicación. Esta síntesis depende de la procesividad de la maquinaria de replicación durante el crecimiento exponencial antes de la incubación a la temperatura restrictiva.
5. Las horquillas de replicación paradas por la inactivación de la NDP reductasa por Hu inducen *RFR* de forma similar a como ocurre cuando la replicación se detiene por alteraciones en distintas proteínas que forman parte del replisoma.
6. Dado que las horquillas paradas por incubación de un mutante *nrdA101* a 42°C generan menos DSBs que las paradas por Hu, proponemos que la presencia de la NDP reductasa inactivada por el aumento de temperatura conduce a un desensamblaje incorrecto de la maquinaria de replicación.
7. La reanudación de la replicación tras eliminar la Hu requiere las enzimas RecA y RecB sólo si la NDP reductasa presente es la codificada por el alelo *nrdA101*.
8. Estas conclusiones nos permiten deducir que la hiperestructura de replicación en el mutante *nrdA101* está modificada respecto a la de la estirpe silvestre, lo que demuestra la pertenencia funcional y estructural de la NDP reductasa a dicha hiperestructura.

## *Conclusiones*

---

## *Gracias a ...*

A mis directores; a Elena, porque además de dirigir este trabajo ha puesto en él toda la pasión que sólo ella sabe poner en todo lo que hace y por transmitirme las ganas de dedicarme a esto, y a Alfonso, por sus ideas, sus críticas y sobre todo por darme la oportunidad, hace ya unos años, de aprender tanto de él.

A Encarna, que ha sido mis pies, mis manos, mi cabeza...Sin ella esto jamás hubiera llegado a su fin. Por tener siempre la sonrisa a punto y por enseñarme tanto.

A mis compañeros del laboratorio. Porque gracias a ellos, todos estos años he trabajado entre amigos. Por haberse involucrado en este trabajo de alguna manera; por sus sugerencias, por mantenerme al día de todo lo que me podía interesar (Rocío, la mejor), por sus lecciones de informática (Felipe y Mary Toñy, ¡miles de gracias!), sus cafés... Y gracias especialmente a Isra(el), que ha participado en esto más que nadie. Por hacer las cosas más fáciles, por su paciencia y su ayuda incondicional.

Gracias también a Chary por sobrestimarme cuando más lo he necesitado y por cuidarme tanto, y a todos los compañeros de *Bioquímica*, los que están y los que han pasado por aquí, por todos los buenos ratos. Y miles de gracias a Modesto, por facilitarlo todo con su *donación* de artículos.

A la Dra. Bénédicte Michel, del Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Genetique Microbienne, Jouy en Josas (París), por sus estirpes y sus comentarios sobre este trabajo y a Gianfranco Grompone, por su amabilidad y sus lecciones de campo pulsante.

También quiero dar las gracias a Mamen, a la Chavela y a Abel que siempre se han preocupado por mí y se han alegrado por todo lo bueno.

A mi familia. A mi padre, que a pesar de no estar muy seguro de que una tesis realmente sirva para algo y de no entender que hay gente que no tiene un horario fijo y que hay vida más allá de las oposiciones, siempre ha estado dispuesto a imprimir, fotocopiar, encuadernar o hacer cualquier cosa que me facilitara el

trabajo, y que además me ha prometido que se va a leer esto ( y estoy segura de que lo hará). A mi madre, que siempre me ha obligado a hacer lo que yo he creído mejor para mí, sin importar lo demás. Gracias a los dos por haber intentado siempre hacerlo lo mejor posible y por haberlo hecho tan bien. Y gracias a mis hermanos; a Javi, que siempre se ha adaptado a mis horarios para que yo no tuviera que preocuparme por nada más y a Adolfo, por enseñarme a comparar correctamente y por preocuparse por entender de qué iba la tesis de su hermana.

Y por último, al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de la beca de Formación de Profesorado Universitario que me ha permitido realizar este trabajo. También hubiera sido posible llevarla a cabo sin los proyectos BMC2002-00830 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y 2PR04A036 de la Junta de Extremadura.

# *Bibliografía*



- Amundsen, S.K., y Smith, G.R. (2003) Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell* 112: 741-744.
- Asai, T., Takanami, M., y Imai, M. (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.
- Asai, T., y Kogoma, T. (1994) D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 1807-1812.
- Augustin, L.B., Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1994) *Escherichia coli* Fis y DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* 176: 378-387.
- Bach, T., Krekling, M.A., y Skarstad, K. (2003) Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *Embo J* 22: 315-323.
- Baharoglu, Z., Petranovic, M., Flores, M.J., y Michel, B. (2006) RuvAB is essential for replication forks reversal in certain replication mutants. *Embo J* 25: 596-604.
- Baker, T.A., y Wickner, S.H. (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 26: 447-477.
- Berlyn, M.K. (1998) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 814-984.
- Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2002) Replication fork collapse at replication terminator sequences. *Embo J* 21: 3898-3907.
- Bierne, H., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (1997) Deletions at stalled replication forks occur by two different pathways. *Embo J* 16: 3332-3340.
- Bjorklund, S., Skog, S., Tribukait, B., y Thelyer, L. (1990) S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 y R2 subunit mRNAs. *Biochemistrand* 29: 5452-5458.

## Bibliografía

---

- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M., y Sherratt, D. (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 3: 789-798.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T., y Sherratt, D.J. (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75: 351-361.
- Blinkova, A., Hervas, C., Stukenberg, P.T., Onrust, R., O'Donnell, M.E., y Walker, J.R. (1993) The *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme contains both products of the *dnaX* gene, tau y gamma, but only tau is essential. *J Bacteriol* 175: 6018-6027.
- Boye, E., Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (2000) Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* 1: 479-483.
- Boye, E., Steen, H.B., y Skarstad, K. (1983) Flow cytometry of bacteria: a promising tool in experimental and clinical microbiology. *J Gen Microbiol* 129: 973-980.
- Bramhill, D., y Kornberg, A. (1988) Duplex opening by DnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* 52: 743-755.
- Brown, N.C., y Reichard, P. (1969) Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* 46: 39-55.
- Bussiere, D.E., y Bastia, D. (1999) Termination of DNA replication of bacterial y plasmid chromosomes. *Mol Microbiol* 31: 1611-1618.
- Carr, K.M., y Kaguni, J.M. (2001) Stoichiometry of DnaA and DnaB protein in initiation at the *Escherichia coli* chromosomal origin. *J Biol Chem* 276: 44919-44925.
- Chang, M.C., Yee, C.S., Stubbe, J., y Nocera, D.G. (2004) Turning on ribonucleotide reductase by light-initiated amino acid radical generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6882-6887.

- Chase, J.W., y Williams, K.R. (1986) Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu Rev Biochem* 55: 103-136.
- Clark, A.J., y Margulies, A.D. (1965) Isolation and Characterization of Recombination-Deficient Mutants of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53: 451-459.
- Colasanti, J., y Denhardt, D.T. (1987) The *Escherichia coli* *rep* mutation. X. Consequences of increased and decreased Rep protein levels. *Mol Gen Genet* 209: 382-390.
- Colloms, S.D., Sykora, P., Szatmari, G., y Sherratt, D.J. (1990) Recombination at *ColE1 cer* requires the *Escherichia coli xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* 172: 6973-6980.
- Connelly, J.C., y Leach, D.R. (1996) The *sbcC* and *sbcD* genes of *Escherichia coli* encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination. *Genes Cells* 1: 285-291.
- Connelly, J.C., Kirkham, L.A., y Leach, D.R. (1998) The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7969-7974.
- Connelly, J.C., de Leau, E.S., y Leach, D.R. (2003) Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the *E. coli* SbcCD (MR) complex. *DNA Repair (Amst)* 2: 795-807.
- Cooper, S., y Helmstetter, C.E. (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* 31: 519-540.
- Cornet, F., Louarn, J., Patte, J., y Louarn, J.M. (1996) Restriction of the activity of the recombination site *dif* to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10: 1152-1161.
- Courcelle, J., Belle, J.J., y Courcelle, C.T. (2004) When replication travels on damaged templates: bumps and blocks in the road. *Res Microbiol* 155: 231-237.

## Bibliografía

---

- Cox, M.M. (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8173-8180.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., y Leach, D.R. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell* 8: 1163-1174.
- Davis, R.E., y Mathews, C.K. (1993) Acidic C terminus of vaccinia virus DNA-binding protein interacts with ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 745-749.
- Donachie, W.D. (1992) What is the minimum number of dedicated functions required for a basic cell cycle? *Curr Opin Genet Dev* 2: 792-798.
- Donachie, W.D. (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 47: 199-230.
- Donaldson, J.R., Courcelle, C.T., y Courcelle, J. (2004) RuvAB and RecG are not essential for the recovery of DNA synthesis following UV-induced DNA damage in *Escherichia coli*. *Genetics* 166: 1631-1640.
- Dower, W.J., Miller, J.F., y Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Egelman, E.H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M.M., y Patel, S.S. (1995) Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3869-3873.
- Ekberg, M., Birgander, P., y Sjöberg, B.M. (2003) *In vivo* assay for low-activity mutant forms of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* 185: 1167-1173.
- Eklund, H., Uhlin, U., Farnegårdh, M., Logan, D.T., y Nordlund, P. (2001) Structure y function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* 77: 177-268.

- Fang, L., Davey, M.J., y O'Donnell, M. (1999) Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell* 4: 541-553.
- Fekete, R.A., y Chatteraj, D.K. (2005) A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55: 175-183.
- Flanagan, J.B., y Greenberg, G.R. (1977) Regulation of deoxyribonucleotide biosynthesis during *in vivo* bacteriophage T4 DNA replication. Intrinsic control of synthesis of thymine and 5-hydroxymethylcytosine deoxyribonucleotides at precise ratio found in DNA. *J Biol Chem* 252: 3019-3027.
- Flores, M.J., Bierne, H., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2001) Impairment of lagging strand synthesis triggers the formation of a RuvABC substrate at replication forks. *Embo J* 20: 619-629.
- Flores, M.J., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2002) Primosome assembly requirement for replication restart in the *Escherichia coli* *holDG10* replication mutant. *Mol Microbiol* 44: 783-792.
- Flores, M.J., Bidnenko, V., y Michel, B. (2004) The DNA repair helicase UvrD is essential for replication fork reversal in replication mutants. *EMBO Rep* 5: 983-988.
- Flores, M.J., Sanchez, N., y Michel, B. (2005) A fork-clearing role for UvrD. *Mol Microbiol* 57: 1664-1675.
- Flower, A.M., y McHenry, C.S. (1986) The adjacent *dnaZ* and *dnaX* genes of *Escherichia coli* are contained within one continuous open reading frame. *Nucleic Acids Res* 14: 8091-8101.
- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H., y Reichard, P. (1992) The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65: 147-183.
- Fuchs, J.A., Karlstrom, H.O., Warner, H.R., y Reichard, P. (1972) Defective gene product in *dnaF* mutant of *Escherichia coli*. *Nat New Biol* 238: 69-71.

## Bibliografía

---

- Funnell, B.E., Baker, T.A., y Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. J Biol Chem 262: 10327-10334.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001a) tau binds y organizes *Escherichia coli* replication through distinct domains. Partial proteolysis of terminally tagged tau to determine cyidate domains and to assign domain V as the alpha binding domain. J Biol Chem 276: 4433-4440.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001b) tau binds y organizes *Escherichia coli* replication proteins through distinct domains. Domain IV, located within the unique C terminus of tau, binds the replication fork, helicase, DnaB. J Biol Chem 276: 4441-4446.
- Gil, D., y Bouche, J.P. (1991) ColE1-type vectors with fully repressible replication. Gene 105: 17-22.
- Glover, B.P., y McHenry, C.S. (1998) The chi psi subunits of DNA polymerase III holoenzyme bind to single-stranded DNA-binding protein (SSB) y facilitate replication of an SSB-coated template. J Biol Chem 273: 23476-23484.
- Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) The DnaX-binding subunits delta' y psi are bound to gamma y not tau in the DNA polymerase III holoenzyme. J Biol Chem 275: 3017-3020.
- Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2001) The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. Cell 105: 925-934.
- Gordon, G.S., y Wright, A. (2000) DNA segregation in bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 681-708.
- Grompone, G., Seigneur, M., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2002) Replication fork reversal in DNA polymerase III mutants of *Escherichia coli*: a role for the beta clamp. Mol Microbiol 44: 1331-1339.
- Grompone, G., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2003) Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. Mol Microbiol 48: 845-854.

- Grompone, G., Ehrlich, D., y Michel, B. (2004) Cells defective for replication restart undergo replication fork reversal. *EMBO Rep* 5: 607-612.
- Guijo, M.I., Patte, J., del Mar Campos, M., Louarn, J.M., y Rebollo, J.E. (2001) Localized remodeling of the *Escherichia coli* chromosome: the patchwork of segments refractory and tolerant to inversion near the replication terminus. *Genetics* 157: 1413-1423.
- Guzmán, E.C., Caballero, J.L., y Jiménez-Sánchez, A. (2002) Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43: 487-495.
- Guzmán, E.C., Guarino, E., Riola, J., Caballero, J.L., y Jiménez-Sánchez, A. (2003) Ribonucleoside diphosphate reductase is a functional and structural component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Recent Res. Devel. Mol. Biol.* 1: 29-43.
- Han, J.S., Kang, S., Lee, H., Kim, H.K., y Hwang, D.S. (2003) Sequential binding of SeqA to paired hemi-methylated GATC sequences mediates formation of higher order complexes. *J Biol Chem* 278: 34983-34989.
- Han, J.S., Kang, S., Kim, S.H., Ko, M.J., y Hwang, D.S. (2004) Binding of SeqA protein to hemi-methylated GATC sequences enhances their interaction y aggregation properties. *J Biol Chem* 279: 30236-30243.
- Heller, R.C., y Marians, K.J. (2005) The disposition of nascent strands at stalled replication forks dictates the pathway of replisome loading during restart. *Mol Cell* 17: 733-743.
- Helmstetter, C.E. (1996) Timing of Synthetic Activities in the Cell Cycle. *Escherichia coli y Salmonella: Cellular y Molecular Biology*. 2 edit. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C.: 1627-1639.
- Higgins, N.P., Kato, K., y Strauss, B. (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* 101: 417-425.
- Hill, T.M. (1996) Features of the chromosomal terminus region. In Neidhardt, F. C. et al. (eds), *Escherichia coli y Salmonella typhimurium: Cellular y Molecular Biology*. ASM Press, Washington, DC.: 1602-1614.

## Bibliografía

---

- Hingorani, M.M., y O'Donnell, M. (1998) ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 273: 24550-24563.
- Hiraga, S., Ichinose, C., Niki, H., y Yamazoe, M. (1998) Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E. coli*. *Mol Cell* 1: 381-387.
- Hiraga, S. (2000) Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu Rev Genet* 34: 21-59.
- Hishida, T., Han, Y.W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H., y Shinagawa, H. (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev* 18: 1886-1897.
- Holly, I.B. (1987) Genetic analysis of the *E. coli* division clock. *Cell* 48: 361-362.
- Holmgren, A., y Bjornstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252: 199-208.
- Horiuchi, T., Fujimura, Y., Nishitani, H., Kobayashi, T., y Hidaka, M. (1994) The DNA replication fork blocked at the *ter* site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J Bacteriol* 176: 4656-4663.
- Horiuchi, T., y Fujimura, Y. (1995) Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork: a model based on analysis of an *Escherichia coli* strain with a chromosome region difficult to replicate. *J Bacteriol* 177: 783-791.
- Hou, R., y Hill, T.M. (2002) Loss of RecA function affects the ability of *Escherichia coli* to maintain recombinant plasmids containing a *ter* site. *Plasmid* 47: 36-50.
- Howard-Flanders, P., Theriot, L., y Stedeford, J.B. (1969) Some properties of excision-defective recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 97: 1134-1141.

- Jeruzalmi, D., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2001) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 106: 429-441.
- Ji, J.P., y Mathews, C.K. (1991) Analysis of mutagenesis induced by a thermolabile T4 phage deoxycytidylate hydroxymethylase suggests localized deoxyribonucleotide pool imbalance. *Mol Gen Genet* 226: 257-264.
- Jiménez-Sánchez, A., y Guzmán, E.C. (1988) Direct procedure for the determination of the number of replication forks and the reinitiation fraction in bacteria. *CABIOS* 4: 431-433.
- Johnson, A., y O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* 74: 283-315.
- Jones, J.M., y Nakai, H. (2000) PriA y phage T4 gp59: factors that promote DNA replication on forked DNA substrates microreview. *Mol Microbiol* 36: 519-527.
- Jordan, A., y Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67: 71-98.
- Kang, S., Han, J.S., Park, J.H., Skarstad, K., y Hwang, D.S. (2003) SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278: 48779-48785.
- Katayama, T., y Kornberg, A. (1994) Hyperactive initiation of chromosomal replication *in vivo* and *in vitro* by a mutant initiator protein, DnaAcos, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269: 12698-12703.
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., y Sekimizu, K. (1998) The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94: 61-71.
- Katayama, T., y Sekimizu, K. (1999) Inactivation of *Escherichia coli* DnaA protein by DNA polymerase III and negative regulations for initiation of chromosomal replication. *Biochimie* 81: 835-840.
- Kato, J., y Katayama, T. (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *Embo J* 20: 4253-4262.

## Bibliografía

---

- Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* 64: 171-200.
- Kim, J., Shen, R., Olcott, M.C., Rajagopal, I., y Mathews, C.K. (2005a) Adenylate kinase of *Escherichia coli*, a component of the phage T4 dNTP synthetase complex. *J Biol Chem* 280: 28221-28229.
- Kim, J., Wheeler, L.J., Shen, R., y Mathews, C.K. (2005b) Protein-DNA interactions in the T4 dNTP synthetase complex dependent on gene 32 single-stranded DNA-binding protein. *Mol Microbiol* 55: 1502-1514.
- Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., y Marians, K.J. (1996) Coupling of a replicative polymerase y helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* 84: 643-650.
- Kogoma, T. (1996) Recombination by replication. *Cell* 85: 625-627.
- Kogoma, T., Cadwell, G.W., Barnard, K.G., y Asai, T. (1996) The DNA replication priming protein, PriA, is required for homologous recombination and double-strand break repair. *J Bacteriol* 178: 1258-1264.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 212-238.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69: 425-437.
- Kornberg, A., y Baker, T. (1991) DNA Replication. 2nd Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, California.
- Kornberg, A., y Baker, T.A. (1992) DNA Replication. W. H. Freeman and Company, New York.
- Kowalczykowski, S.C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25: 156-165.

- Krause, M., y Messer, W. (1999) DnaA proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: coordinate actions with single-stranded DNA-binding protein and interspecies inhibition during open complex formation at the replication origins. *Gene* 228: 123-132.
- Kreuzer, K.N., y Morrical, S.W. (1994) *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. (J. D. Karam, ed.) American Society for Microbiology, Washington, D. C.: 28-42.
- Kuzminov, A. (1995) Collapse y repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16: 373-384.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 751-813.
- Kuzminov, A. (2001) Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8241-8246.
- LaDuca, R.J., Crute, J.J., McHenry, C.S., y Bambara, R.A. (1986) The beta subunit of the *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme interacts functionally with the catalytic core in the absence of other subunits. *J Biol Chem* 261: 7550-7557.
- Lane, H.E., y Denhardt, D.T. (1975) The *rep* mutation. IV. Slower movement of replication forks in *Escherichia coli rep* strains. *J Mol Biol* 97: 99-112.
- Learn, B.A., Um, S.J., Huang, L., y McMacken, R. (1997) Cryptic single-stranded-DNA binding activities of the phage lambda P and *Escherichia coli* DnaC replication initiation proteins facilitate the transfer of *E. coli* DnaB helicase onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1154-1159.
- Lee, E.H., y Kornberg, A. (1991) Replication deficiencies in *priA* mutants of *Escherichia coli* lacking the primosomal replication n' protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3029-3032.
- Lehman, I.R. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 186: 790-797.

## Bibliografía

---

- Lehman, I.R., y Uyemura, D.G. (1976) DNA polymerase I: essential replication enzyme. *Science* 193: 963-969.
- Leonard, A.C., y Grimwade, J.E. (2005) Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol* 55: 978-985.
- Leu, F.P., Hingorani, M.M., Turner, J., y O'Donnell, M. (2000) The delta subunit of DNA polymerase III holoenzyme serves as a sliding clamp unloader in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 34609-34618.
- Leu, F.P., Georgescu, R., y O'Donnell, M. (2003) Mechanism of the *E. coli* tau processivity switch during lagging-strand synthesis. *Mol Cell* 11: 315-327.
- Li, X., y Marians, K.J. (2000) Two distinct triggers for cycling of the lagging strand polymerase at the replication fork. *J Biol Chem* 275: 34757-34765.
- Lloyd, R.G., y Sharples, G.J. (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *Embo J* 12: 17-22.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., y Kleckner, N. (1994) SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77: 413-426.
- Ludlam, A.V., McNatt, M.W., Carr, K.M., y Kaguni, J.M. (2001) Essential amino acids of *Escherichia coli* DnaC protein in an N-terminal domain interact with DnaB helicase. *J Biol Chem* 276: 27345-27353.
- Maisnier-Patin, S., Nordstrom, K., y Dasgupta, S. (2001a) Replication arrests during a single round of replication of the *Escherichia coli* chromosome in the absence of DnaC activity. *Mol Microbiol* 42: 1371-1382.
- Maisnier-Patin, S., Nordstrom, K., y Dasgupta, S. (2001b) RecA-mediated rescue of *Escherichia coli* strains with replication forks arrested at the terminus. *J Bacteriol* 183: 6065-6073.
- Maki, H., y Kornberg, A. (1985) The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Purification of the alpha subunit, devoid of nuclease activities. *J Biol Chem* 260: 12987-12992.

- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673-719.
- Marians, K.J. (2000) PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 25: 185-189.
- Mathews, C.K. (1972) Biochemistrand of deoxyribonucleic acid-defective amber mutants of bacteriophage T4. 3. Nucleotide pools. *J Biol Chem* 247: 7430-7438.
- Mathews, C.K. (1976) Biochemistrand of DNA-defective mutants of bacteriophage T4. Thymine nucleotide pool dynamics. *Arch Biochem Biophys* 172: 178-187.
- Mathews, C.K., y Sinha, N.K. (1982) Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 302-306.
- Mathews, C.K., Sjoberg, B.M., y Reichard, P. (1987) Ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. Cross-linking agents as probes of quaternary and quinary structure. *Eur J Biochem* 166: 279-285.
- Mathews, C.K. (1993) Enzyme organization in DNA precursor biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 44: 167-203.
- Matson, S.W., Bean, D.W., y George, J.W. (1994) DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioessays* 16: 13-22.
- McGarry, K.C., Ryan, V.T., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (2004) Two discriminatory binding sites in the *Escherichia coli* replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2811-2816.
- McGlynn, P., y Lloyd, R.G. (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. *Cell* 101: 35-45.
- McGlynn, P., Lloyd, R.G., y Marians, K.J. (2001) Formation of Holliday junctions by regression of nascent DNA in intermediates containing stalled replication forks: RecG stimulates regression even when the DNA is negatively supercoiled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8235-8240.

## Bibliografía

---

- McGlynn, P., y Lloyd, R.G. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 859-870.
- McGlynn, P. (2004) Links between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 14: 107-112.
- McHenry, C.S., y Crow, W. (1979) DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits. *J Biol Chem* 254: 1748-1753.
- McHenry, C.S., y Johanson, K.O. (1984) DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: an asymmetric dimeric replicative complex containing distinguishable leading and lagging strand polymerases. *Adv Exp Med Biol* 179: 315-319.
- McHenry, C.S. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol* 49: 1157-1165.
- Messer, W., y Weigel, C. (1996) Initiation of chromosome replication. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2 edit. F. C. Neidhardt et al. (eds.), ASM, Washington, D.C.: 1579-1601.
- Messer, W., Blaesing, F., Jakimowicz, D., Krause, M., Majka, J., Nardmann, J., Schaper, S., Seitz, H., Speck, C., Weigel, C., Wegrzyn, G., Welzeck, M., y Zakrzewska-Czerwinska, J. (2001) Bacterial replication initiator DnaA. Rules for DnaA binding y roles of DnaA in origin unwinding and helicase loading. *Biochimie* 83: 5-12.
- Messer, W. (2002) The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* 26: 355-374.
- Michel, B., Ehrlich, S.D., y Uzest, M. (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *Embo J* 16: 430-438.
- Michel, B. (2000) Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25: 173-178.

- Michel, B., Recchia, G.D., Penel-Colin, M., Ehrlich, S.D., y Sherratt, D.J. (2000) Resolution of holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in *rep* mutants and UV-irradiated cells. *Mol Microbiol* 37: 180-191.
- Michel, B., Flores, M.J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., y Bidnenko, V. (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8181-8188.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M.J., y Bidnenko, V. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12783-12788.
- Miller, J.F. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Miranda, A., y Kuzminov, A. (2003) Chromosomal lesion suppression and removal in *Escherichia coli* via linear DNA degradation. *Genetics* 163: 1255-1271.
- Mizushima, T., Nishida, S., Kurokawa, K., Katayama, T., Miki, T., y Sekimizu, K. (1997) Negative control of DNA replication by hydrolysis of ATP bound to DnaA protein, the initiator of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* 16: 3724-3730.
- Molina, F., Jimenez-Sanchez, A., y Guzman, E.C. (1998) Determining the optimal thymidine concentration for growing *thy-* *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 180: 2992-2994.
- Molina, F., y Skarstad, K. (2004) Replication fork y SeqA focus distributions in *Escherichia coli* suggest a replication hyperstructure dependent on nucleotide metabolism. *Mol Microbiol* 52: 1597-1612.
- Morigen, Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (2003) Titration of the *Escherichia coli* DnaA protein to excess *datA* sites causes destabilization of replication forks, delayed replication initiation and delayed cell division. *Mol Microbiol* 50: 349-362.

## Bibliografía

---

- Mulugu, S., Potnis, A., Shamsuzzaman, Taylor, J., Alexyer, K., y Bastia, D. (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9569-9574.
- Neuhard, J. (1967) Studies on the acid-soluble nucleotide pool in *Escherichia coli*. IV. Effects of hydroxyurea. Biochim Biophys Acta 145: 1-6.
- Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., y Hiraga, S. (1992) *E.coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod- and -hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. Embo J 11: 5101-5109.
- Nordlund, P., y Eklund, H. (1993) Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. J Mol Biol 232: 123-164.
- Norris, V., Alexandre, S., Bouligand, Y., Cellier, D., Demarty, M., Grehan, G., Gouesbet, G., Guespin, J., Insinna, E., Le Sceller, L., Maheu, B., Monnier, C., Grant, N., Onoda, T., Orange, N., Oshima, A., Picton, L., Polaert, H., Ripoll, C., Thellier, M., Valleton, J.M., Verdus, M.C., Vincent, J.C., White, G., y Wiggins, P. (1999) Hypothesis: hyperstructures regulate bacterial structure and the cell cycle. Biochimie 81: 915-920.
- Norris, V., Fralick, J., y Danchin, A. (2000) A SeqA hyperstructure and its interactions direct the replication and sequestration of DNA. Mol Microbiol 37: 696-702.
- Norris, V., Demarty, M., Raine, D., Cabin-Flaman, A., y Le Sceller, L. (2002) Hypothesis: hyperstructures regulate initiation in *Escherichia coli* y other bacteria. Biochimie 84: 341-347.
- North, T.W., Stafford, M.E., y Mathews, C.K. (1976) Biochemistrand of DNA-defective mutants of bacteriophage T4. VI. Biological functions of gene 42. J Virol 17: 973-982.
- Nurse, P., Zavitz, K.H., y Mariani, K.J. (1991) Inactivation of the *Escherichia coli* *priA* DNA replication protein induces the SOS response. J Bacteriol 173: 6686-6693.

- O'Donnell, M.E. (1987) Accessory proteins bind a primed template and mediate rapid cycling of DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*. J Biol Chem 262: 16558-16565.
- Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M.L., Sogo, J.M., Stasiak, A., Hernyecz, P., Krimer, D.B., y Schwartzman, J.B. (2002) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. Nucleic Acids Res 30: 656-666.
- Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M., y Reichard, P. (1996) The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure y iron sulfur center. J Biol Chem 271: 9410-9416.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Turner, J., Naktinis, V., y O'Donnell, M. (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. III. Interface between two polymerases and the clamp loader. J Biol Chem 270: 13366-13377.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R., y Blakley, R.L. (1972) A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. Biochemistrand 11: 2378-2388.
- Pato, M.L. (1979) Alterations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in *Escherichia coli*: effects on deoxyribonucleic acid replication and evidence for compartmentation. J Bacteriol 140: 518-524.
- Peral, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., y Louarn, J.M. (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. Mol Microbiol 36: 33-43.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V., y Cozzarelli, N.R. (2001) Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. J Biol Chem 276: 2790-2796.
- Pritchard, R.H., y Zaritsky, A. (1970) Effect of thymine concentration on the replication velocity of DNA in a thymineless mutant of *Escherichia coli*. Nature 226: 126-131.

## Bibliografía

---

- Pritchard, A.E., Dallmann, H.G., Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of  $\Delta\Delta'$  with DnaX(4) forms DnaX(3) $\Delta\Delta'$ . *Embo J* 19: 6536-6545.
- Recchia, G.D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G., y Sherratt, D.J. (1999) FtsK-dependent and independent pathways of *xer* site-specific recombination. *Embo J* 18: 5724-5734.
- Reddy, G.P., Singh, A., Stafford, M.E., y Mathews, C.K. (1977) Enzyme associations in T4 phage DNA precursor synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3152-3156.
- Reddy, G.P., y Mathews, C.K. (1978) Functional compartmentation of DNA precursors in T4 phage-infected bacteria. *J Biol Chem* 253: 3461-3467.
- Reems, J.A., Wood, S., y McHenry, C.S. (1995) *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme subunits alpha, beta, and gamma directly contact the primer-template. *J Biol Chem* 270: 5606-5613.
- Reichard, P., y Ehrenberg, A. (1983) Ribonucleotide reductase: a radical enzyme. *Science* 221: 514-519.
- Reichard, P. (1993a) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 8383-8386.
- Reichard, P. (1993b) From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260: 1773-1777.
- Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem Sci* 22: 81-85.
- Roberts, J.W., Phizicky, E.M., Burbee, D.G., Roberts, C.W., y Moreau, P.L. (1982) A brief consideration of the SOS inducing signal. *Biochimie* 64: 805-807.
- Robu, M.E., Inman, R.B., y Cox, M.M. (2001) RecA protein promotes the regression of stalled replication forks *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8211-8218.

- Robu, M.E., Inman, R.B., y Cox, M.M. (2004) Situational repair of replication forks: roles of RecG and RecA proteins. *J Biol Chem* 279: 10973-10981.
- Rosenkranz, H.S., y Carr, H.S. (1966) Studies with hydroxyurea. II. Prolonged exposure of *Escherichia coli* to hydroxyurea. *J Bacteriol* 92: 178-185.
- Rosenkranz, H.S., Garro, A.J., Levy, J.A., y Carr, H.S. (1966) Studies with hydroxyurea. I. The reversible inhibition of bacterial DNA synthesis and the effect of hydroxyurea on the bactericidal action of streptomycin. *Biochim Biophys Acta* 114: 501-515.
- Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Nievera, C.J., y Leonard, A.C. (2002) IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli oriC* by two different mechanisms. *Mol Microbiol* 46: 113-124.
- Sahapiro, H.M. (1995) *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss.
- Sandler, S.J., Samra, H.S., y Clark, A.J. (1996) Differential suppression of *priA2::kan* phenotypes in *Escherichia coli* K-12 by mutations in *priA*, *lexA*, and *dnaC*. *Genetics* 143: 5-13.
- Sandler, S.J. y Mariani, K.J. (2000) Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182: 9-13.
- Sassanfar, M., y Roberts, J.W. (1990) Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J Mol Biol* 212: 79-96.
- Sawitzke, J.A., y Austin, S. (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1671-1676.
- Schaper, S., y Messer, W. (1995) Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J Biol Chem* 270: 17622-17626.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95: 419-430.
- Seigneur, M., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2000) RuvABC-dependent double-strand breaks in *dnaBts* mutants require RecA. *Mol Microbiol* 38: 565-574.

## Bibliografía

---

- Sekimizu, K., Bramhill, D., y Kornberg, A. (1987) ATP activates DnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* 50: 259-265.
- Slater, S.C., Lifšics, M.R., O'Donnell, M., y Maurer, R. (1994) *holE*, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a *holE* mutant and comparison with a *dnaQ* (epsilon-subunit) mutant. *J Bacteriol* 176: 815-821.
- Smith, G.R. (1991) Conjugal recombination in *E. coli*: myths y mechanisms. *Cell* 64: 19-27.
- Srere, P.A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu Rev Biochem* 56: 89-124.
- Stayton, M.M., y Kornberg, A. (1983) Complexes of *Escherichia coli* primase with the replication origin of G4 phage DNA. *J Biol Chem* 258: 13205-13212.
- Steen, H.B. (1980) Further developments of a microscope-based flow cytometer: light scatter detection and excitation intensity compensation. *Cytometry* 1: 26-31.
- Steen, H.B., y Boye, E. (1981) *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *J Bacteriol* 145: 1091-1094.
- Steiner, W.W., y Kuempel, P.L. (1998) Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J Bacteriol* 180: 6269-6275.
- Studwell, P.S., y O'Donnell, M. (1990) Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 265: 1171-1178.
- Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1993) DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by *holE*. *J Biol Chem* 268: 11785-11791.
- Stukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1991) Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 266: 11328-11334.

- Stukenberg, P.T., Turner, J., y O'Donnell, M. (1994) An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell* 78: 877-887.
- Sueoka, N., y Yoshikawa, H. (1965) The chromosome of *Bacillus subtilis*. I. Theory of marker frequency analysis. *Genetics* 52: 747-757.
- Sun, W., y Godson, G.N. (1996) Interaction of *Escherichia coli* primase with a phage G4ori(c)-E. coli SSB complex. *J Bacteriol* 178: 6701-6705.
- Sun, W., y Godson, G.N. (1998) Structure of the *Escherichia coli* primase/single-strand DNA-binding protein/phage G4oric complex required for primer RNA synthesis. *J Mol Biol* 276: 689-703.
- Sun, X., Ollagnier, S., Schmidt, P.P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliasson, R., Graslund, A., Fontecave, M., Reichard, P., y Sjoberg, B.M. (1996) The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. *J Biol Chem* 271: 6827-6831.
- Thelander, L., y Reichard, P. (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* 48: 133-158.
- Tomich, P.K., Chiu, C.S., Wovcha, M.G., y Greenberg, G.R. (1974) Evidence for a complex regulating the *in vivo* activities of early enzymes induced by bacteriophage T4. *J Biol Chem* 249: 7613-7622.
- Tougu, K., Peng, H., y Marians, K.J. (1994) Identification of a domain of *Escherichia coli* primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J Biol Chem* 269: 4675-4682.
- Tougu, K., y Marians, K.J. (1996a) The interaction between helicase y primase sets the replication fork clock. *J Biol Chem* 271: 21398-21405.
- Tougu, K., y Marians, K.J. (1996b) The extreme C terminus of primase is required for interaction with DnaB at the replication fork. *J Biol Chem* 271: 21391-21397.

## Bibliografía

---

- Tsai, P.K., y Hogenkamp, H.P. (1980) The purification y characterization of an adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside diphosphate reductase from *Corynebacterium nephridii*. J Biol Chem 255: 1273-1278.
- Tsuchihashi, Z., y Kornberg, A. (1989) ATP interactions of the tau y gamma subunits of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. J Biol Chem 264: 17790-17795.
- Tsuchihashi, Z., y Kornberg, A. (1990) Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2516-2520.
- Turner, J., Hingorani, M.M., Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1999) The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. Embo J 18: 771-783.
- Uzest, M., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (1991) The *Escherichia coli terB* sequence affects maintenance of a plasmid with the M13 phage replication origin. J Bacteriol 173: 7695-7697.
- Wahle, E., Lasken, R.S., y Kornberg, A. (1989) The dnaB-dnaC replication protein complex of *Escherichia coli*. I. Formation y properties. J Biol Chem 264: 2463-2468.
- Webb, C.D., Graumann, P.L., Kahana, J.A., Teleman, A.A., Silver, P.A., y Losick, R. (1998) Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 28: 883-892.
- Weitao, T., Dasgupta, S., y Nordstrom, K. (2000) Role of the *mukB* gene in chromosome y plasmid partition in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 38: 392-400.
- West, S.C. (1997) Processing of recombination intermediates by the RuvABC proteins. Annu Rev Genet 31: 213-244.
- Wheeler, L., Wang, Y., y Mathews, C.K. (1992) Specific associations of T4 bacteriophage proteins with immobilized deoxycytidylate hydroxymethylase. J Biol Chem 267: 7664-7670.

- Wheeler, L.J., Ray, N.B., Ungermann, C., Hendricks, S.P., Bernard, M.A., Hanson, E.S., y Mathews, C.K. (1996) T4 phage gene 32 protein as a cytidate organizing factor for the deoxyribonucleoside triphosphate synthetase complex. *J Biol Chem* 271: 11156-11162.
- Whitby, M.C., Vincent, S.D., y Lloyd, R.G. (1994) Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *Embo J* 13: 5220-5228.
- Wu, C.A., Zechner, E.L., Reems, J.A., McHenry, C.S., y Marians, K.J. (1992) Coordinated leading- y 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.
- Yamaichi, Y., y Niki, H. (2004) migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *Embo J* 23: 221-233.
- Yao, N., Leu, F.P., Anjelkovic, J., Turner, J., y O'Donnell, M. (2000) DNA structure requirements for the *Escherichia coli* gamma complex clamp loader y DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 275: 11440-11450.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1999) Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer hyoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell* 96: 153-163.
- Zavitz, K.H., y Marians, K.J. (1991) Dissecting the functional role of PriA protein-catalysed primosome assembly in *Escherichia coli* DNA replication. *Mol Microbiol* 5: 2869-2873.
- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992a) Coordinated leading- y lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. II. Frequency of primer synthesis y efficiency of primer utilization control Okazaki fragment size. *J Biol Chem* 267: 4045-4053.
- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992b) Coordinated leading- y lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. III. A polymerase-primase interaction governs primer size. *J Biol Chem* 267: 4054-4063.

## *Bibliografía*

---

- Zheng L, Z.M., Chai Q, Parrish J, Xue D, patrick SM, Turchi JJ, Yannone SM, Chen D y ShenB. (2005) Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks. *EMBO Rep.* 6: 83-89.

# *Figuras y Tablas*



• FIGURAS

Fig. 1. Esquema de <i>oriC</i> .	14
Fig. 2. Apertura de <i>oriC</i> e inicio de la replicación.	15
Fig. 3. Montaje del replisoma tras iniciarse la replicación en <i>oriC</i> .	16
Fig. 4. Dinámica del replisoma de <i>Escherichia coli</i> .	21
Fig. 5. Formación de roturas de DNA de doble cadena por <i>colapso</i> de la horquilla de replicación.	28
Fig. 6. Modelo de la <i>Reversión de la Horquilla de Replicación</i> (adaptado de Michel <i>et al.</i> , 2004; Seigneur <i>et al.</i> , 1998).	31
Fig. 7. Ensamblaje del primosoma mediado por PriA.	35
Fig. 8. Esquema de la enzima NDP reductasa (Thelander y Reichard, 1979).	36
Fig. 9. Síntesis de DNA en JS1018.	39
Fig. 10. Procesamiento del gel de campo pulsante.	69
Fig. 11. DNA lineal de JK607, JK626, JS1018 y JS628 creciendo exponencialmente a 30°C.	85
Fig. 12. Degradación de DNA en estirpes con actividad RecBCD.	98
Fig. 13. Síntesis relativa de DNA de la estirpe JS1018 en presencia de rifampicina a 30°C tras incubación durante distintos tiempos a 42°C.	102
Fig. 14. Síntesis de DNA de JS1018, JS627, y JS891 incubadas a 42°C.	103
Fig. 15. Tiempo de generación de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C.	105

## Índice de figuras y tablas

---

Fig. 16. Síntesis de DNA de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C tras inhibir nuevos inicios de replicación.	106
Fig. 17. Citometrías de flujo de JS1018.	107
Fig. 18. Síntesis de DNA de JS1018 a 42°C tras crecer exponencialmente a 30°C o a 37°C.	110
Fig. 19. Síntesis de DNA de JS628.	115
Fig. 20. Síntesis de DNA de JK626.	116
Fig. 21. Recuperación de horquillas de replicación paradas en estirpes <i>nrdA</i> <sup>+</sup> .	121
Fig. 22. Recuperación de horquillas de replicación paradas en estirpes <i>nrdA101</i> .	122
Fig. 23. Capacidad del mutante <i>nrdA101</i> de generar <i>RFR</i> bajo distintas condiciones restrictivas para la NDP reductasa.	134

### • TABLAS

Tabla 1. Estirpes de <i>E. coli</i> K-12 empleadas en este trabajo.	49
Tabla 2. Porcentaje de DNA lineal obtenido durante el crecimiento exponencial a 30°C.	86
Tabla 3. Periodo <i>C</i> en función de la concentración de timidina en el medio de cultivo.	88
Tabla 4. Porcentaje de DNA lineal en función de la concentración de timidina.	88
Tabla 5. Porcentaje de DNA lineal en la estirpe <i>nrdA101</i> en ausencia de RecG o de RecA.	94
Tabla 6. Viabilidad de la estirpe <i>nrdA101</i> en ausencia de proteínas de recombinación.	95
Tabla 7. Parámetros de ciclo celular de JS1018 creciendo a 30°C y a 37°C.	107

## Índice de figuras y tablas

---

<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de DNA lineal en la estirpe <i>nrdA101</i> creciendo a 30°C y a 37°C.	108
<b>Tabla 9.</b> Viabilidad del mutante <i>nrdA101</i> a 30°C y a 37°C en ausencia de proteínas de recombinación y de PriA.	109
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de DNA lineal tras la inhibición de la NDP reductasa.	117

## *Índice de figuras y tablas*

---

