

UNIVERSIDAD  DE EXTREMADURA
**U
EX**

TESIS DOCTORAL

Replicación inducida por estrés térmico en bacterias y plásmidos

Belén Mendoza Chamizo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

2016



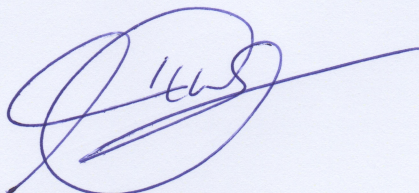
TESIS DOCTORAL

**Replicación inducida por estrés térmico
en bacterias y plásmidos**

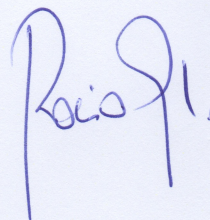
Belén Mendoza Chamizo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Conformidad de las Directoras:



Fdo: Dra. Emilia Botello Cambero



Fdo: Dra. M^a del Rocío González Soltero

2016



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA**

**Área de Genética
Facultad de Ciencias**

Campus Universitario, Edificio de Biología
Av. de Elvas, 06006 BADAJOZ

Emilia Botello Cambero, Profesora Contratado Doctor del Área de Genética del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, y **M^a del Rocío González Soltero**, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Biomédicas Básicas de la Universidad Europea de Madrid

CERTIFICAN

que el presente trabajo de investigación, titulado '**Replicación inducida por estrés térmico en bacterias y plásmidos**', ha sido realizado por la **Lcda. Belén Mendoza Chamizo** bajo nuestra dirección, en el Área de Genética del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, para optar al Título de Doctora.

Para que conste a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Badajoz a 9 de noviembre de 2015.

Fdo.: Dra. Emilia Botello Cambero

Fdo.: Dra. M^a del Rocío González Soltero

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	XIII
RESUMEN / SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Ciclo celular bacteriano	9
2. Topología cromosómica	10
3. Replicación cromosómica	11
3.1. Etapas de la replicación cromosómica en <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.1. Iniciación	12
3.1.1.1. Estructura de <i>oriC</i>	14
3.1.1.2. Control de la replicación en el inicio	15
3.1.2. Elongación	16
3.1.3. Terminación	17
3.2. Replicación en <i>Salmonella typhimurium</i>	17
3.3. Replicación en <i>Bacillus subtilis</i>	18
3.4. Replicación en <i>Vibrio cholerae</i>	19
4. Replicación de minicromosomas y plásmidos en <i>Escherichia coli</i>	21
4.1. Replicación de minicromosomas	22
4.2. Replicación de plásmidos	23
4.2.1. Plásmidos con control por iterones	23
4.2.1.1. Plásmido F	24
4.2.1.2. Plásmido P1	25
4.2.1.3. Plásmido pSC101	26
4.2.2. Plásmidos con control por RNA antisentido	26
4.2.2.1. Plásmido R1	27
4.2.2.2. Familia ColE1	28
4.2.2.2.1. Plásmido p15A	29
4.2.2.2.2. Plásmido pBR322	29
5. Respuestas bacterianas frente al estrés	30
5.1. Estrés térmico y cambios fisiología bacteriana	31
5.2. Replicaciones de estrés	31
5.2.1. HIR, la replicación inducida por estrés térmico en <i>E. coli</i>	32

OBJETIVOS Y APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	35
MATERIALES	39
1. Estirpes bacterianas	41
2. Productos químicos	41
2.1. Antibióticos	42
2.2. Productos radiactivos	43
3. Soluciones y tampones	43
3.1. Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico	43
3.2. Medida de la síntesis de DNA <i>in vivo</i>	43
3.3. Manipulación <i>in vivo</i> de bacterias	43
3.4. Electroforesis de DNA	44
3.5. Citometría de flujo	44
3.6. Microscopía	45
4. Medios de crecimiento	45
5. Enzimas	45
6. Marcadores de DNA, oligonucleótidos y secuencias	46
6.1. Marcadores para electroforesis	46
6.2. Oligonucleótidos	46
6.3. Secuencias	47
7. Kits	47
MÉTODOS	49
1. Crecimiento de estirpes	51
2. Cambio de las condiciones de crecimiento	51
3. Conservación de las estirpes bacterianas	52
4. Medida de la síntesis de DNA y análisis de HIR	52
4.1. Marcaje de DNA <i>in vivo</i>	52
4.2. Medida de la síntesis de DNA	53
4.2.1. Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial	53

4.2.2.	Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los inicios de replicación	53
4.2.3.	Medida de la síntesis de DNA tras inducción de los orígenes de replicación por estrés térmico: análisis de HIR	53
5.	Aislamiento de DNA	54
5.1.	DNA cromosómico	54
5.2.	DNA plasmídico	54
5.2.1.	Aislamiento por lisis alcalina	55
5.2.2.	Aislamiento por el método de precipitación con polietilenglicol (PEG)	55
6.	Purificación y concentración de DNA	55
6.1.	Purificación mediante extracción con fenol:cloroformo	55
6.2.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	56
6.3.	Concentración de DNA mediante precipitación	56
7.	Electroforesis de DNA	56
8.	Medida de la concentración de DNA por espectrofotometría	57
9.	Transformación	57
9.1.	Transformación por el método de cloruro cálcico	57
9.2.	Transformación mediante electroporación	58
10.	Citometría de flujo	58
10.1.	Fundamento de la citometría de flujo	58
10.2.	Tratamiento y análisis de las muestras	59
10.2.1.	Tratamiento de los cultivos y fijación de las células	59
10.2.2.	Tinción con mitramicina-bromuro de etidio	59
10.2.3.	Tinción con PicoGreen o SybrGreen	60
10.2.4.	Análisis de las muestras	60
11.	Determinación del número de células por volumen	61
11.1.	Análisis de células viables	61
11.2.	Recuento con citómetro de flujo	61
12.	Determinación del número de copias de minicromosomas y plásmidos	61
12.1.	Espectrofluorimetría	62
12.1.1.	Medida del número de copias en cultivo exponencial mediante espectrofluorimetría	62
12.1.2.	Medida de la inducción de la replicación en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico mediante espectrofluorimetría	62
12.2.	Citometría de flujo	63
12.2.1.	Medida del número de copias en cultivo exponencial mediante citometría de flujo	63

12.2.2. Medida de la inducción de la replicación en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico mediante citometría de flujo	63
13. PCR cuantitativa a tiempo real	63
13.1. Toma de muestras	64
13.2. Condiciones de la reacción	64
13.3. Determinación de la relación origen/término en cromosomas	66
13.4. Construcción de rectas estándar para cuantificación del número de copias de plásmido	67
14. Microscopía de contraste de fase y epifluorescencia	68
14.1. Preparación de las muestras	68
14.2. Análisis de las muestras	69
15. Análisis de secuencias de orígenes de replicación	69
15.1. Curva Z	69
15.2. Predicción de sitios SIDD	70
RESULTADOS	73
1. REPLICACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS TÉRMICO EN CROMOSOMAS BACTERIANOS	75
1.1. Análisis de HIR por acumulación de DNA tras la inhibición del inicio de replicación (Δ DNA)	75
1.1.1. HIR por acumulación de DNA en <i>E. coli</i>	76
1.1.2. HIR por acumulación de DNA en <i>S. typhimurium</i>	78
1.1.3. HIR por acumulación de DNA en <i>B. subtilis</i>	80
1.1.4. HIR por acumulación de DNA en <i>V. cholerae</i>	82
1.2. Análisis de HIR por citometría de flujo y microscopía	85
1.2.1. HIR por citometría de flujo y microscopía en <i>E. coli</i>	85
1.2.2. HIR por citometría de flujo y microscopía en <i>S. typhimurium</i>	88
1.2.3. HIR por citometría de flujo y microscopía en <i>B. subtilis</i>	91
1.2.4. HIR por citometría de flujo y microscopía en <i>V. cholerae</i>	93
1.3. Análisis de sitios SIDD en los orígenes de replicación cromosómica	96
1.4. Análisis de HIR por qPCR	97
1.4.1. Validación del método: curvas estándar y eficiencia de la reacción	97
1.4.2. Análisis de la relación origen/término en HIR	100
1.5. Dependencia de RecA en HIR	102
1.6. Ampliación de la caracterización de HIR en <i>E. coli</i>	103

1.6.1.	Determinación del tiempo de inducción de HIR tras el cambio de temperatura	103
1.6.2.	Análisis por citometría de flujo del efecto del cambio de temperatura en cultivos no tratados	104
2.	REPLICACIÓN EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS DE <i>E. coli</i>	107
2.1.	Inducción de la replicación por estrés térmico en minicromosomas y plásmidos de	107
2.1.1.	Inducción de la replicación en minicromosomas	108
2.1.2.	Inducción de la replicación en plásmidos con control de la replicación por iterones	110
2.1.3.	Inducción de la replicación en plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido	111
2.1.4.	Variación del tamaño celular por cambio de temperatura	112
2.2.	Número de copias de minicromosoma y plásmido en crecimiento exponencial a diferentes temperaturas	112
2.2.1.	Tamaño celular durante el crecimiento exponencial a diferentes temperaturas	114
2.3.	Número de copias de plásmido a distintas velocidades de crecimiento	115
2.3.1.	Variación de la velocidad de crecimiento debida a la temperatura	115
2.3.2.	Variación de la velocidad de crecimiento debida al medio	116
2.4.	Análisis de sitios SIDD en los orígenes de replicación de plásmidos	118
2.5.	Influencia de RecA en la replicación de plásmidos	119
2.5.1.	Influencia de RecA en el número de copias por masa con cambio de temperatura	120
2.5.2.	Influencia de RecA en el número de copias por masa en cultivos exponenciales	122
2.6.	Determinación del número de copias de plásmido por qPCR	123
2.6.1.	Validación del método: curvas estándar y eficiencia de la reacción	124
2.6.2.	Cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR en cultivos exponenciales	126
2.6.3.	Transformación de la cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR a copias por masa y copias por célula	126
2.7.	Comparación de la cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR, espectrofluorimetría y citometría de flujo	127

DISCUSIÓN	131
1. La replicación inducida por estrés térmico es una respuesta generalizada en los cromosomas bacterianos	133
1.1. Ampliación de la caracterización de HIR en <i>E. coli</i>	139
2. El estrés térmico induce la replicación en minicromosomas y plásmidos como adaptación a la nueva temperatura de crecimiento	140
2.1. El número de copias depende directamente de la velocidad de crecimiento de un cultivo determinada por la temperatura	141
2.2. La influencia de RecA en la replicación de plásmidos depende de las condiciones de crecimiento	142
2.3. Los orígenes de la replicación de plásmidos presentan sitios SIDD	143
2.4. La espectrofluorimetría, un método eficiente para la determinación del número de copias de plásmido	144
CONCLUSIONES / CONCLUDING REMARKS	147
AGRADECIMIENTOS	151
BIBLIOGRAFÍA	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

- Figura 1.** Modelo del ensamblaje del complejo pre-replicativo (modificado de Rozgaja *et al.*, 2012). 13
- Figura 2.** Estructura de la región del origen de replicación de *E. coli*, *oriC*. 13
- Figura 3.** Mecanismo del inicio de la replicación en la región cromosómica del origen de *E. coli*. 14
- Figura 4.** Estructura de la región del origen de replicación de *B. subtilis*, *oriC* (modificado de Charbon y Løbner-Olesen, 2011; Rajewska *et al.*, 2012; Wolanski *et al.*, 2015). 18
- Figura 5.** Estructura de la región del origen de replicación del cromosoma I y la región mínima requerida para la replicación del cromosoma II de *V. cholerae*, *oriCI* y *oriCII* respectivamente. 20
- Figura 6.** Mecanismos de control de la regulación de la replicación en los plásmidos con iterones. 24
- Figura 7.** Estructura de la región del origen de los plásmidos con regulación de la replicación por iterones F (*oriS*), P1 (*oriR*) y pSC101 (*ori*). 25
- Figura 8.** Estructura de la región del origen de los plásmidos con control de la replicación por asRNA R1 (*oriR1*) y ColE1 (*ori*) (modificado de Bernander *et al.*, 1992; Cesareni *et al.*, 1991; Nordström, 2006; y del Solar *et al.*, 1998). 27
- Figura 9.** Mecanismo de regulación mediante asRNA en R1 (a) y ColE1 (b). 28

Métodos

- Figura 10.** Análisis de la curva de fusión realizado con el software iCycler iQ™ de Bio-Rad para la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2*. 65
- Figura 11.** Recta estándar de calibrado para determinar el rango dinámico lineal de la qPCR de DNA plasmídico. 66

Resultados

- Figura 12.** Acumulación de DNA en la estirpe AB1157 de *E. coli* tras la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. 76
- Figura 13.** Relación DNA/masa en la estirpe AB1157 de *E. coli* a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C. 78
- Figura 14.** Acumulación de DNA en la estirpe LT2 de *S. typhimurium* tras la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. 79
- Figura 15.** Relación DNA/masa en la estirpe LT2 de *S. typhimurium* a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C. 80
- Figura 16.** Acumulación de DNA en la estirpe BG214 de *B. subtilis* tras la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. 81
- Figura 17.** Relación DNA/masa en la estirpe BG214 de *B. subtilis* a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C. 82
- Figura 18.** Acumulación de DNA en la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* tras la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. 83

Figura 19. Relación DNA/masa en la estirpe ALO2495 de <i>V. cholerae</i> a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C.	84
Figura 20. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo tras una, dos, tres o cuatro horas de la adición de rifampicina junto con cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	85
Figura 21. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo, tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina o cloranfenicol y cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	86
Figura 22. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio rico, tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina o cloranfenicol y cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	87
Figura 23. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de <i>S. typhimurium</i> LT2 creciendo en medio mínimo tras una, dos, tres o cuatro horas de la adición de rifampicina o cloranfenicol junto con cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	88
Figura 24. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>S. typhimurium</i> LT2 creciendo en medio mínimo tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina o cloranfenicol y cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	89
Figura 25. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de <i>S. typhimurium</i> LT2 creciendo en medio rico LB tras una, dos, tres o cuatro horas de la adición de rifampicina o cloranfenicol junto con cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	90
Figura 26. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>S. typhimurium</i> LT2 creciendo en medio mínimo tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina o cloranfenicol y cefalexina a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	91
Figura 27. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>B. subtilis</i> BG214 creciendo en medio mínimo tras cinco horas de la adición de cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	92
Figura 28. Distribución de cromosomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>B. subtilis</i> BG214 creciendo en medio rico tras veinte horas de la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	93
Figura 29. Distribución de genomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>V. cholerae</i> ALO2495 creciendo en medio mínimo tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina, rifampicina, cloranfenicol y cefalexina o cloranfenicol, a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	94
Figura 30. Distribución de genomas por célula, morfología celular y distribución de nucleoides en <i>V. cholerae</i> ALO2495 creciendo en medio rico tras cuatro horas de la adición de rifampicina y cefalexina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C.	95
Figura 31. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice (p(x)) para la secuencia de los orígenes de replicación de <i>E. coli</i> K12, <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>B. subtilis</i> est. 168 y los cromosomas I y II de <i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor est. N16961.	96

Figura 32. Rectas de calibrado de las reacciones de qPCR de muestras de DNA cromosómico purificado y de muestras de células para las parejas de cebadores del origen y del término de cada cromosoma.	99
Figura 33. Porcentaje de orígenes inducidos en cultivos de <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo a 30 °C y sometidos al cambio a 41 °C junto con la adición de rifampicina a tiempo cero, devolviendo alícuotas de 41 °C a 30 °C a los tiempos posteriores indicados.	104
Figura 34. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo y tras el cambio a 41 °C. La adición de rifampicina y cefalexina se llevó a cabo a los tiempos posteriores al cambio de temperatura indicados en cada histograma.	105
Figura 35. Relaciones cromosomas equivalentes/célula y masa/célula obtenidas por citometría de flujo tras tratamiento con rifampicina y cefalexina a cultivos de <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo a 30 °C y tras el cambio a 41 °C a tiempo cero.	105
Figura 36. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría y FL/célula obtenida por citometría de flujo en las estirpes ALO1455 y ALO1456 durante el crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero.	108
Figura 37. Distribución de la fluorescencia por célula obtenida por citometría de flujo en muestras tomadas a 30 °C (absorbancia de 0,1) para las estirpes ALO1455, ALO1456, ALO15465, ALO1459, ALO1469, ALO1454, ALO1460 y ALO1458.	109
Figura 38. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría y FL/célula obtenida por citometría de flujo en las estirpes ALO1465, ALO1459 y ALO1469 durante el crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero.	110
Figura 39. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría y FL/célula obtenida por citometría de flujo en las estirpes ALO1454, ALO1460 y ALO1458 durante el crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero.	111
Figura 40. Número relativo de copias de minicromosoma o plásmido por masa y por célula en función de la velocidad de crecimiento en cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C y 41 °C en medio mínimo de las estirpes portadoras de los minicromosomas o plásmidos pALO264 y pALO267; pALO280, pALO270 y pALO284; pALO261; y pALO275 y pALO269.	117
Figura 41. Número relativo de copias de plásmido por masa (pcn/masa) en función de la velocidad de crecimiento (μ) en cultivos creciendo exponencialmente a 37 °C en medio mínimo M9 con diferente fuente de carbono.	117
Figura 42. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice ($p(x)$) para la secuencia de los orígenes de replicación de los plásmidos con control de la replicación por iterones: F, P1 $\Delta incA$ y pSC101.	118
Figura 43. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice ($p(x)$) para la secuencia de los orígenes de replicación de los plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido: R1, ColE1, y los derivados de ColE1 p15A y pBR322.	119
Figura 44. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría en las estirpes deficientes en RecA portadoras de minicromosomas.	120
Figura 45. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría en las estirpes deficientes en RecA portadoras de plásmidos controlados por iterones.	121

Figura 46. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría en las estirpes deficientes en RecA portadoras de plásmidos controlados por iterones. 122

Figura 47. Rectas de calibrado de las reacciones de qPCR de muestras de DNA plasmídico purificado y de muestras de células para la pareja de cebadores gfp1 y gfp2. 124

ÍNDICE DE TABLAS

Materiales

Tabla 1. Estirpes utilizadas para el análisis de HIR.	41
Tabla 2. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> K-12 utilizadas para el análisis del número de copias de plásmidos.	42
Tabla 3. Oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de qPCR.	46
Tabla 4. Secuencias consultadas en este trabajo y datos para su acceso.	47

Métodos

Tabla 5. Información sobre el genoma y el <i>oriC</i> de los cromosomas bacterianos de <i>E. coli</i> AB1157, <i>S. typhimurium</i> LT2, <i>B. subtilis</i> BG214 y <i>V. cholerae</i> ALO 2495 extraídos de la base de datos DoriC.	70
Tabla 6. Definición y características de los diferentes tipos de <i>oriC</i> según Gao y Zhang (Gao y Zhang, 2007).	70

Resultados

Tabla 7. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, número de orígenes por cromosoma a 30 °C y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C en la estirpe AB1157 de <i>E. coli</i> creciendo en medio mínimo, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina o cloranfenicol a las concentraciones indicadas.	77
Tabla 8. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, número de orígenes por cromosoma a 30 °C y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C en la estirpe LT2 de <i>S. typhimurium</i> creciendo en medio mínimo y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina o cloranfenicol a las concentraciones indicadas. d	79
Tabla 9. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, número de orígenes por cromosoma a 30 °C y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C en la estirpe BG214 de <i>B. subtilis</i> creciendo en medio mínimo y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina o cloranfenicol a las concentraciones indicadas.	81
Tabla 10. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, número estimado de orígenes por cromosoma a 30 °C y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C en la estirpe ALO2495 de <i>V. cholerae</i> creciendo en medio mínimo AB, medio mínimo M9 y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina o cloranfenicol.	84
Tabla 11. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en <i>E. coli</i> AB1157 creciendo en medio mínimo y medio rico.	86
Tabla 12. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en <i>S. typhimurium</i> LT2 creciendo en medio mínimo y medio rico.	89
Tabla 13. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en <i>B. subtilis</i> BG214 creciendo en medio mínimo y medio rico.	92

Tabla 14. Número medio de genomas por célula obtenidos por citometría de flujo en <i>V. cholerae</i> ALO2495 creciendo en medio mínimo.	94
Tabla 15. Eficiencia de la reacción de qPCR para las parejas de cebadores del origen y del término de la replicación con muestras de DNA cromosómico aislado de las estirpes indicadas.	98
Tabla 16. Eficiencia de la reacción de qPCR para las parejas de cebadores del origen y del término de la replicación para cada cromosoma con muestras de células de las estirpes indicadas.	100
Tabla 17. Relaciones origen/término de replicación (ori/ter) en cultivos a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C y la relación entre el valor tras el cambio a 41 °C respecto a 30 °C (ori/ter HIR).	101
Tabla 18. Porcentaje de orígenes inducidos por cambio de temperatura en estirpes mutantes RecA ⁻ y sus isogénicas RecA ⁺ de <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>V. cholerae</i> , creciendo en diferentes medios, tras la inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas.	102
Tabla 19. Incremento del número de copias de plásmido tras el cambio a 41 °C con respecto al crecimiento exponencial a 30 °C, medido por espectrofluorimetría (Δ FL/masa) y por citometría de flujo (Δ FL/célula).	109
Tabla 20. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) obtenidos por espectrofluorimetría en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol.	113
Tabla 21. Valores medios de fluorescencia por célula (FL/célula) obtenidos por citometría de flujo en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo con glicerol.	113
Tabla 22. Incremento del número de copias de plásmido tras el cambio de 30 °C a 41 °C y en crecimiento exponencial a 37 °C y a 41 °C con relación al crecimiento a 30 °C en las estirpes indicadas.	114
Tabla 23. Tamaño celular relativo obtenido por citometría de flujo (LS/célula) a 30 °C, 37 °C y 41 °C para los diferentes minicromosomas y plásmidos estudiados.	115
Tabla 24. Tiempo de generación de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 y en presencia del antibiótico correspondiente; a 30 °C, 37 °C y 41 °C (n = número de cultivos analizados).	115
Tabla 25. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) y tiempo de generación de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo con distintas fuentes de carbono en presencia del antibiótico correspondiente, a 37 °C.	116
Tabla 26. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) obtenidos por espectrofluorimetría en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C y 41 °C; y número de copias relativo en las estirpes <i>recA</i> ⁺ respecto a las <i>recA13</i> para cada plásmido y a cada temperatura.	123
Tabla 27. Eficiencia de la reacción de qPCR para la pareja de cebadores <i>gfp1</i> y <i>gfp2</i> con muestras de DNA plasmídico purificado de los plásmidos indicados.	125
Tabla 28. Eficiencia de la reacción de qPCR para la pareja de cebadores <i>gfp1</i> y <i>gfp2</i> con muestras de células de las estirpes indicadas.	125

Tabla 29. Número de copias de plásmido por reacción (pcn/reacción) obtenido por qPCR, y transformación en número de copias por masa (pcn/masa) y por célula (pcn/célula), a 37 °C.	126
Tabla 30. Tiempos de duplicación del número de células en las diferentes estirpes, creciendo exponencialmente en medio mínimo	127
Tabla 31. Número relativo de copias de plásmido por masa (pcn/masa), por célula (pcn/célula) y por <i>oriC</i> (pcn/ori) obtenidos por qPCR, espectrofluorimetría y citometría de flujo para los plásmidos indicados.	128

RESUMEN / SUMMARY

La duplicación del genoma de una célula antes de su división es un proceso esencial en el ciclo celular. *Escherichia coli* posee un único cromosoma circular que es replicado de una forma precisa una vez por ciclo celular. El grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral ha descrito y caracterizado en el cromosoma de *E. coli* la replicación inducida por estrés térmico, HIR (*Heat Induced Replication*), que escapa al control del ciclo celular (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 1988; Jiménez-Sánchez *et al.*, 1993). HIR inicia en *oriC*, requiere la proteína DnaA, no depende de la respuesta de choque térmico y, a diferencia de la replicación cíclica, no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas *de novo*. En el replisoma de HIR intervienen tanto la DNA polimerasa III como la DNA polimerasa I. La necesidad de Pol I determina una diferencia fundamental con la composición del replisoma de la replicación cíclica y se ha observado que HIR es más lenta. HIR es estrictamente dependiente de la proteína de ensamblaje del primosoma PriA, utilizando la vía PriA-PriB, y la helicasa Rep. A diferencia de la replicación cíclica, HIR requiere la proteína RecA. Las funciones de RecA requeridas en la replicación termoinducida parecen estar relacionadas con la estabilización de las estructuras de los intermediarios de replicación, que serían más inestables que los de la replicación cíclica, y la recombinación homóloga, pero no requiere su actividad proteasa, ni de reparación. También se detecta una dependencia parcial de la actividad helicasa de RecBCD. A pesar de requerir RecA y, parcialmente, RecBCD, HIR no puede ser considerada una replicación dependiente de recombinación (RDR) porque no se detectan roturas de DNA de cadena doble que pudieran generar un lazo-D como estructura de inicio para HIR.

Una vez que HIR ha sido caracterizada y definida en *E. coli*, en este trabajo se amplía el estudio de HIR a otros replicones bacterianos. Se ha estudiado HIR en los genomas de especies bacterianas modelo alternativas a *E. coli* y en varios plásmidos de *E. coli* con diferente control de la replicación. El propósito global de este trabajo es el de conocer la generalidad del mecanismo de HIR en el mundo bacteriano y determinar los requerimientos, tanto fisiológicos como estructurales, de la replicación termoinducida en los diferentes replicones analizados. Otro aspecto de interés son los efectos de las replications inducidas fuera del control cíclico sobre otros procesos y parámetros del ciclo celular, tanto en *E. coli* como en otras especies bacterianas.

Se ha analizado la replicación en condiciones de estrés térmico en *Salmonella typhimurium*, que pertenece a la misma familia que *E. coli* e igualmente es una enterobacteria Gram negativa; en *Bacillus subtilis*, como organismo modelo de especies Gram positiva y cuyo hábitat natural es el medio ambiente; y en *Vibrio cholerae*, cuyo genoma está repartido en dos cromosomas a diferencia de la mayoría de las bacterias. El estudio de la replicación cromosómica se ha realizado analizando la síntesis de DNA *in vivo* por marcaje radiactivo, mediante citometría de flujo y por PCR cuantitativa (qPCR); adicionalmente se ha observado la distribución de nucleoides por microscopía de fluorescencia. Se ha determinado que los orígenes de replicación de todas las bacterias estudiadas, excepto *oriCII* de *V. cholerae*, inducen ciclos de replicación extras tras estrés térmico, aunque a diferentes niveles. Se sugiere una correlación entre la presencia de sitios SIDD, sitios de desestabilización del DNA inducida por estrés, en los orígenes de replicación y la inducción de HIR. En *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*, a diferencia de en *E. coli*, HIR depende parcialmente de la actividad de RecA. El aumento de temperatura a cultivos exponenciales llevó al aumento de la relación DNA/masa en *E. coli*, *S. Typhimurium* y *V. cholerae*, pero no en *B. subtilis*. En estas condiciones, en *E. coli* se detecta inicialmente la inducción de la replicación y a tiempos posteriores, de la división celular. Se ha determinado que la inducción HIR en *E. coli* ocurre de manera inmediata y transitoria tras el cambio de temperatura. Por tanto, la replicación inducida por estrés térmico

no es exclusiva de *E. coli* y podemos considerar a HIR como un mecanismo de estrés generalizado en el mundo bacteriano.

Para determinar si la replicación termoinducida es una respuesta específica de los cromosomas bacterianos o extensible a otros replicones, se ha estudiado si HIR tiene lugar en minicromosomas y plásmidos de *E. coli*. Los replicones analizados incluyen: minicromosomas con *oriC* y *oriC sopABC*; plásmidos con control de la replicación por iterones, con los orígenes de replicación de F, P1 $\Delta incA$ y pSC101; y plásmidos controlados por RNA antisentido, con los orígenes de R1, p15A y pBR322 (González-Soltero, 2007; Lobner-Olesen, 1999). Los minicromosomas y plásmidos analizados contienen el gen *GFPmut2* clonado bajo el control del operón arabinosa. Se ha llevado a cabo la determinación del número de copias de plásmido o minicromosoma por cuantificación de la emisión de fluorescencia de *GFPmut2*, empleando espectrofluorimetría (pcn/masa), citometría de flujo (pcn/célula) y qPCR (pcn/volumen). A diferencia de los cromosomas bacterianos, los plásmidos estudiados no presentan HIR. El aumento de temperatura induce la replicación de minicromosomas y plásmidos como una adaptación a la nueva temperatura de crecimiento, que viene determinada por la velocidad de crecimiento. Se ha observado una correlación directa entre los parámetros pcn/masa y pcn/célula con la temperatura de crecimiento: a mayor temperatura, mayor número de copias. La presencia o ausencia de RecA afecta de manera diferente a la replicación de minicromosomas y plásmidos, dependiendo de las condiciones de crecimiento determinadas por la temperatura. La comparación de la cuantificación del número de copias de plásmido mediante espectrofluorimetría, citometría de flujo y qPCR, lleva a concluir que la espectrofluorimetría es el método más sencillo, rápido y preciso de los utilizados para la determinación de dosis génica en plásmidos con el gen *GFPmut2*.

Genome duplication before cell division is an essential process in the cell cycle. *Escherichia coli* has a single circular chromosome that is precisely replicated once per cell cycle. The research group where this PhD Thesis has been developed has described and characterized the Heat Induced Replication, HIR, for the *E. coli* chromosome, with different requirements from those of the cyclic replication (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero et al., 2006a; González-Soltero et al., 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero et al., 2008; Guzmán et al., 1988; Jiménez-Sánchez et al., 1993). HIR initiates in *oriC*, it does not depend on heat shock response and, unlike cyclic replication, HIR requires neither RNA polymerase activity nor *de novo* protein synthesis. Both DNA polymerase III and DNA polymerase I take part in HIR replisome. The role of Pol I determines a main difference with the replisome components in cyclic replication and a slower replication for HIR replisome has been detected. HIR is strictly dependent on PriA primosome assembly protein, by using the PriA-PriB pathway, and on RepE helicase. Unlike cyclic replication, HIR requires RecA protein. The functions of RecA required in heat stress replication seems to be connected with stabilization of chromosome replication structures, which would be more unstable than those of cyclic replication, and homologous recombination, but neither protease nor reparation activities are required. A partial dependence on RecBCD helicase activity is also detected. Although RecA, and partially RecBCD, are required, HIR cannot be regarded as a recombination-dependent replication (RDR) as no DNA double strand breaks, that could generate a D-loop structure for HIR initiation, are detected.

Once HIR has been characterized and defined in *E. coli* chromosome, in this PhD Thesis its study is broadened to other model bacterial species alternative to *E. coli* and to *E. coli* plasmids with different replication control. The global aim of this work is to know the spreading of HIR mechanism in the bacterial world and determining the physiological and structural requirements for this heat induced replication in the different replicons analysed. Another interesting point is the effect of acyclic induced replications on other cell cycle processes and parameters, both in *E. coli* and in other species.

Chromosomal replication has been analysed in heat stress conditions in *Salmonella typhimurium*, which belongs to the same family that *E. coli* and it is also a Gram negative enterobacteria; in *Bacillus subtilis*, as model of Gram positive bacteria and whose natural habitat is the environment; and in *Vibrio cholerae*, whose genome is shared in two chromosomes unlike most bacteria. The study of chromosomal replication has been done under heat stress conditions by analysing the DNA synthesis *in vivo* by means of radioactive labelling, flow cytometry and quantitative PCR (qPCR); additionally, nucleoid distribution has been observed by fluorescence microscopy. We have determined that in the origin of replication of every bacterium studied, excepting *oriCII* from *V. cholerae*, extra replication cycles are induced after heat stress, although to different extent. A correlation has been established between the presence of SIDD sites (Stress Induced DNA Duplex Destabilization) in the chromosomal origins of replication and heat induction of replication. In *S. typhimurium*, *B. subtilis* and *V. cholerae*, unlike *E. coli*, HIR partially depends on RecA activity. A temperature shift-up in exponentially growing cultures leads to DNA/mass increase in *E. coli*, *S. typhimurium* and *V. cholerae*, but not in *B. subtilis*. In these conditions in *E. coli*, induction of replication is initially detected, and subsequently cell division. It has been determined that in *E. coli* HIR takes place immediately and transiently after temperature shift-up. Therefore, we conclude that heat-induced replication is not exclusive of *E. coli* chromosome and HIR can be considered as a stress mechanism widespread in the prokaryotic world.

To determine whether HIR is a specific response of bacterial chromosomes or it is extensible to other replicons, HIR has been studied in *E. coli* minichromosomes and plasmids. The analysed replicons, harbouring *GFPmut2* gene under arabinose operon control, include

minichromosomes with oriC and oriC sopABC; plasmids with replication control by iterons, with replication origins from F, P1 ΔincA and pSC101; and plasmids controlled by antisense RNA, with replication origins from R1, p15A and pBR322 (González-Soltero, 2007; Lobner-Olesen, 1999). We have determined the minichromosome or plasmid copy number by means of GFPmut2 fluorescence emission quantification using spectrofluorometry (pcn/mass), flow cytometry (pcn/cell) and quantitative PCR (pcn/volume). Unlike bacterial chromosomes, the studied plasmids did not show HIR. Heat stress induces minichromosome and plasmids replication as an adaptation to the growing temperature, depending on growth rate. A direct correlation has been observed between pcn/mass and pcn/cell parameters with the growing temperature: the higher the temperature, the higher the pcn. Presence or absence of RecA affects differently to minichromosome or plasmid replication, depending on growing temperature conditions. The comparison of plasmid copy number quantification obtained by means of spectrofluorometry, flow cytometry and qPCR allows to conclude that spectrofluorometry is the simpler, quicker and more accurate method for gen dose determination in plasmids carrying the GFPmut2 gene.

INTRODUCCIÓN

1. Ciclo celular bacteriano

Se denomina ciclo celular a la sucesión de eventos ordenados que conducen a la duplicación de una célula. La duplicación celular es un proceso con un estricto control, necesario para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos. En *Escherichia coli* el ciclo celular consta de una serie de pasos muy controlados, que comienza con la elongación celular y la replicación cromosómica (periodo C en bacterias y fase S en eucariontes), continúa con la segregación cromosómica (partición en bacterias y mitosis en eucariontes) y concluye con la formación del septo entre las dos nuevas células y la separación de las mismas (revisado en: Donachie y Robinson, 1987; Jonas, 2014). En bacterias el tiempo necesario entre la finalización de una ronda de replicación y la división celular siguiente se define como periodo D. Todos los organismos replican el DNA de sus células una única vez por ciclo celular; modificar la frecuencia de la replicación daría lugar a una inestabilidad genómica que afectaría a la supervivencia de la célula (revisado en Nielsen y Løbner-Olesen, 2008). En *E. coli* el inicio de la replicación tiene lugar una única vez por ciclo celular y de manera simultánea en todos los orígenes presentes en la célula (Skarstad *et al.*, 1986). Para asegurar esta única duplicación del genoma, las células limitan el proceso de replicación a una fase concreta del ciclo celular en la que están disponibles las proteínas y maquinaria necesarias para la replicación. *E. coli* ha desarrollado diferentes mecanismos para el control del inicio de la replicación cromosómica, como el secuestro del origen y el control de la actividad de la proteína DnaA, aunque el principal mecanismo para la regulación del inicio de la replicación es la limitación de la disponibilidad de DnaA en la célula (revisado en: Boye *et al.*, 2000; Donczew *et al.*, 2014).

Las diferentes formas de vida de las bacterias conducen a ajustes en su ciclo celular. En el caso de *Bacillus subtilis* las células pasan de estado vegetativo a entrar en esporulación como respuesta a la escasez de nutrientes, y el comienzo de este proceso es la reorganización del ciclo celular para dar lugar a divisiones celulares asimétricas (Rahn-Lee *et al.*, 2009). Otras bacterias con genomas multipartidos, como el género *Vibrio*, pueden hacer uso de la distribución de los genes en cada uno de sus cromosomas para expresarlos selectivamente y poder adoptar diferentes ciclos de vida, pudiendo dispersarse libremente en el medio ambiente o bien interactuar con células eucariotas en calidad de simbioses o patógenos, lo que supone una ventaja selectiva para la adaptación de estos organismos a diferentes condiciones ambientales (revisado en Thompson *et al.*, 2004). En *E. coli* y otras bacterias, las células en cultivos en medio enriquecido se dividen más rápido de lo que tardan sus cromosomas en completar la replicación o periodo C, dando lugar a rondas de replicación por cada cromosoma durante la duración total de su ciclo celular o tiempo de generación (τ). Cada terminación de la replicación y la posterior segregación de los nuevos cromosomas llevarán a la división celular en ese ciclo. Por tanto, la estricta coordinación entre los procesos clave del ciclo celular bacteriano permite acoplar el crecimiento en masa celular con la duplicación del material genético y, gracias al control sobre la división celular, se consigue una distribución ajustada del tamaño celular en las poblaciones (revisado en Reyes-Lamothe *et al.*, 2012).

Un cultivo bacteriano creciendo a velocidad óptima en condiciones constantes contiene células en todas las etapas del ciclo celular. Los cultivos discontinuos presentan tres etapas de crecimiento: latencia, exponencial y estacionaria. Cuando en un cultivo la masa se duplica a velocidad constante a lo largo del tiempo, es decir, τ es constante a lo largo del crecimiento, se dice que el cultivo crece exponencialmente. Se considera que un cultivo presenta un crecimiento equilibrado cuando durante un intervalo de tiempo la cantidad de ciertos componentes como el total de proteínas o de DNA, incrementan en la misma proporción (Campbell, 1957). La situación en la que un cultivo mantiene un crecimiento exponencial y además equilibrado se denomina *steady-state* o estado estable, donde la distribución de los parámetros celulares tales como el tamaño celular o el contenido de DNA por célula se mantienen constantes. Un crecimiento exponencial no implica necesariamente un crecimiento

equilibrado, ni a la inversa. Si la velocidad de crecimiento de alguno de los componentes disminuye, por ejemplo como consecuencia del agotamiento de los nutrientes del medio, el cultivo alcanza la fase estacionaria y deja de considerarse en equilibrio (Akerlund *et al.*, 1995; revisado en Fishov *et al.*, 1995).

2. Topología cromosómica

La bacteria *E. coli* porta su información genética en un único cromosoma circular de 4,64 Mpb. Para albergar este gran cromosoma dentro de la célula, la molécula de DNA está compactada unas mil veces llegando a ocupar tan sólo el 15 % del volumen celular. Este empaquetamiento del cromosoma precisa del superenrollamiento negativo y de la participación de otros factores y proteínas que estabilizan la estructura del nucleóide, como SMC o H-NS, que reorganizan el cromosoma uniéndose a segmentos de la molécula de DNA y aproximando así regiones distantes; HU, que induce pliegues en el DNA, condensa la molécula y también interacciona con moléculas de DNA de cadena sencilla; IHF, cuya función principal es doblar con mucha precisión el DNA para que otras proteínas puedan interactuar; o FIS, otra proteína implicada en el mantenimiento de la estructura del nucleóide de la que se han descrito hasta seis mecanismos por los que puede afectar a la expresión génica tanto positiva como negativamente (revisado en: Browning *et al.*, 2010; Rinsky y Travers, 2011). Se ha propuesto que estas proteínas pudieran tener además de la función estructural una función reguladora, tal y como sucede en eucariotas, y se ha descrito la actuación de proteínas como H-NS, FIS o IHF en el inicio de la transcripción sobre ciertos promotores para controlar la expresión génica en respuesta a la fase del crecimiento y a cambios ambientales, (revisado en: Reyes-Lamothe *et al.*, 2008; Reyes-Lamothe *et al.*, 2012).

Actualmente se conoce que el genoma de *E. coli* incluye hasta 4460 genes, de los cuales el 76 % tienen atribuida una función determinada experimentalmente o por otros procedimientos, lo que supone el porcentaje más elevado para cualquier ser vivo (revisado en Marijuán *et al.*, 2015). El genoma de *E. coli* está organizado de manera que sea fácil el acceso para el mantenimiento y procesado del cromosoma. Durante la replicación será necesario romper los dominios topológicos para permitir el acceso de la maquinaria de replicación según avance la horquilla de replicación (Alexandrov *et al.*, 1999). El fenómeno de apertura de la doble hélice tiene lugar gracias a la acción de las helicasas, que funcionan obteniendo energía de la hidrólisis de nucleótidos trifosfato para romper los puentes de hidrógeno que unen ambas cadenas de DNA. En este proceso las helicasas cuentan con la ayuda de proteínas desestabilizadoras de la doble hélice, que se unen preferente a DNA de cadena sencilla (ssDNA), como la proteína SSB, y evitar así la degradación del ssDNA por endonucleasas celulares.

La topología también influye en el modo de albergar en el nucleóide las dos copias del DNA que se está replicando, la segregación de las dos nuevas moléculas de DNA a compartimentos opuestos de la célula tras comenzar la replicación y la ubicación del resto del material genético que queda por replicar (Nielsen *et al.*, 2007). Para que el inicio de replicación tenga lugar se requiere una estructura y un grado de compactación cromosómica adecuados. En condiciones normales la superhélice de DNA mantiene una tensión que principalmente se debe a las actividades de apertura de la doble hélice propias de la replicación y la transcripción, la limitación de las zonas relajadas por las proteínas asociadas al nucleóide o NAPs (como HIS, FIS o HU) y el control enzimático del superenrollamiento que ejercen las topoisomerasas (Rovinskiy *et al.*, 2012). Las principales enzimas encargadas del mantenimiento de la topología del cromosoma son la girasa de DNA y la topoisomerasa I. La girasa, compuesta por las proteínas GyrA y GyrB organizadas en tetrámeros de estructura A_2B_2 , genera superenrollamiento negativo en el cromosoma bacteriano por introducción de vueltas de hélice negativas. La topoisomerasa I, codificada por el gen *topA*, se encarga de romper y volver

a unir una de las hebras de la molécula de DNA con el fin de eliminar el superenrollamiento negativo (revisado en Khodursky, 2007). Otras enzimas implicadas en el mantenimiento del superenrollamiento del cromosoma son la topoisomerasa III, codificada por el gen *topB*, que tiene la capacidad de eliminar vueltas de hélice negativas, y la topoisomerasa IV, un heterotetrámero formado por las proteínas ParC y ParE en estructura C₂E₂ con mucha homología con la girasa, cuya función es la de cortar las dos cadenas de la molécula de DNA para relajar tanto el superenrollamiento positivo como el negativo (revisado en: Alexandrov *et al.*, 1999; Cozzarelli, 1980a; Cozzarelli, 1980b; Espeli y Marians, 2004).

Se piensa que las células utilizan los cambios en la estructura de sus cromosomas como mecanismo regulador del inicio de la replicación, aunque aún se conoce muy poco sobre esto. Recientemente se ha propuesto un modelo de activación del origen de tres componentes, en el que elementos térmicos y estructurales de su secuencia actúan en equilibrio con elementos actuando en *trans*, como la proteína DnaA, para permitir un control eficiente del inicio en determinadas condiciones ambientales (revisado en Magnan y Bates, 2015). A medida que se examinen las secuencias del origen de replicación de diferentes bacterias, se descifrarán nuevos detalles de las instrucciones para la formación de los complejos replicativos y de los componentes de los mecanismos de coordinación del ciclo celular (Leonard y Méchali, 2013).

3. Replicación cromosómica

Realizar copias fidedignas de la información genética es uno de los principales objetivos para cualquier célula que se divide. Los mecanismos mediante los cuales se replica y posteriormente se segrega el DNA cromosómico son eventos fundamentales en el ciclo celular de todas las células de cualquier organismo y han sido objeto de estudio durante muchas décadas y de recientes revisiones (revisado en: de la Cueva-Méndez y Labib, 2008; Hajduk *et al.*, 2015; Ho y Amir, 2015; Jonas, 2014; Kaguni, 2011; Katayama *et al.*, 2010; Leonard y Grimwade, 2015; Leonard y Méchali, 2013; Reyes-Lamothe *et al.*, 2012).

3.1. Etapas de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*

El primer paso de la replicación es la iniciación; es la etapa más importante y generalmente está controlada por múltiples factores para asegurar un único inicio en cada ciclo celular. En *E. coli* la replicación inicia en un sitio único en el cromosoma denominado origen de replicación u *oriC* y conlleva una serie de etapas muy conservadas y bien coordinadas con otros procesos celulares para dar lugar a una copia completa y de alta fidelidad del único cromosoma circular presente en la mayoría de las eubacterias (Kornberg y Baker, 1992; Marsh y Worcel, 1977). A continuación tiene lugar la elongación, en la que la DNA polimerasa III sintetiza nuevas cadenas complementarias a partir de cada hebra molde del DNA y mediante el avance bidireccional de las horquillas de replicación el cromosoma se duplica desde la región del origen hasta el término. Por último, cuando ambas horquillas de replicación alcanzan la región del término concluye la replicación con la obtención de dos copias idénticas de la molécula original de DNA. La segregación de los nuevos cromosomas comienza después del inicio y el reparto tiene lugar mientras la replicación sigue en marcha. Finalmente, la transmisión de la información hereditaria concluye con la división celular (revisado en Reyes-Lamothe *et al.*, 2012).

Las diferentes etapas de la replicación del DNA cromosómico de *E. coli* y otras bacterias tienen lugar en compartimentos específicos dentro de la célula. Así, se conoce que la replicación tiene lugar en una zona media de la célula e implica asociación del DNA con la membrana plasmática para asegurar el posicionamiento. En células individuales las regiones del origen y del término de la replicación ocupan polos opuestos; en el momento de la replicación de células creciendo rápidamente, los nuevos orígenes migran cada uno hacia un

polo opuesto de la célula, mientras que en el momento de la división la región del término se desplaza hasta el centro de la célula para ser replicada antes de la división. Las moléculas plasmídicas también ocupan posiciones concretas en la célula hospedadora, manteniéndose en el centro de la célula durante el ciclo celular y, una vez que son replicadas, ocupan las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$, que serían los puntos centrales de las dos nuevas células en formación. A pesar de que se desconoce en gran medida la naturaleza de los mecanismos implicados en la compartimentalización subcelular de la replicación en procariotas, se cree que la localización de las etapas de la replicación en distintos emplazamientos está relacionada con la organización de grandes estructuras necesarias para el ensamblaje de complejos replicativos y con la interacción con determinados elementos, como la membrana celular (revisado en Bravo *et al.*, 2005; Meile *et al.*, 2005).

3.1.1. Iniciación

La iniciación es un proceso controlado por factores que reconocen la secuencia del origen y que o bien dirigen el comienzo de la síntesis de una cadena o bien facilitan la apertura de la doble hélice. El mecanismo principal del inicio de la replicación cromosómica está conservado en organismos pertenecientes a los tres dominios de la vida y el fundamento son tres características compartidas: presencia de proteínas iniciadoras con ciertas características estructurales, como dominios de unión a ATP; localización del complejo de iniciación en un *locus* concreto del cromosoma u origen de replicación, o varios *loci* en organismos superiores; y la apertura de la doble hélice de DNA en una zona inestable denominada DUE (*DNA unwinding element*) (revisado en: Donczew *et al.*, 2014; Leonard y Méchali, 2013). La interacción entre el origen de replicación y las proteínas iniciadoras resultan en último término en el ensamblaje de los complejos pre-replicativos, cuya función es la de cargar y activar las helicasas de DNA que separarán las dos cadenas de la molécula de DNA como paso inicial de la replicación (Kawakami y Katayama, 2010).

El primer paso para el inicio de la replicación es el ensamblaje de las moléculas de DnaA en sus secuencias de reconocimiento o secuencias de unión de DnaA dentro de *oriC*. Unos veinte monómeros de la proteína DnaA se unen a *oriC* formando una hiperestructura que se denomina complejo pre-replicativo u orisoma (Fuller *et al.*, 1984; revisado en: Leonard y Grimwade, 2015; Norris *et al.*, 2007). La formación de este complejo inicial está regulada por las proteínas FIS e IHF, que se unen a la secuencia del origen y funcionan como inhibidor y activador, respectivamente, del cambio conformacional que tiene lugar en *oriC* para que tenga lugar la apertura del origen. La unión de FIS al origen impide la unión de IHF y debilita las interacciones de DnaA con sus secuencias de reconocimiento; cuando se acumula suficiente proteína DnaA, FIS se ve desplazada y se permite la unión de IHF a su secuencia de reconocimiento (Kaur *et al.*, 2014). En la primera etapa de la formación del complejo pre-replicativo, DnaA se une en primer lugar a sus tres secuencias de unión con las que tiene mayor afinidad (R1, R2 y R4), y la proteína FIS también se une a su secuencia en el origen de replicación. Posteriormente, a partir de las secuencias R1 y R4 y en dirección hacia la secuencia central R2 tiene lugar la oligomerización de DnaA en el resto de sus secuencias de unión. La extensión del oligómero hace que FIS sea desplazada de su secuencia de unión y que IHF pueda interactuar con la suya. En este momento, el regulador negativo SeqA podría actuar bloqueando sitios con la secuencia GATC evitando la extensión de la oligomerización de DnaA y la apertura de la doble hélice, y el regulador positivo DiaA estabilizaría las interacciones de DnaA, que son necesarias para la extensión del oligómero y para conectar los dos oligómeros que convergen hacia R2. Una vez que la extensión finaliza, un filamento helicoidal compacto de moléculas de DnaA unidas a ATP se extiende desde R1 hasta la región DUE gracias a la estabilización de DiaA (Figura 1; Rozgaja *et al.*, 2011).

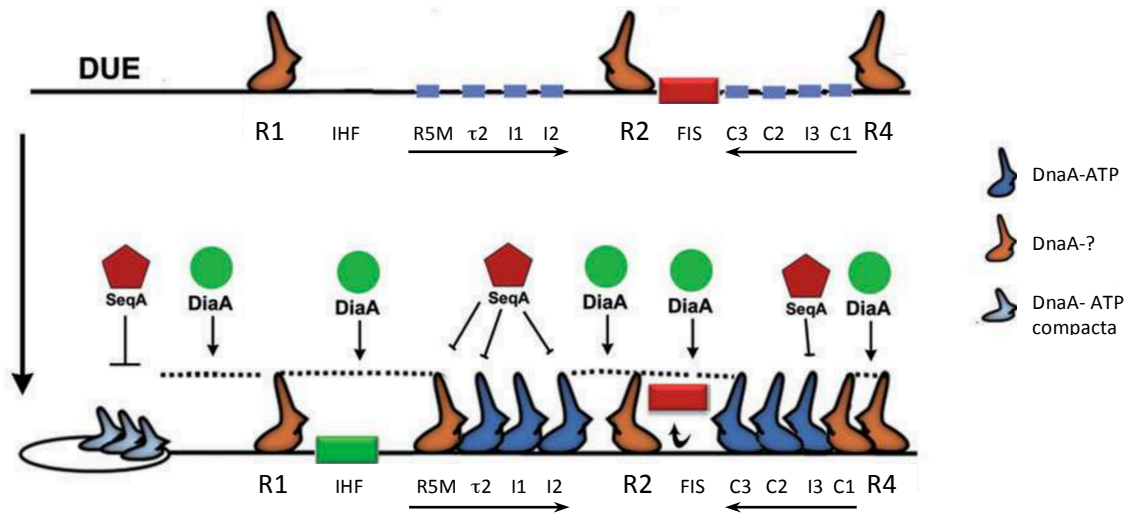


Figura 1. Modelo del ensamblaje del complejo pre-replicative (modificado de Rozgaja *et al.*, 2012). Se muestran las secuencias de unión de DnaA de alta afinidad (naranja; unen DnaA en forma desconocida) y de baja afinidad (azul; unen DnaA-ATP), y las proteínas reguladoras FIS, IHF, SeqA y DiaA. Las flechas indican el sentido de la oligomerización de DnaA (ver texto).

Esta unión promueve la apertura de la doble hélice en el DUE, zona rica en AT localizada en la parte izquierda del origen, en concreto en el trecémero más a la derecha (R) y procediendo hacia la izquierda (Figura 2). Para que tenga lugar la apertura es necesario que la proteína DnaA esté unida a ATP (Bramhill y Kornberg, 1988). La apertura inicial de la región inestable del origen suele abarcar entre 20 y 50 pb y es estabilizada por la unión de proteínas SSB. Esta apertura parece ser suficiente para el ensamblaje de los complejos necesarios para la replicación (Rajewska *et al.*, 2012). En estudios recientes se ha descrito la influencia de otras proteínas en la separación de la doble hélice de DNA en *oriC* por la unión de DnaA, tanto favoreciendo la estabilización de DnaA para facilitar la apertura, como HU o DiaA, como para ejercer una regulación negativa sobre la proteína iniciadora, como Dps (Chodavarapu *et al.*, 2008a; Chodavarapu *et al.*, 2008b; Ishida *et al.*, 2004; revisado en Kaguni, 2011; Kaur *et al.*, 2014). Una vez separadas las cadenas en los trecémeros de *oriC*, DnaA carga la helicasa DnaB en cada una de las hebras con la ayuda de DnaC, formándose el complejo DnaB-DnaC denominado complejo pre-cebador y ampliando la zona abierta del DNA (Bramhill y Kornberg, 1988; Guille y Messer, 1991). En este momento la primasa DnaG puede entrar al complejo y sintetizar los dos cebadores, uno por cada cadena de DNA. La interacción de DnaG con DnaB y la formación de los cebadores de RNA inducen la disociación de DnaC del complejo DnaB-DnaC, permitiendo que DnaB ejerza su actividad helicasa y el progreso de la replicación avance (Figura 3). El complejo constituido con la entrada de la helicasa y la primasa a la horquilla de replicación se denomina complejo cebador o primosoma (revisado en: Kaguni, 2011; Kaguni, 2013; Messer, 2002).

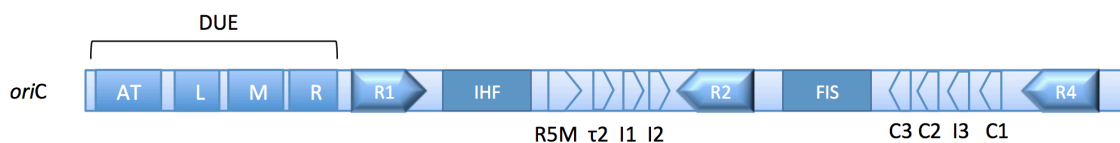


Figura 2. Estructura de la región del origen de replicación de *E. coli*, *oriC* (modificado de Leonard y Grimwade, 2015, y Ozaki y Katayama, 2012). Se representan las posiciones de los tres trecémeros ricos en AT (L, M y R) y la región rica en AT del DUE, los sitios de unión de DnaA de alta afinidad y su orientación (R1, R2, R4), otros sitios de unión de DnaA de afinidad media (R5M, τ 2, I1-I3 y C1-C3) y la localización de los sitios de unión de IHF y FIS.

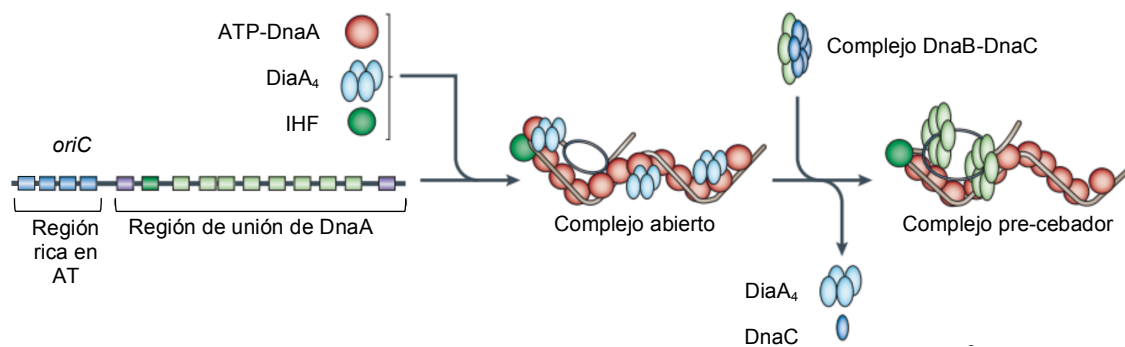


Figura 3. Mecanismo del inicio de la replicación en la región cromosómica del origen de *E. coli* (modificado de Katayama *et al.*, 2010).

3.1.1.1. Estructura de *oriC*

El inicio de la replicación cromosómica tiene lugar en una secuencia específica denominada origen (Marsh y Worcel, 1977; von Meyenburg *et al.*, 1978). Esta región ha sido estudiada y caracterizada en profundidad en los últimos años (revisado en: Kaguni, 2011; Mackiewicz *et al.*, 2004; Nielsen y Løbner-Olesen, 2008; Rajewska *et al.*, 2012). La especificidad de la secuencia y los requerimientos estructurales para la región del origen varían dependiendo del organismo. Aunque los orígenes de cromosomas bacterianos están bastante bien definidos, los de organismos superiores no están tan bien caracterizados.

En *E. coli* la región *oriC* se localiza en el minuto 84 del mapa genético (Bird *et al.*, 1971; Hohlfeld y Vielmette, 1973; Louarn *et al.*, 1974). Todos los elementos necesarios para el funcionamiento de *oriC* están contenidos en esta secuencia de 258 pb, muy conservada en la familia *Enterobacteriaceae* (Messer y Weigel, 1996; Zyskind *et al.*, 1983). Esta región es única y esencial para la replicación; sólo puede ser eliminada si hay un origen de replicación secundario en la célula proporcionado por un plásmido o un fago integrado, o cuando las células son deficientes en RNAsa H, lo que permite la iniciación a partir de sitios diferentes en el cromosoma conocidos como *oriK* (Kogoma, 1997; Kornberg y Baker, 1992).

Los orígenes de replicación de los cromosomas bacterianos poseen elementos funcionales característicos como sitios específicos para la unión de proteínas iniciadoras, sitios de unión para proteínas accesorias y regiones con elevado contenido en bases de adenina y timina (Gille y Messer, 1991; revisado en Kaguni, 2011; Messer, 2002). En *E. coli* el origen está compuesto por aproximadamente un 60 % de residuos de adenina y timina, mientras que su zona rica en AT contiene casi un 77 % de estas bases (revisado en Rajewska *et al.*, 2012). La zona rica en AT es el elemento estructural más universalmente conservado tanto en replicones procariotas como en eucariotas superiores (Mackiewicz *et al.*, 2004). En *E. coli* la zona rica en AT se denomina DUE (*DNA unwinding element*), se localiza en la parte izquierda de *oriC* y contiene tres secuencias características repetidas en tándem, cada una de 13 nucleótidos y separadas entre sí por uno o dos nucleótidos, denominadas trecémeros L, M y R junto con una secuencia de 12 pb denominada región rica en AT (Figura 2). Es en esta zona rica en AT donde es más sencillo el desenrollamiento de la doble hélice durante el inicio de la replicación por la baja estabilidad interna de las regiones ricas en AT; aquí comienza la apertura y desestabilización de la doble hélice de DNA para generar DNA de cadena sencilla, indispensable en el inicio de la replicación (revisado en: Kaguni, 2011; Kaguni, 2013). Cada uno de los tres trecémeros comienza por un sitio GATC, reconocidos por la metilasa Dam. Además, a lo largo de su secuencia, *oriC* presenta otros nueve sitios GATC.

Aunque la desestabilización inicial de la doble hélice de DNA puede ser inducida espontáneamente sin factores de inicio de la replicación, *in vivo* es provocada por la unión de una proteína iniciadora a sus secuencias de reconocimiento, situadas próximas a la zona rica en AT (Polaczek *et al.*, 1998). En el caso del cromosoma de *E. coli* esta proteína es DnaA, con sus correspondientes secuencias de unión. En *oriC* hay al menos once secuencias de unión para DnaA; de ellas, las tres de mayor afinidad (R1, R2 y R4) tienen la proteína unida durante la mayor parte del ciclo celular, mientras que la unión de DnaA a las otras secuencias, de afinidad intermedia, determina el inicio de la replicación. Las posiciones relativas y la distancia entre cada uno de los elementos y motivos que componen el origen es crucial para el correcto funcionamiento del origen (Figura 2) (revisado en: Kaguni, 2011; Katayama *et al.*, 2010; Leonard y Grimwade, 2015).

Dentro de *oriC* hay otras secuencias que unen proteínas que contribuyen de forma importante a la regulación del inicio de la replicación cromosómica. En la mitad izquierda de *oriC* se localiza una secuencia reconocida por la proteína IHF, y hacia la zona derecha del origen hay una secuencia para la unión de la proteína FIS (Figura 2). La unión de IHF a su secuencia de reconocimiento ocasiona un incremento de la curvatura del DNA, favoreciendo la iniciación. La metilación de las secuencias GATC favorece la unión de IHF, y, por tanto, la iniciación (Polaczek *et al.*, 1998). La proteína FIS actúa contrarrestando la acción de IHF, inhibiendo la apertura de *oriC*. Hay varias proteínas auxiliares, entre las que se incluyen la RNasa HI, la topoisomerasa I y la proteína HU, que garantizan que el inicio de la replicación tenga lugar específicamente en *oriC* (Chodavarapu *et al.*, 2008a; revisado en Leonard y Grimwade, 2011).

3.1.1.2. Control de la replicación en el inicio

La replicación del material genético es un proceso muy preciso, de manera que las células han desarrollado mecanismos de control para asegurar que cada región de su genoma se replica una sola vez por cada ciclo celular. El momento exacto en el que se inicia la replicación es importante en el ciclo celular, y por este motivo la mayoría de los factores implicados en el control de la replicación actúan en la etapa de la iniciación (Nielsen y Løbner-Olesen, 2008). Los diferentes mecanismos que evitan la aparición de reinicios actúan fundamentalmente a dos niveles: limitando la disponibilidad de la secuencia *oriC* para el ensamblaje de nuevos complejos replicativos, o disminuyendo la cantidad de proteína DnaA disponible en su conformación activa.

En un cultivo creciendo rápidamente, las rondas de replicación se solapan de manera que pueden coexistir dos, cuatro o incluso ocho orígenes por cromosoma. Tras la iniciación de la replicación, los orígenes recién replicados son inmediatamente inactivados por el secuestro de orígenes hemimetilados en la membrana por parte de la proteína SeqA. Esta proteína bloquea la unión de DnaA a sus sitios de unión de menor afinidad, pero no afecta a los sitios de mayor afinidad por DnaA. Con este mecanismo, SeqA previene la apertura de *oriC*. El secuestro finaliza con la posterior metilación de las secuencias GATC por la metilasa Dam (Morigen *et al.*, 2005).

Muchos de los mecanismos de regulación se ejercen durante el ensamblaje de los complejos multiméricos formados por la proteína iniciadora bacteriana, DnaA, y la secuencia del origen de replicación, *oriC* (revisado en Leonard y Grimwade, 2015). La replicación cromosómica está controlada de modo que el inicio se produce cuando se alcanza cierta masa celular por *oriC*, denominada masa de iniciación, que se mantiene constante independientemente de la tasa de crecimiento (Donachie, 1968; Hansen *et al.*, 1991; Wold *et al.*, 1994). Para el mantenimiento de la masa de iniciación se han propuesto varios modelos, como el modelo de dilución del inhibidor, el modelo del autorrepresor o el modelo de secuestro de la proteína iniciadora (revisado en Bremer y Churchward, 1991; Morigen *et al.*,

2003). Otro modelo propuesto es el de acumulación del factor iniciador, en el que dicho factor se produciría en proporción al aumento en volumen de la célula y se acumularía en cada origen de replicación, pero la replicación cromosómica sólo se iniciaría cuando se alcanzara cierta cantidad por origen. Aunque ha sido considerado el modelo menos satisfactorio, estudios recientes apoyan su validez para el control del inicio, el número de orígenes de replicación y el tamaño celular (Donachie y Blakely, 2003; Helmstetter *et al.*, 1968; Ho y Amir, 2015; revisado en Katayama *et al.*, 2010). Es bien aceptado que la proteína DnaA es el factor iniciador implicado en el control del inicio de replicación dependiente del tamaño celular, reduciendo su expresión para retrasar el inicio y aumentar el tamaño celular, o sobreexpresándose para adelantar en el ciclo el inicio de la replicación en caso de reducirse el tamaño celular (revisado en: Bremer y Churchward, 1991; Chien *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2012; Løbner-Olesen *et al.*, 1989).

3.1.2. Elongación

Una vez iniciada la replicación, el siguiente paso es la elongación, y requiere la acción coordinada de cuatro actividades básicas que conforman el replisoma: proteína de unión a cadena sencilla (SSB), DNA polimerasa, DNA helicasa y DNA primasa. En cada una de las horquillas de replicación se forma un replisoma, formado por el ensamblaje de la helicasa DnaB, la DNA polimerasa III y la primasa DnaG, y cuya función es la duplicación del cromosoma de *E. coli* (revisado en Pomerantz y O'Donnell, 2007). El replisoma forma parte de un nivel superior de organización denominada hiperestructura de replicación. La hiperestructura de replicación resulta del ensamblaje de entre 25 y 30 proteínas, junto al DNA y que podría estar unida a la membrana plasmática. El modelo de la hiperestructura de replicación implica la unión física no estable entre el replisoma, los componentes del complejo de síntesis de desoxinucleótidos y la maquinaria de segregación (Guzmán *et al.*, 2002; Riola *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 2007).

El movimiento de la horquilla de replicación en bacterias es bidireccional a partir de *oriC* en dirección hacia la región de término de la replicación, situada en un punto diametralmente opuesto al origen (Bird *et al.*, 1972; Hohlfeld y Vielmette, 1973). Aunque la conformación del DNA es antiparalela y cada horquilla avanza en un sentido, la complejidad de la organización de la maquinaria de replicación permite la disposición de las cadenas del DNA de manera que el movimiento del replisoma sea unidireccional (revisado en Pomerantz y O'Donnell, 2007). La replicación es semiconservativa, de modo que a partir de cada una de las cadenas molde se sintetizará una hebra nueva complementaria. Una vez liberada DnaC, la helicasa DnaB avanza en dirección 5'→3' abriendo la molécula de DNA original. La interacción de la primasa con DnaB permite la formación de un primer o cebador, un fragmento corto de RNA que se unirá a un dímero de la holoenzima DNA polimerasa III para la adición de nucleótidos. La elongación es continua para una de las cadenas (la cadena líder o guía) y discontinua para la otra cadena (la cadena retrasada). Para la hebra de síntesis discontinua se sintetizan fragmentos cortos de DNA, denominados fragmentos de Okazaki, a partir de cebadores de RNA para la DNA polimerasa III. Más tarde los fragmentos de RNA son eliminados por la actividad exonucleasa 3'→5' de la DNA polimerasa I, y reemplazados por DNA por la misma enzima. Por último la ligasa une todos los nuevos fragmentos añadidos a la nueva cadena del cromosoma en crecimiento (revisado en: Kaguni, 2011; Pomerantz y O'Donnell, 2007).

Para describir el avance bidireccional de los replisomas desde la región del origen hasta la del término del cromosoma bacteriano, en las últimas décadas se han descrito varios modelos. En un principio se planteó el modelo de "trenes sobre vías" en el que los dos replisomas generados en la iniciación en un único punto se desplazan en sentido contrario siguiendo la molécula de DNA. En la actualidad el aceptado es el denominado modelo de la "factoría de replicación", en el que la molécula de DNA es la que se desplaza a través de dos replisomas

fijos y funcionalmente acoplados. Sobre este modelo se han propuesto múltiples variaciones en las que se postula que los replisomas serían física y funcionalmente independientes durante la elongación, aunque el tiempo que ambos replisomas permanecerían acoplados durante el avance de la replicación es todavía un hecho controvertido (revisado en Bates, 2008; Breier *et al.*, 2005; Meile *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2008; Reyes-Lamothe *et al.*, 2008).

3.1.3. Terminación

Al ser la replicación de *E. coli* bidireccional, las dos horquillas de replicación completan la replicación del cromosoma en la zona diametralmente opuesta al del inicio. En esta región se localizan las secuencias terminadoras *Ter*, a las que se une la proteína terminadora Tus (revisado en Neylon *et al.*, 2005). Las secuencias *Ter* se han identificado también en otras bacterias y en plásmidos. En *E. coli* las secuencias *Ter* contienen unos 20 pb, y se localizan en diez posiciones situadas entre el minuto 13 y el minuto 55 del cromosoma, agrupadas en dos regiones con cinco secuencias cada una. Cada grupo de secuencias *Ter* actúa sobre una de las dos horquillas de replicación, y los cinco sitios *Ter* que afectan a cada horquilla están situados en el lado opuesto del cromosoma. Se dice que las secuencias *Ter* tienen un efecto polar, ya que actúan deteniendo el avance de las horquillas de replicación que proceden de la mitad opuesta del cromosoma pero no afectan a las horquillas que proceden de la mitad en la que se localizan. La inversión de regiones del dominio *Ter* tiene efectos deletéreos, lo que evidencia la importancia de su polaridad (Guijo *et al.*, 2001). El complejo Tus-*Ter* detiene la replicación a través de una interacción entre Tus y la helicasa DnaB. Tus inhibe de manera específica la actividad helicasa de DnaB impidiendo que se abra la doble hélice de DNA en las regiones *Ter* y deteniendo así la replicación (revisado en Neylon *et al.*, 2005).

La segregación cromosómica ocurre tras comenzar el inicio de la replicación. Los orígenes recién sintetizados son ubicados en las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de la célula y en esas posiciones se desarrolla el resto de la replicación (revisado en: Bravo *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 1981; Thanbichler y Shapiro, 2006). Aunque en la mayoría de los cromosomas procarióticos se han localizado *loci* del sistema *parAB* para la segregación cromosómica próximos a sus orígenes de replicación, el cromosoma de *E. coli* parece carecer de alguna secuencia homóloga que pudiera ser utilizada en la segregación (Gerdes *et al.*, 2000). Se piensa que esta función de segregación está englobada en la hiperestructura de replicación, dado que alteraciones de la actividad de la NDP reductasa afectan a esta función (Riola *et al.*, 2007). Recientemente se ha visto que en la segregación de los cromosomas en *E. coli* está implicada la actuación del sistema MukBEF, un complejo proteico presente en enterobacterias y algunas γ -proteobacterias que asiste la separación de los nuevos *oriC* y, junto con la topoisomerasa IV, promueve la decatenación del DNA (revisado en Hajduk *et al.*, 2015).

Una vez separados los cromosomas, con la formación del septo y la división celular se reparte el citoplasma por igual para generar dos células hijas con una dotación genética completa e idéntica (Marr *et al.*, 1966). La división celular requiere una coordinación con el proceso de la replicación y la segregación, de manera que para que tenga lugar la división se necesita que la replicación y el reparto de los cromosomas hayan sido completados y además que la relación DNA/masa se encuentre por encima de un valor determinado (Botello y Nordström, 1998; Campbell, 1957; revisado en: Cook *et al.*, 1981; Thanbichler y Shapiro, 2006; Trun y Gottesman, 2010).

3.2. Replicación en *Salmonella typhimurium*

S. typhimurium es una enterobacteria cuya posición filogenética es muy cercana a la de *E. coli* (Mira y Ochman, 2002). Su material genético está recogido en un solo cromosoma con un tamaño de 4,86 Mpb. La proximidad filogenética entre el género *Salmonella* y *E. coli*,

determinada mediante el uso de *oriC* como marcador filogenético, revela una alta similitud en el origen de replicación entre ambas bacterias (Roggenkamp, 2007). En *S. typhimurium* la región del origen de replicación abarca 378 pb y presenta cerca del 90 % de conservación con la región *oriC* de *E. coli*, mientras que en la región del término el grado de conservación es menor (Mira y Ochman, 2002; Zyskind y Smith, 1980).

La replicación del cromosoma de *S. typhimurium* comienza en el origen de replicación, *oriC*, que guarda gran homología con el de *E. coli* (Roggenkamp, 2007). La proteína DnaA, muy similar a la de *E. coli*, se une a las regiones que reconoce en el origen de replicación para provocar la apertura de la doble hélice y permitir el acceso de la maquinaria de replicación. La mayoría de los aspectos de la replicación de *S. typhimurium* transcurren de manera muy similar a como sucede en *E. coli* (Chan y Lark, 1969; Donczew *et al.*, 2012; Messer y Weigel, 1996).

3.3. Replicación en *Bacillus subtilis*

El cromosoma de *B. subtilis* tiene un tamaño de 4,21 Mpb. Su origen de replicación es un origen bipartido, compuesto de dos regiones, cada una conteniendo al menos un grupo de secuencias de unión de DnaA y separadas por el gen *dnaA* (Figura 4) (Moriya *et al.*, 2009; revisado en Wolanski *et al.*, 2015). En la región completa del origen se han identificado tres conjuntos de secuencias de unión de DnaA, denominados *incA*, *incB* e *incC*, que contienen seis, siete y siete secuencias reconocidas por la proteína DnaA, respectivamente; entre *incB* e *incC* se localiza *dnaA* (Figura 4) (revisado en Rajewska *et al.*, 2012; Wolanski *et al.*, 2015). Se han definido dos regiones ricas en AT: a la izquierda, una con tres repeticiones de una secuencia de 16 nucleótidos; a la derecha, otra secuencia de 27 pb, siendo esta última región la que hace la función de DUE en el origen de *Bacillus* (Moriya *et al.*, 1994; revisado en Rajewska *et al.*, 2012). Aunque las regiones ricas en AT en *E. coli* y *B. subtilis* son bastante diferentes en cuanto a la secuencia, el patrón espacial de apertura de la doble hélice es muy similar (Krause y Messer, 1999; Seitz *et al.*, 2001).

B. subtilis presenta un único cromosoma circular que en estado vegetativo se replica bidireccionalmente desde un único origen, *oriC* (revisado en Moriya *et al.*, 1999). Del mismo modo que en el resto de bacterias, el inicio de la replicación cromosómica es un proceso altamente controlado, aunque en la Gram-positiva *B. subtilis* todavía se desconocen muchos factores y mecanismos. Al igual que en *E. coli*, la unión de la proteína DnaA a sus sitios de reconocimiento en *oriC* actúa como regulador positivo provocando la apertura localizada en la región del origen, lo que permite el ensamblaje del replisoma, y desencade el inicio de la replicación cromosómica (Moriya *et al.*, 1999). Como en *E. coli*, el exceso de DnaA genera el anticipo del inicio de la replicación en el ciclo celular, pero la localización de los sitios DnaA en el genoma de *B. subtilis* sugiere que además de controlar el inicio de la replicación tenga otras funciones, como la estabilización de la estructura alrededor de *oriC* necesaria para que tenga



Figura 4. Estructura de la región del origen de replicación de *B. subtilis*, *oriC* (modificado de Charbon y Løbner-Olesen, 2011; Rajewska *et al.*, 2012; Wolanski *et al.*, 2015). Se representan la posición de las regiones con secuencias de unión de DnaA (*incA*, *incB*, *incC*) y la orientación de dichas secuencias (▷; el color más oscuro significa mayor afinidad), las regiones ricas en AT (AT) y la localización del gen *dnaA*.

lugar el inicio (Ishikawa *et al.*, 2007; Ogura *et al.*, 2001). El desconocimiento en el control del inicio de la replicación de *B. subtilis* es mayor sobre todo en lo que respecta a los mecanismos negativos que controlan que el inicio tenga lugar una única vez por ciclo celular. Se cree improbable la existencia de los mecanismos de secuestro de nuevos orígenes e inactivación de DnaA por Hda conocidos en *E. coli*, dado que en la secuencia del genoma de *B. subtilis* no se han encontrado homólogos de SeqA, la metilasa Dam y Hda (revisado en: Katayama *et al.*, 2010; Kunst *et al.*, 1997; Messer, 2002). Sin embargo en *B. subtilis* existen muchas otras proteínas que regulan negativamente a *oriC*, como Spo0A, encargada de la regulación de la transcripción de varios genes en estado estacionario y de la regulación de la transcripción específica de esporulación, y SirA, que funciona como inhibidor de la replicación en esporulación. También se conocen varias proteínas que ejercen una regulación negativa sobre DnaA, como YabA, proteína homóloga en función pero no en secuencia a la proteína Hda de *E. coli* que reprimiría la actividad de DnaA al unirse a ella en forma de homotetrámero, y Soj, una proteína multifuncional con capacidad de unirse directamente a DnaA y regular su actividad (Cho *et al.*, 2008; Goranov *et al.*, 2009; revisado en Katayama *et al.*, 2010; Scholefield *et al.*, 2011; revisado en Skarstad y Katayama, 2013). Se ha visto que la reubicación de *oriC* en diferentes posiciones del cromosoma potencia el inicio de replicación, lo que sugiere la existencia de una estructura en el DNA próxima a la localización original de *oriC* que controle negativamente el inicio (Moriya *et al.*, 2009).

La maquinaria de replicación del cromosoma de *B. subtilis*, al igual que en *E. coli*, está asociada a la membrana de la bacteria, y resultados publicados han evidenciado la localización subcelular de la región *oriC* y algunas proteínas de la replicación a lo largo del ciclo celular (Bravo *et al.*, 2005).

3.4. Replicación en *Vibrio cholerae*

Los vibrios son bacterias Gram-negativas halófilas procedentes de medios marinos y estuarios. En las más de 60 especies incluidas en este grupo se encuentra una amplia variedad de características y formas de vida que diferencian el cultivo de cada una de las especies, existiendo incluso vibrios viables pero no cultivables en laboratorio. La especie más documentada de este grupo es *Vibrio cholerae*, el agente causante de la enfermedad diarreica del cólera. En 1998 se descubrió que el genoma de *V. cholerae* está repartido en dos cromosomas circulares de tamaños diferentes: un cromosoma mayor (cromosoma I) de 2,96 Mpb y un cromosoma más pequeño (cromosoma II) de 1,07 Mpb (Heidelberg *et al.*, 2000; Trucksis *et al.*, 1998). En todos los miembros de la familia *Vibrionaceae* analizados posteriormente se ha encontrado la misma ordenación genómica (Okada *et al.*, 2005). El cromosoma I contiene la mayoría de los genes imprescindibles para el crecimiento de la bacteria, pero no todos, por lo que el cromosoma II es de hecho un cromosoma y no un plásmido prescindible (Heidelberg *et al.*, 2000).

El origen de replicación del cromosoma I de *V. cholerae*, *oriCI*, mantiene una elevada homología con el *oriC* de *E. coli* (Figura 5). Esta secuencia de 337 pb presenta una identidad del 58 % con el *oriC* de *E. coli*, mientras que el origen de replicación del cromosoma II no tiene tanto parecido con el de *E. coli* (Egan y Waldor, 2003; Roggenkamp, 2007). *oriCI* presenta seis secuencias reconocidas por la proteína DnaA, de las cuales cinco son comunes para el resto de las enterobacterias (R1-R4 y M), y la sexta (R_v) es característica del género *Vibrio*, aunque no es esencial para la replicación en la región mínima del origen (Saha *et al.*, 2004). Como regiones ricas en AT en *oriCI* aparecen tres trémeros (L, M y R) con secuencias parecidas a las determinadas para el origen de *E. coli*.

La secuencia del origen de replicación del cromosoma II, *oriCII*, abarca 887 nucleótidos y contiene hasta 11 secuencias de unión de las proteínas iniciadoras en la secuencia del origen (una, de 9 pb, correspondiente a DnaA y el resto, de 12 pb, a RctB). El cromosoma II es más

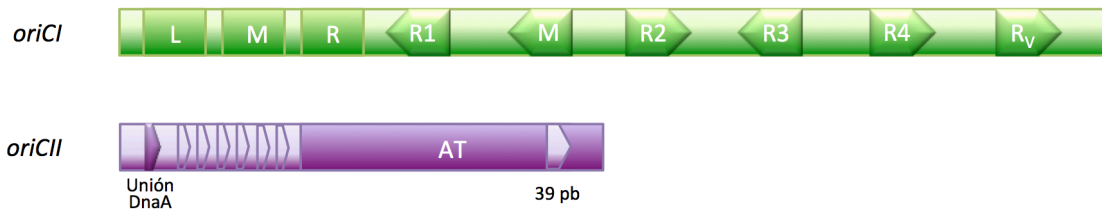


Figura 5. Estructura de la región del origen de replicación del cromosoma I y la región mínima requerida para la replicación del cromosoma II de *V. cholerae*, *oriCI* y *oriCII* respectivamente (modificado de Gerding *et al.*, 2015; Saha *et al.*, 2004; Wolanski *et al.*, 2015). Se representan la posición de las secuencias de unión de DnaA (R1-R4, M y Rv) o RctB (>) y su orientación y las regiones ricas en AT (L, M, R y AT).

parecido a un plásmido que a un cromosoma bacteriano; presenta iterones propios de los plásmidos como secuencias de unión de las proteínas iniciadoras, aunque la secuencia del origen de replicación *oriCII* no guarda homología con la secuencia del origen de otros cromosomas o plásmidos conocidos (Figura 5). La zona a la izquierda de la región mínima de *oriCII* controla la actividad del origen. Contiene otros docémeros para la unión de RctB, y una secuencia de 39 pb también para la unión de RctB pero con función inhibitoria. (Egan y Waldor, 2003; Gerding *et al.*, 2015; Kadoya y Chatteraj, 2012; Okada *et al.*, 2005).

Estudios recientes han puesto de manifiesto el excelente modelado que la evolución ha generado en la secuencia de *oriCII* de *V. cholerae*, de manera que no se permiten mutaciones ni alteraciones en gran parte de sus motivos (Gerding *et al.*, 2015).

La replicación y la segregación de cada cromosoma de *V. cholerae* tienen diferente control genético. El origen de replicación del cromosoma I, *oriCI*, es muy similar al *oriC* de *E. coli*, y lo mismo sucede con la proteína iniciadora de ambos cromosomas de *V. cholerae*, $DnaA_{vc}$, con respecto a DnaA de *E. coli* (Duigou *et al.*, 2006; Egan y Waldor, 2003; Heidelberg *et al.*, 2000). En el caso del cromosoma II, ni la secuencia de *oriCII* ni la proteína iniciadora de la replicación específica del cromosoma II, RctB, guardan homología a sus equivalentes funcionales en otros cromosomas o sistemas de replicación plasmídica conocidos, aunque sí aparecen en todos los vibrios y probablemente sean indispensables para la replicación (Egan y Waldor, 2003; Okada *et al.*, 2005). Ambos cromosomas contienen homólogos de proteínas plasmídicas implicadas en sistemas de partición, como ParAB1 y ParAB2, que son responsables del reparto y segregación del cromosoma II (Kadoya y Chatteraj, 2012).

El sistema de replicación del cromosoma I de *V. cholerae* transcurre de manera idéntica a como sucede en *E. coli*, mientras que el del cromosoma II es parecido al de los plásmidos con control de la replicación por iterones (Egan y Waldor, 2003; Koch *et al.*, 2010; revisado en Val *et al.*, 2014). El inicio de la replicación en el cromosoma II tiene lugar cuando han transcurrido 2/3 del ciclo celular después de la iniciación del cromosoma I y, por este retraso y teniendo en cuenta el tamaño de los dos cromosomas, ambos terminan la replicación aproximadamente al mismo tiempo (Rasmussen *et al.*, 2007). De manera similar a como sucede en plásmidos, el cromosoma II de *V. cholerae* cuenta con secuencias denominadas iterones para la unión de la proteína iniciadora RctB. A diferencia de los iterones plasmídicos, los iterones del cromosoma II incluyen secuencias GATC susceptibles de ser metiladas y cuando estas secuencias están metiladas en las dos cadenas de la molécula de DNA es cuando los iterones tienen mayor afinidad por RctB. La concentración de la proteína RctB es un factor limitante para el inicio de la replicación; la unión de RctB a los iterones induce la apertura de la doble hélice y esto es lo que permite el inicio de la replicación (revisado en Val *et al.*, 2014). El sistema de control del inicio de la replicación del cromosoma II de *V. cholerae* es más elaborado que el de los plásmidos con control por iterones, puesto que además de iterones contiene sitios secundarios de 39 pb con un papel únicamente inhibitorio que evita el exceso de replicación.

Los iterones antagonizan la actividad de estas regiones de 39 pb, desempeñando únicamente papeles positivos (Baek y Chatteraj, 2014). La replicación del cromosoma II también cuenta con elementos de regulación negativa, como el *locus rctA*, cuya transcripción es responsable de un circuito capaz de regular la disponibilidad de RctB (Venkova-Canova *et al.*, 2006). A la regulación de la replicación del cromosoma II recientemente se ha sumado la presencia de una secuencia intensificadora (*enhancer site*) en el cromosoma I con capacidad de controlar la frecuencia y el momento del inicio de la replicación del cromosoma II al favorecer la unión de RctB a *oriCII* (Baek y Chatteraj, 2014).

Mientras que la replicación y la segregación de los dos cromosomas de *V. cholerae* tiene lugar en posiciones en la célula y momentos diferentes, la replicación y la segregación de las regiones de término tienen lugar a la vez y en el centro de la célula (revisado en Val *et al.*, 2014). En *V. cholerae* tanto la replicación como la posterior segregación de los cromosomas son procesos excepcionalmente rápidos, posiblemente porque el reparto del genoma en dos cromosomas y el retraso en la replicación del cromosoma de menor tamaño contribuyan a reducir la carga metabólica y la complejidad de la replicación (Rasmussen *et al.*, 2007; Srivastava y Chatteraj, 2007).

4. Replicación de minicromosomas y plásmidos en *Escherichia coli*

Los plásmidos bacterianos son moléculas extracromosómicas, la mayoría de DNA circular de doble cadena, que se mantienen dentro de la célula en un número característico de copias. Su tamaño puede ir desde 1 kpb hasta más de 200 kpb y se encuentran en muchas especies bacterianas, aunque también se han encontrado en especies de arqueas y eucariotas (Woese *et al.*, 1990). Los plásmidos se comportan como unidades genéticas adicionales que se heredan y se replican de forma independiente al cromosoma bacteriano, aunque para llevar a cabo su replicación y transcripción autónomas necesitan valerse de enzimas y proteínas proporcionadas por el hospedador. En la naturaleza los plásmidos tienen una gran distribución, con variaciones en la estructura, el tamaño, el modo de replicación, el número de copias por célula bacteriana, la capacidad para propagarse en diferentes bacterias y, quizá la característica más importante, la diferente información que pueden portar. Debido a su impacto en las comunidades microbianas y su potencial natural para actuar como vectores de clonación, la investigación en torno a los plásmidos se ha visto estimulada desde perspectivas clínicas, biotecnológicas y medioambientales, así como desde la investigación fundamental (revisado en del Solar *et al.*, 1998). Los plásmidos a menudo contienen genes que especifican funciones que pueden ser ventajosas para la célula hospedadora en determinadas circunstancias, confiriendo resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, sensibilidad o resistencia a bacteriófagos, producción de enzimas de restricción, producción de aminoácidos no habituales, producción de toxinas, catabolismo de moléculas orgánicas complejas, o capacidad para transferir DNA entre especies de diferentes reinos. Además su organización genética y manipulación en el laboratorio son relativamente sencillas, lo que también ha contribuido al desarrollo de la investigación en torno a los plásmidos (Feinbaum, 1998; Martínez-García *et al.*, 2015).

Los plásmidos presentan un origen de replicación, generalmente llamado *ori*, así como los genes que codifican los RNAs y las proteínas necesarios para este proceso y su control. Al igual que en los cromosomas bacterianos, también en los orígenes de replicación de los plásmidos se identifican secuencias repetidas ricas en AT aunque es difícil determinar una secuencia consenso entre diferentes plásmidos dado que la longitud de estas repeticiones es variable. Sin embargo sí se puede establecer un consenso entre las repeticiones dentro de un origen particular (Feinbaum, 1998; revisado en Rajewska *et al.*, 2012; del Solar *et al.*, 1998).

Al igual que los cromosomas, los plásmidos se replican durante el ciclo celular bacteriano de manera que las nuevas células obtienen cada una al menos una copia del plásmido en el

momento de la división celular. Se ha observado la localización específica de algunos plásmidos en zonas concretas del interior de la célula bacteriana, sugiriendo que la replicación plasmídica tiene lugar en compartimentos subcelulares determinados, al igual que la replicación del cromosoma (revisado en Bravo *et al.*, 2005).

La replicación de los plásmidos se caracteriza por ser autónoma y autocontrolada. Según el número de copias en que el plásmido esté presente el plásmido en la célula, su replicación puede coordinarse con el ciclo celular bacteriano. Los plásmidos de alto número de copias tienden a tener un control de la replicación relajado; comienzan la replicación del DNA en un proceso controlado por funciones codificadas por el propio plásmido y carecen de un mecanismo que asegure la correcta segregación a las células hijas, aunque esto no supone un problema para su mantenimiento en la población por segregación aleatoria, puesto que con que cada célula hija reciba una copia del plásmido sería suficiente. Por el contrario, los plásmidos con bajo número de copias suelen estar bajo un estricto control, sincronizando su replicación con la del cromosoma. La segregación al azar no sería suficiente para asegurar que cada célula hija adquiriera una copia del plásmido y, por esto, la mayoría de los plásmidos de bajo número de copias llevan genes que garantizan su mantenimiento en la población bacteriana (Feinbaum, 1998; del Solar y Espinosa, 2000).

4.1. Replicación de minicromosomas

Los minicromosomas de *E. coli* son plásmidos que se replican exclusivamente a partir de una copia clonada de su origen cromosómico de replicación, *oriC*. Son compatibles con el cromosoma bacteriano; se mantienen en un número de copias por célula de aproximadamente diez y cada copia de minicromosoma puede replicarse una sola vez por ciclo celular, de manera autónoma a partir de su propio origen y de forma sincrónica con el cromosoma de la célula que los hospeda (Koppes y von Meyenburg, 1987; Leonard y Helmstetter, 1986). Pierden esta sincronía cuando el número de minicromosomas aumenta por presión selectiva a más de 30 copias por *oriC* cromosómico (Løbner-Olesen, 1999). Siguen el mismo control estricto de la replicación que el cromosoma, dependiendo de los mismos factores para el inicio de la replicación y se ha observado que la disponibilidad de la proteína DnaA limita la replicación de ambos (Atlung *et al.*, 1987; Leonard y Helmstetter, 1988; von Meyenburg *et al.*, 1979); aunque los minicromosomas presentan aparentemente requerimientos topológicos más estrictos que el cromosoma para el inicio de replicación, debido a que muestran menor capacidad de adaptarse a cambios en el superenrollamiento por su reducido tamaño y a que compiten con el cromosoma por las proteínas que ejercen una función estructural sobre el inicio de la replicación (Asai *et al.*, 1998; Dasgupta y Løbner-Olesen, 2004). El origen de replicación del minicromosoma muestra en general un comportamiento bastante similar al del *oriC* cromosómico. El inicio de la replicación en *E. coli* está controlado de manera que todas las copias de *oriC* presentes en la célula, cromosómicas y minicromosómicas, inician en un breve intervalo del ciclo celular. Este hecho convierte a los minicromosomas en sistema modelo para el estudio del mecanismo de la replicación cromosómica en bacterias, así como su regulación (revisado en Dasgupta y Løbner-Olesen, 2004).

A pesar de presentar una replicación específica del ciclo celular, los minicromosomas son muy inestables en una población en crecimiento, al no tener sistema de reparto activo ni control del número de copias, y la célula tampoco controla directamente el número de copias del minicromosoma (Jensen *et al.*, 1990; Løbner-Olesen *et al.*, 1987). En este trabajo se ha empleado un minicromosoma en el que no funciona el mecanismo de reparto normal del cromosoma, y también se ha empleado el mismo minicromosoma al que se le ha introducido el sistema de partición activa *sopABC* del plásmido F para estabilizar la presencia del minicromosoma en las células hijas (Niki y Hiraga, 1999; pALO264 y pALO267 en apartado 1 de Materiales).

4.2. Replicación de plásmidos

Los plásmidos bacterianos son modelos muy útiles para el estudio de los mecanismos de regulación de la replicación del DNA. Hay tres mecanismos generales de replicación para plásmidos circulares: tipo *theta*, desplazamiento de la cadena y círculo rodante (revisado en del Solar *et al.*, 1998). El mecanismo más estudiado es la replicación tipo *theta*, que es el que siguen la mayoría de los plásmidos prototipo. Todos los plásmidos utilizados en este trabajo siguen una replicación por el mecanismo tipo *theta*. Este modelo de replicación conlleva la separación de las dos hebras parentales, síntesis de un cebador de RNA e inicio de la síntesis de DNA a través de la extensión del cebador de RNA (Kornberg y Baker, 1992). Aunque hay excepciones, por lo general los plásmidos que se replican por medio de este mecanismo necesitan la proteína iniciadora Rep, codificada por el plásmido, así como secuencias específicas para la unión de dicha proteína en el origen de replicación. También son necesarias en el origen secuencias ricas en AT para la apertura de la doble hélice y sitios para la unión de la proteína iniciadora DnaA (revisado en: Lilly y Camps, 2015; del Solar *et al.*, 1998).

Los mecanismos de regulación de la replicación de plásmidos para el mantenimiento de su número de copias por célula característico difieren de los del cromosoma bacteriano en que el número de nuevos plásmidos que se añaden por cada ciclo celular depende del número de plásmidos preexistentes: a mayor número, menor número de copias son hechas. Dependiendo del control de la replicación, los plásmidos estudiados en este trabajo se agrupan en plásmidos con control por iterones y plásmidos con control por RNA antisentido (asRNA).

4.2.1. Plásmidos con control por iterones

El origen de replicación de los plásmidos incluidos en este grupo contiene múltiples copias de secuencias directamente repetidas denominadas iterones, donde se une la proteína esencial iniciadora de la replicación Rep, codificada por un gen del plásmido que se localiza generalmente próximo al origen. Los iterones son secuencias cortas (aproximadamente 20 pb), características para cada plásmido, repetidas múltiples veces (3-7) y separadas entre ellas por una distancia que se ajusta generalmente a la periodicidad de la doble hélice (11 pb). Tanto la especificidad de la secuencia como el espaciamiento de los iterones son importantes para su reconocimiento específico por Rep. Los iterones se localizan dentro de la región del origen de la replicación, aunque también pueden aparecer alejados, como es el caso de los plásmidos de bajo número de copias F y P1, donde no serían imprescindibles para el inicio pero sí para el control de la replicación (revisado en Chatteraj, 2000). La unión Rep a sus secuencias de reconocimiento induce la desestabilización inicial de la doble hélice de DNA permitiendo el inicio de la replicación. En las secuencias ricas en AT del origen, donde tiene lugar la apertura de la doble hélice, el porcentaje en adenina y timina varía desde aproximadamente el 60 % para el plásmido P1 hasta el 84 % en pSC101, e incluso el 90 % en el plásmido F. El número y la longitud de las secuencias de la región rica en AT de cada plásmido podría jugar un papel en el inicio de su replicación (revisado en Rajewska *et al.*, 2012). La presencia de iterones y proteínas Rep hace que la replicación de estos plásmidos sea independiente del control de la replicación del cromosoma. La interacción de los iterones con las proteínas iniciadoras no sólo es necesaria para que la replicación tenga lugar, sino que además es esencial para el ajuste del número de copias a través del control de la replicación del plásmido, tanto para su activación como para la inhibición de la replicación, tras déficit o exceso de copias en la célula hija a causa de un reparto aleatorio (Chatteraj, 2000; Filutowicz *et al.*, 1994). Son ejemplos de plásmidos con control por iterones F, P1, pSC101, R6K, pPS10, Rts1 y pColIIV-K30 (revisado en del Solar *et al.*, 1998). La mayoría de los plásmidos con iterones en su origen se replican mediante la formación de intermediarios de tipo *theta*; los plásmidos estudiados en este trabajo con control de la replicación por iterones siguen este modelo de replicación.

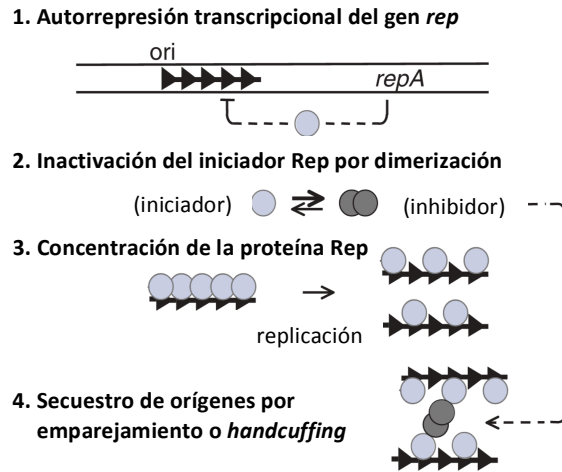


Figura 6. Mecanismos de control de la regulación de la replicación en los plásmidos con iterones (modificado de Paulsson y Chattoraj, 2006).

Se han descrito cuatro mecanismos que limitan el inicio de la replicación de los plásmidos con iterones (Figura 6): (1) autorrepresión transcripcional del gen *rep* por la proteína Rep; (2) dimerización de la proteína iniciadora Rep, que hace que se reduzca la proteína en su forma monomérica activa; (3) dilución de la proteína iniciadora, que evita la saturación del origen de replicación; y (4) secuestro de orígenes por emparejamiento o *handcuffing*. El mecanismo de regulación negativa de la replicación que procede a través del secuestro por emparejamiento de orígenes es mediado por interacciones Rep-Rep y posible gracias a la concentración de plásmidos en la célula. Este emparejamiento supone un impedimento estérico para ambos orígenes que impide la apertura del origen y el establecimiento del complejo de iniciación o replisoma (revisado en: Chattoraj, 2000; Lilly y Camps, 2015; Paulsson y Chattoraj, 2006).

4.2.1.1. Plásmido F

El plásmido F es una molécula de gran tamaño y, por ello, en condiciones de laboratorio y para estudios de su mecanismo de replicación, se suele utilizar una molécula más pequeña denominada plásmido mini-F. Los plásmidos mini-F poseen todas las funciones necesarias para la replicación de plásmidos F (Helmstetter *et al.*, 1997). El plásmido F tiene un estricto control de la replicación que mantiene un número de copias de una o dos por copia del cromosoma de la célula hospedadora (Lovett y Helinski, 1976). Posee un origen de replicación primario, denominado *oriV*, y otro secundario, *oriS*, que funciona cuando el primero no está presente (Eichenlaub *et al.*, 1977; Kahn *et al.* 1979). El replicón básico de F (la mínima secuencia capaz de mantener la replicación y su regulación) lo componen el origen de replicación secundario *oriS*, el gen de la proteína iniciadora *repE* y los lugares *incB* (iterones) e *incC* (repeticiones invertidas), que expresan incompatibilidad con otros derivados del plásmido F (Helmstetter *et al.*, 1997; Tolun y Helinski, 1981). La estructura del replicón básico mini-F se muestra en la Figura 7.

El origen de replicación *oriS* presenta dos secuencias de unión de DnaA, seguidas de una región rica en pares AT y cuatro iterones de 19 pb para la unión de RepE. El gen *repE* del plásmido codifica la proteína iniciadora RepE, que puede estar presente en la célula en forma de dímeros o de monómeros. En forma monomérica, RepE se une de forma específica a sus secuencias de reconocimiento o iterones (una proteína a cada iterón) en el origen de replicación para promover, junto con la asistencia de la proteína HU celular, la apertura de la doble hélice en la región rica en AT. La proteína DnaA de la célula se une en un extremo del origen para favorecer la apertura de la doble hélice (Kawasaki *et al.*, 1996). El inicio de la

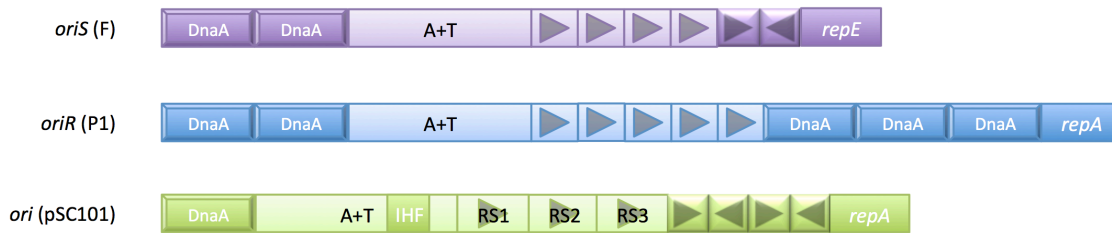


Figura 7. Estructura de la región del origen de los plásmidos con regulación de la replicación por iterones F (*oriS*), P1 (*oriR*) y pSC101 (*ori*) (modificado de Chatteraj, 2000; Manen y Caro, 1991; y Park *et al.*, 1998). Se representan las secuencias de unión de DnaA (DnaA), las regiones ricas en AT (A+T), los iterones (▶), las secuencias repetidas inversas (▶◀) y los genes que codifican las proteínas iniciadoras de cada plásmido (*repE*, *repA*).

replicación a partir de *oriS*. En forma dimérica, RepE tiene una actividad represora sobre su propia transcripción, que ejerce mediante la unión de sus dímeros al promotor de *repE*. Se han identificado proteínas de choque térmico con función activa en la interconversión entre las dos conformaciones, mono y dimérica, de la proteína (Ishiai *et al.*, 1994).

El plásmido F cuenta también con el sistema de partición *sopABC*, que distribuye activamente los plásmidos entre las células hijas asegurando un reparto equitativo (revisado en Hiraga, 1992; Niki y Hiraga, 1999). En este sistema, la proteína SopB se une a la secuencia *sopC*, que actúa de forma equivalente a un centrómero eucariótico, interaccionando de manera todavía no bien definida. La proteína SopA, una NTPasa que actúa como proteína motora, se une a los complejos de partición SopB-*sopC* para el reparto activo de los plásmidos entre las células hijas (Bouet y Lane, 2009; Pillet *et al.*, 2011). Tanto en la replicación como en el reparto del plásmido F también está implicada la membrana celular (Firshein y Kim, 1997).

4.2.1.2. Plásmido P1

P1 es un plásmido de bajo número de copias y su estabilidad en la célula depende de asegurar un número de copias apropiado y una buena distribución de las mismas entre las células hijas. En la Figura 7 se representa esquemáticamente la estructura del origen de replicación de P1. En el extremo de la izquierda aparece un grupo de dos secuencias de unión de DnaA, seguido de una región rica en AT y cinco iterones de 19 pb para la unión de la proteína iniciadora; en el extremo derecho hay otro grupo de tres secuencias de unión de DnaA. En la región del origen también hay cinco sitios GATC cuya metilación en los residuos de adenina es necesaria para una replicación eficiente (revisado en: del Solar *et al.*, 1998; Rajewska *et al.*, 2012). En el plásmido se codifican los sistemas para la replicación y la segregación del propio plásmido, aunque para estos procesos también son necesarias ciertas proteínas celulares (Firshein y Kim, 1997; Jaffé-Brachet y D'Ari, 1977).

El control de la replicación depende de la proteína iniciadora plasmídica RepA, inactiva cuando está en forma de dímeros y activa en forma monomérica, y de la proteína DnaA de la célula hospedadora. La formación del complejo inicial requiere la activación de RepA por disociación de los dímeros de proteína, y el cambio conformacional necesario es promovido por unas proteínas de choque térmico (Dasgupta *et al.* 1993; revisado en Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004; Wickner, 1990; Wickner *et al.*, 1991). RepA en forma monomérica puede reconocer y unirse a los cinco iterones del origen. Este hecho, junto con la unión de las proteínas DnaA y HU de la bacteria a sus respectivas secuencias en el origen de replicación del plásmido, es lo que promueve la apertura de la secuencia rica en AT del origen de P1. La unión de DnaA a los dos grupos de secuencias dispuestos en los extremos del origen da lugar a una estructura de lazo que favorece la carga de la helicasa DnaB en una de las dos hebras del DNA

para una replicación unidireccional (revisado en Lilly y Camps, 2015; Park *et al.*, 1998). Aparte de la regulación positiva ejercida por RepA, en el plásmido P1 existen iterones fuera de la región *oriR* que se cree que son los responsables de un control negativo de la replicación plasmídica mediante un mecanismo de secuestro por emparejamiento de orígenes o *handcuffing*, por medio de la unión de RepA (Pal y Chatteraj, 1988; revisado en Paulsson y Chatteraj, 2006).

Para la partición del plásmido intervienen proteínas codificadas por sistema de reparto *parABS* del propio plásmido, ParA y ParB, y las únicas proteínas celulares identificadas para esta función son IHF, que potencia la afinidad de ParB por su lugar de unión, *parS*, y la helicasa DnaB, cuya ausencia reduce la estabilidad del plásmido (Funnell, 1988; revisado en Hiraga, 1992; Slavcev y Funnell, 2004). Las características estructurales de ParB permiten la formación de un complejo ParB-*parS*, que constituye una etapa crítica en el reparto plasmídico (Schumacher y Funnell, 2005; Schumacher *et al.*, 2007).

4.2.1.3. Plásmido pSC101

pSC101 es un plásmido de bajo número de copias que presenta aproximadamente cinco copias por cromosoma de *E. coli*. Para la replicación de pSC101 hay en su secuencia tres regiones principales: la región *ori*, donde se inicia la replicación unidireccional y que incluye la mayoría de los sitios requeridos para la replicación; el gen *repA*, que codifica la proteína iniciadora RepA específica de la replicación del plásmido; y la región *par*, responsable de la estabilidad del plásmido y del control del número de copias (Hinchliffe *et al.*, 1982; revisado en: Kües y Stahl, 1989; Lilly y Camps, 2015). La región *ori*, representada en la Figura 7, contiene un sitio de unión de DnaA y dos trecémeros, todos homólogos a los de *oriC*; a continuación se encuentra el sitio de unión de IHF incluido en la región rica en AT, proteína codificada por el hospedador y esencial para la replicación (Stenzel *et al.*, 1987); le siguen tres iterones de 21 pb, RS1, RS2 y RS3, a los cuales se une RepA, y cuatro secuencias repetidas inversas, también para la unión de RepA (Arini *et al.*, 1991; revisado en: Manen y Caro, 1991; Rajewska *et al.*, 2012). La región *par* se sitúa adyacente al origen de replicación, pero fuera de él.

La proteína RepA de pSC101 es funcional tanto en forma de monómeros como de dímeros, aunque con diferentes actividades. Se desconoce cuál es la señal que convierte los dímeros de proteína iniciadora en monómeros en el caso de RepA de pSC101 (revisado en Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004). Cuando la proteína está presente en forma monomérica se une a los iterones facilitando el inicio de replicación junto con la unión de las proteínas DnaA e IHF del hospedador a sus respectivos sitios de unión. Por el contrario, en forma de dímeros, RepA regula negativamente su propia transcripción mediante su unión a las secuencias invertidas (revisado en: Manen y Caro, 1991; del Solar *et al.*, 1998). RepA también está implicada en el reparto del plásmido cuando el locus *par* es defectivo (Conley y Cohen, 1995).

4.2.2. Plásmidos con control por RNA antisentido

En los plásmidos pertenecientes a este grupo la regulación de la replicación depende de unas moléculas de RNA antisentido pequeñas y difusibles o asRNA. Los asRNA se expresan en *cis* en el propio plásmido y son completamente complementarios a sus dianas, los RNA sentido o sRNA, que habitualmente son moléculas de RNA mensajero que codifican proteínas con funciones importantes (revisado en Brantl, 2002a). Los asRNA suelen ser moléculas inestables que se sintetizan de forma constitutiva y que tienen una longitud entre 35 y 150 nucleótidos. Tridimensionalmente resultan en una molécula con cuatro estructuras de tallo y lazo cuya distribución dificulta la degradación por las RNasas celulares, a la vez que facilita la interacción de la molécula con su sRNA (revisado en Wagner *et al.*, 2002). Generalmente esta interacción

consigue la regulación de la replicación mediante la inhibición de la función de la molécula diana, esencial para la replicación (revisado en Brantl, 2000b).

El control de la replicación por asRNA se basa en un circuito de control negativo. Una variación en el número de copias del plásmido desencadenará una modificación en la concentración de asRNA y, cuando estas variaciones sean detectadas, se alterará la frecuencia del inicio de la replicación. Un aumento en el número de copias del plásmido provocará que aumente la concentración de asRNA que, a su vez, dará lugar a la inhibición de la replicación del plásmido. Además del control de la replicación, el número de copias y la conjugación en plásmidos, también se conocen otras funciones atribuidas a asRNA, como la transposición de elementos móviles, la elección entre lisis o lisogenia en fagos (revisado en Brantl, 2002a).

Dentro de los plásmidos con control de la replicación por asRNA se encuentran plásmidos como R1 y los de la familia de ColE1, en los que se describió por primera vez este sistema (Tomizawa *et al.*, 1981).

4.2.2.1. Plásmido R1

R1 es un plásmido de bajo número de copias perteneciente al grupo de incompatibilidad IncFII. Su replicación procede unidireccionalmente mediante el mecanismo theta a partir de un único origen de replicación denominado *oriR1* (Nordström, 2006). La región mínima del origen para la replicación abarca una zona de 188 pb que incluye una secuencia de unión de DnaA de 9 pb, una región de 100 pb flanqueada por dos lugares de 10 pb con distinta afinidad por RepA, y una región rica en AT con tres repeticiones de 9 pb. El inicio de la replicación tiene lugar en el sitio G, localizado a 400 pb de *oriR1* (revisado en: Lilly y Camps, 2015; del Solar *et al.*, 1998). Se muestra un esquema de la región del origen de R1 en la Figura 8.

Para el inicio de la replicación de R1 se requiere la unión de alrededor de 20 moléculas de la proteína iniciadora RepA a la región del origen, de manera similar a la unión de DnaA en el origen cromosómico. De esta manera se facilita la apertura de la región rica en AT y es posible el reclutamiento y ensamblaje de la maquinaria de replicación en la cadena sencilla de DNA (revisado en Nordström, 2006). En el origen de replicación de R1 hay una secuencia de unión de DnaA y aunque esta proteína no es esencial para el inicio, su presencia potencia la eficiencia de la replicación (Bernander *et al.*, 1992).

La regulación del número de copias de R1 depende de la disponibilidad de la proteína RepA, codificada por el plásmido y esencial para la replicación (revisado en Brantl, 2002b). La síntesis de RepA es controlada transcripcionalmente y postranscripcionalmente por los productos de los genes del control del número de copias *copB* y *copA*, respectivamente (Molin *et al.*, 1991; Stougaard *et al.*, 1981). El número de copias de R1 depende principalmente de

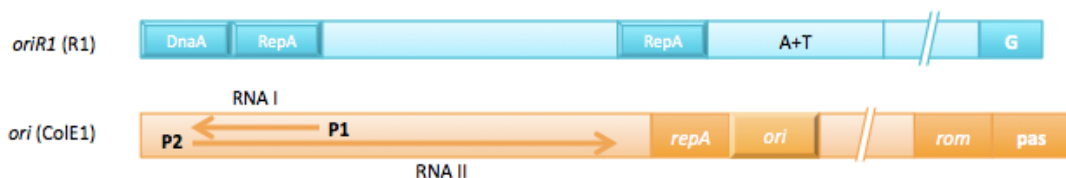


Figura 8. Estructura de la región del origen de los plásmidos con control de la replicación por asRNA R1 (*oriR1*) y ColE1 (*ori*) (modificado de Bernander *et al.*, 1992; Cesareni *et al.*, 1991; Nordström, 2006; y del Solar *et al.*, 1998). Se representan los sitios de unión de las proteínas implicadas en el inicio (DnaA y RepA), los promotores y el sentido de la síntesis de RNA I y RNA II (P1 y P2, respectivamente), los genes que codifican las proteínas necesarias para el control de la replicación en ColE1 (*repA* y *rom*) y los lugares de ensamblaje del primosoma (G y pas), a partir de donde inicia la replicación.

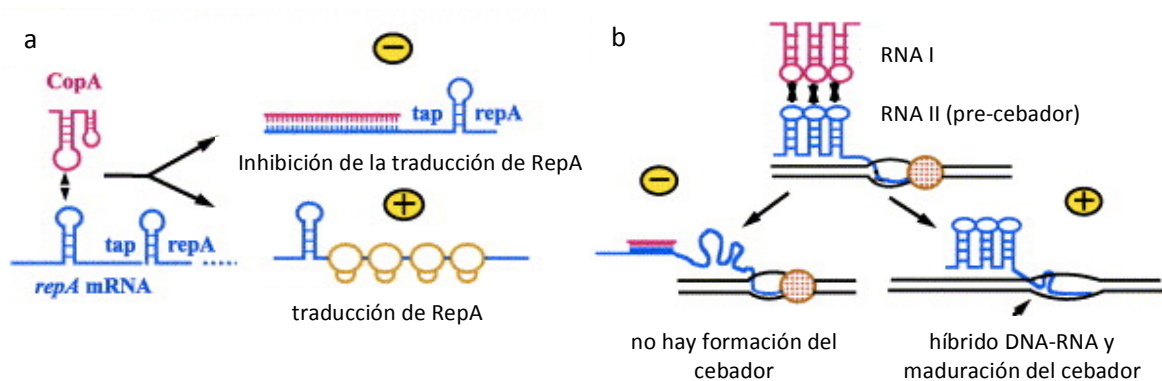


Figura 9. Mecanismo de regulación mediante asRNA en R1 (a) y ColE1 (b) (modificado de Brantl, 2002a). Se representa la interacción entre el RNA antisentido (en rojo) y el RNA sentido (en azul) en el mecanismo de activación (+) y en el mecanismo de inhibición (-).

CopA, un asRNA sintetizado constitutivamente que se une al mRNA de *repA* formando un complejo que impide la traducción del péptido líder *tap*, requerido para la síntesis de RepA, por lo que se inhibe la traducción (Figura 9; Blomberg *et al.*, 1992). CopB tiene un papel secundario, reprimiendo la transcripción de *repA* desde su promotor en circunstancias normales (revisado en: Lilly y Camps, 2015; del Solar *et al.*, 1998).

El replicón básico de R1 incluye además tres sistemas que aseguran la estabilidad del plásmido: *parA*, *parB* y *parD*. El sistema *parA* (complejo ParR-*parC* y ParM proteína motora) es un sistema de reparto activo que asegura que cada célula hija reciba al menos una copia del plásmido. Los sistemas *parB* (Hok-RNA Sok) y *parD* (Kid-Kis) son sistemas toxina-antitoxina post segregacionales que se encargan de la muerte de las células hijas que no hayan recibido ninguna copia del plásmido tras el reparto (revisado en: de la Cueva-Méndez y Pimentel, 2007; Gerdes y Wagner, 2007; Nordström, 2006).

4.2.2.2. Familia ColE1

El sistema de control del número de copias de plásmido mejor comprendido es el de la familia ColE1. La replicación de este plásmido de alto número de copias y sus derivados es unidireccional mediante estructuras tipo theta (revisado en: Camps, 2010; Wickner, 1978). La región necesaria para la replicación de ColE1 abarca aproximadamente 1 kpb e incluye dos promotores constitutivos implicados en la regulación del inicio de la replicación (Figura 8): el promotor P1, desde el que se transcribe un RNA antisentido de 108 nucleótidos denominado RNA I y que actúa como inhibidor, y el promotor P2, desde el que se transcribe el pre-cebador o RNA II de unos 600 pb (revisado en: Camps, 2010; Lilly y Camps, 2015; del Solar *et al.*, 1998). El origen de replicación de ColE1, *ori*, se sitúa a unos 555 pb a la derecha del inicio de la síntesis de RNA II. En general, el número de copias final de los plásmidos de este grupo viene determinado por la fuerza relativa de los promotores P1 y P2 y por la eficiencia de la interacción entre el inhibidor y su diana (revisado en Summers, 1998).

A diferencia de lo que sucede con R1, en los plásmidos de la familia ColE1 la regulación de la replicación se consigue por la inhibición de la maduración de RNA II, de quien depende el número de copias (revisado en Brantl, 2002b). Aunque la síntesis y la estabilidad de RNA II puede depender de factores tan diversos como la carencia de aminoácidos y la metilación del DNA, el inicio de la replicación se controla principalmente a nivel del plegado de la molécula (Herman *et al.*, 1994; Lin-Chao y Bremer, 1986; Russell y Zinder, 1987; Wegrzyn, 1999). Durante la maduración, el transcrito de RNA II se pliega adquiriendo una estructura terciaria caracterizada por cuatro dominios de tallo y lazo. El extremo 3' de RNA II forma un híbrido estable con el extremo 5' de la hebra de síntesis retrasada, dando lugar a la formación del

denominado lazo R. Tras la formación de este híbrido en la región del origen se que permite la acción específica de la RNasa H, que procesa el pre-cebador generando un extremo 3'-OH a partir del cual la DNA polimerasa I inicia la síntesis de la hebra líder (revisado en: Camps, 2010; Cesareni *et al.*, 1991; Lilly y Camps, 2015; Ohmori *et al.*, 1987). El mayor inhibidor del inicio de la replicación en ColE1 es RNA I, una molécula complementaria al extremo 5' del precursor de RNA II y cuya conformación secundaria consta de tres estructuras de tallo y lazo y una hebra desaparejada en el extremo 5' (Tomizawa e Itoh, 1981). Aunque la síntesis de RNA I es constitutiva y, por tanto, su nivel es proporcional al número de copias de plásmido, el inhibidor es una molécula inestable. La interacción por complementariedad de bases de RNA II y RNA I afecta al plegamiento de RNA II impidiéndose la formación del híbrido RNA II-DNA; el pre-cebador no es procesado por la RNasa H y como consecuencia se inhibe el inicio de la replicación (Figura 9) (revisado en: Cesareni *et al.*, 1991; Lilly y Camps, 2015).

Existe otra molécula que afecta negativamente a la replicación de ColE1, la proteína Rop, codificada por el gen *rom*. Esta proteína potencia la unión entre RNA I y transcritos de menos de 200 pb de RNA II, estabilizando su unión e impidiendo de esta manera la formación del cebador activo (Lewin, 1993). La eliminación de *rom* permite disponer de vectores con un número de copias de 3 a 5 veces superior al de ColE1, útiles en la producción de proteínas recombinantes (revisado en Camps, 2010; Martínez-García *et al.*, 2015).

4.2.2.2.1. Plásmido p15A

El plásmido p15A fue aislado por primera vez en 1968 y fue descrito como una pequeña molécula exógena de DNA presente en un número de 15 copias por célula en la cepa *E. coli* 15 en coexistencia con otros dos plásmidos de mayor tamaño denominados p15B y p15C (Cozzarelli *et al.*, 1968; Ikeda *et al.*, 1969). Más tarde se observó que p15A es capaz de funcionar como replicón independiente de los otros dos plásmidos característicos de su cepa de origen (Kretschmer *et al.*, 1975). El plásmido p15A mantiene homología con aproximadamente 1 kpb de las secuencias de ColE1 y pBR322, incluyendo la región necesaria para la replicación completa y otros 400 pb más hacia la izquierda de dicha región (Bird, 1981). Por el elevado grado de conservación entre las secuencias del origen de ColE1, p15A, pBR322 y otros plásmidos, se propuso un mecanismo de replicación común y se englobaron en la familia de plásmidos similares a ColE1 (Selzer *et al.*, 1983). Gracias a su pequeño tamaño y su alto número de copias, p15A es considerado un sistema de replicación muy útil para la construcción de nuevos plásmidos para su uso en clonación y expresión génica (Chang y Cohen, 1978; Myers y Myers, 1997; Pérez-Arellano *et al.*, 2001; Sathiamoorthy y Shin, 2012; Zeng *et al.*, 2010).

4.2.2.2.2. Plásmido pBR322

pBR322 es un plásmido de elevado número de copias considerado una herramienta muy útil ya desde el inicio de la ingeniería genética, gracias a su caracterización, incluyendo el conocimiento de su secuencia, sus mecanismos de replicación y mantenimiento, y la determinación de sus regiones codificantes (Balbás *et al.*, 1986; Balbás *et al.*, 1988; Sutcliffe, 1978; Sutcliffe, 1979). En condiciones normales está presente en número entre 15 y 20 copias por célula y se replica unidireccionalmente a partir de su origen de replicación, *ori* (Chiang *et al.*, 1991; Ohmori *et al.*, 1987).

Al carecer de sistema de reparto, pBR322 es un plásmido inestable en condiciones no selectivas; además la velocidad de crecimiento de la bacteria hospedadora influye en la replicación de pBR322 y, por tanto, en su heredabilidad (Balbás *et al.*, 1988; Lin-Chao y Bremer, 1986). Hoy en día existen muchos vectores derivados de pBR322 creados para aplicaciones específicas, en los que se han incorporado sistemas de reparto propios de otros vectores para

asegurar la estabilidad (Balbás *et al.*, 1986; Balbás *et al.*, 1988; Balbás y Bolívar, 2004; Cronan, 2007; Martínez-García *et al.*, 2015; Sathiamoorthy y Shinm 2012).

5. Respuestas bacterianas frente al estrés

Las células bacterianas han desarrollado mecanismos que les permiten detectar diferentes estímulos físicos y químicos ambientales, y responder frente a ellos adaptándose a las nuevas condiciones del entorno para sobrevivir. La capacidad de adaptación en el mundo bacteriano es fundamental en un ambiente cambiante, y de esta manera se han desarrollado multitud de sistemas para responder frente a cambios en el pH, la temperatura, los nutrientes, la osmolaridad, la disponibilidad de oxígeno o la presencia de agentes tóxicos (revisado en Magnan y Bates, 2015). Estas respuestas se basan en una cascada de alteraciones en la expresión génica y en la actividad de proteínas, resultando en la adaptación de las células a la nueva situación o bien en la eliminación del agente que genera el estrés y la reparación del daño sufrido (Giuliodori *et al.*, 2007; Hengge-Aronis, 2002). Estudios recientes, haciendo uso de la mutagénesis inducida por estrés o SIM (*stress-induced mutagenesis*), muestran que es posible mejorar la tolerancia microbiana al estrés, dotando a las células con la capacidad de evolución adaptativa autónoma para hacer frente a estreses ambientales, con el fin de mejorar la producción bacteriana de biocombustibles y otros compuestos (Zhu *et al.*, 2015).

Algunas de las respuestas al estrés más estudiadas en el mundo bacteriano son la respuesta SOS, la respuesta de choque térmico, la respuesta a la limitación de nutrientes y la respuesta al estrés oxidativo (Arsène *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2015; Giuliodori *et al.*, 2007; Janion, 2008; Khodursky *et al.*, 2015; Kreuzer, 2013; Tao *et al.*, 1999). Dichas respuestas no sólo afectan a la replicación y el metabolismo bacterianos, sino que también pueden inducir cambios en la replicación de los plásmidos presentes en las células afectadas. De hecho, la sola presencia de plásmidos en la célula a menudo da lugar a una respuesta similar a la inducida por choque térmico o limitación de nutrientes (revisado en: Silva *et al.*, 2012; Wegrzyn, 1999).

En *S. typhimurium* se han utilizado análisis de expresión génica mediante *microarrays* para estudiar la respuesta de choque y adaptativa a la presencia de nitrito acidificado en el medio (Mühlig *et al.*, 2014). Tras 10 minutos de exposición a nitrito se induce la expresión de genes de respuesta a estrés y se silencia la de genes implicados en traducción, transcripción, replicación y movilidad. Gracias a la inducción de la tolerancia al estrés y la reducción de proliferación celular, las células sobreviven en estas condiciones de estrés.

En *V. cholerae*, la respuesta restringida, una respuesta adaptativa caracterizada inicialmente como respuesta a limitación nutricional, proporciona una adaptación rápida a variedad de condiciones de estrés que inhiben el crecimiento. Se ha visto que la respuesta restringida media la producción de la toxina colérica en condiciones de anaerobiosis, en las que el microorganismo puede crecer como anaerobio facultativo (Oh *et al.*, 2014).

Otra vía por la que las células pueden aumentar la tolerancia a situaciones de estrés es a través de cambios en su material genético, mediante la activación de respuestas mutagénicas como la respuesta SOS, o por ganancia de función mediante transferencia horizontal de genes entre células por mecanismos conjugativos. El aumento en la tasa de mutación potencia la aparición de polimorfismos genéticos, a partir de los cuales la selección natural podría actuar favoreciendo mecanismos que hayan dado lugar a cambios adaptativos (revisado en Taddei *et al.*, 1997). En *B. subtilis* se ha descrito la aparición de mutagénesis asociada al factor de reparación de acoplamiento de la transcripción, Mfd. La función de Mfd en células no estresadas es evitar la formación de mutaciones, evitando paradas de la transcripción por desacoplamiento DNA-RNA. En presencia de lesiones en el DNA, esta proteína vuelve a acoplar el mRNA con la secuencia de DNA para continuar la transcripción y recluta a los sistemas de reparación necesarios para subsanar la aparición de mutaciones. En condiciones de estrés

nutricional, Mdf realinea el mRNA con la cadena de DNA en transcripción pero no recluta al sistema de reparación del DNA, resultando en la formación de lesiones que pueden conferir una ventaja para la célula (Robleto *et al.*, 2012).

5.1. Estrés térmico y cambios en la fisiología bacteriana

La fisiología microbiana puede variar en respuesta a diferentes estímulos externos (Schaechter *et al.*, 1958). Las células bacterianas son capaces de realizar innumerables ajustes en su metabolismo como consecuencia de cambios en el medio ambiente, y estos ajustes llevan generalmente a la reprogramación de la expresión génica bacteriana. Se han descrito varios mecanismos que las bacterias emplean para ajustar su ciclo celular en respuesta a cambios ambientales y condiciones de estrés. Los mecanismos caracterizados a menudo implican señalización por pequeñas moléculas, interacciones proteína-proteína, o proteólisis regulada. Estos mecanismos en último término permiten a las bacterias acoplar los mecanismos de respuesta al estrés con el ciclo celular y el control del crecimiento (revisado en Jonas, 2014). Las células de *E. coli* son capaces de adaptar rápidamente su crecimiento frente a un cambio en la temperatura sin necesidad de un estado de transición (Lemaux *et al.*, 1978).

El aumento de temperatura en cultivos bacterianos desencadena multitud de procesos, siendo la respuesta de choque térmico el más universal de los mecanismos conocidos de estrés térmico (Arsène *et al.*, 2000). Esta respuesta está controlada por el producto del gen *rpoH*, el factor sigma alternativo σ^{32} , que con su unión a la RNA polimerasa transcribe la mayoría de los genes de choque térmico de forma específica (Dartigalongue *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 1987; Morita *et al.*, 2000; revisado en Valdez-Cruz *et al.*, 2011). Este sistema de expresión se denomina regulón de choque térmico, y las proteínas cuya expresión está sujeta al aumento de temperatura se denominan proteínas de choque térmico (Neidhardt y VanBogelen, 1987).

5.2. Replicaciones de estrés

Aunque el inicio de la replicación es un evento muy controlado, bajo ciertas condiciones de estrés es posible que tengan lugar rondas de replicación adicionales. Se ha descrito que, tras daño en el DNA, carencia de timina, tratamiento con antibióticos, aumento en la concentración de nutrientes o aumento de temperatura, se inducen nuevas rondas de replicación en plásmidos, virus eucariotas, bacterias y eucariotas superiores (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; Kogoma, 1997; Schimke *et al.*, 1986; Srivastava y Chatteraj, 2007).

En condiciones normales es frecuente que las horquillas de replicación no puedan avanzar debido a daños en el DNA o a la presencia de proteínas de replicación defectuosas. Para activar estas horquillas detenidas es necesario que el replisoma y el primosoma se vuelvan a cargar de manera diferente a como lo hacen en el origen de replicación. Además, el progreso de las horquillas requiere que las vías de reparación por recombinación sean funcionales (Kowalczykowski, 2000). Se han propuesto varios modelos para la reactivación por recombinación de horquillas de replicación colapsadas o detenidas (Cox *et al.*, 2000; Kowalczykowski, 2000; Michel *et al.*, 2007). Esta replicación alternativa, dependiente de recombinación e independiente del sitio de inicio canónico *oriC*, en *E. coli* se denomina replicación estable del DNA (SDR, *stable DNA replication*) (Asai *et al.*, 1993; Kogoma, 1997). En SDR, la interacción inicial entre *oriC* y DnaA requerida para la iniciación de la replicación cíclica puede salvarse a través del ensamblaje del replisoma dependiente de recombinación homóloga. En los mutantes *rnhA*, deficientes en actividad RNasa HI, SDR es constitutiva (cSDR) y puede ser iniciada de manera independiente de DnaA desde lugares del cromosoma diferentes a *oriC*, denominados *oriK*. En las células en las que se induce la respuesta SOS por presencia de roturas de DNA de doble cadena tiene lugar la replicación estable inducida (iSDR),

que se inicia a partir de los denominados *oriM*, situados en *oriC* y *terC* (Kogoma, 1997). Este mecanismo constituye, por tanto, un medio perfecto para reiniciar la replicación del DNA *de novo* cuando las horquillas de replicación han sufrido alguna interrupción durante la elongación, en ausencia de un origen definido (Kogoma, 1997).

En *E. coli* se ha descrito la aparición de una replicación de estrés al aumentar la producción de DnaA (Atlung *et al.*, 1987; Skarstad *et al.*, 1989). En esta replicación, la iniciación simultánea en todos los *oriC* presentes se mantiene, y la cantidad de orígenes y DNA por masa aumentan con respecto a las condiciones de ausencia del estrés. Con esta replicación se destaca la importancia que tiene DnaA como reguladora del proceso del inicio de la replicación, pudiendo llegar a ser un factor limitante para la iniciación en condiciones fisiológicas normales. Esta replicación de estrés da lugar a la muerte celular, y se conoce que esta inviabilidad está relacionada por un descenso en la velocidad de la replicación y en la generación de roturas de doble cadena del DNA (DSBs) que detienen el avance de las horquillas de replicación. Recientemente se ha observado que las células podrían tolerar estas iniciaciones extra en ausencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), durante el crecimiento en anaerobiosis o por presencia de agentes antioxidantes, o cuando la vía de reparación de las bases dañadas no es funcional, en ausencia de la glicosilasa Fpg, dado que en estas situaciones se reduce la aparición de DSBs (Charbon *et al.*, 2014).

Otra replicación de estrés observada en *E. coli* es la inducida por rifampicina. En el mutante termosensible en el inicio de la replicación cromosómica *dnaR130* se ha observado la presencia de inicios inducidos por la presencia de rifampicina a baja concentración. Esta replicación de estrés se inicia en *oriC* y es dependiente de la función de *dnaA* y de la síntesis de proteínas a la temperatura restrictiva de 42,5 °C (Morigen *et al.*, 2005; Sakakibara, 1996).

5.2.1. HIR, la replicación inducida por estrés térmico en *E. coli*

Aunque el inicio de la replicación cromosómica está limitado a una sola vez por ciclo celular, en *E. coli* se ha descrito el inicio de nuevas rondas extras de replicación tras un aumento en la temperatura de 10 °C o más. Esta replicación, observada y descrita en *E. coli*, se denomina HIR (*heat induced replication*), y ha sido descubierta y caracterizada en los últimos veinte años (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 1988; Jiménez-Sánchez *et al.*, 1993). HIR se induce por estrés térmico y escapa al control del ciclo celular, lo que supone la alteración del control y los requerimientos de la replicación canónica. El análisis de la replicación inducida por estrés térmico ha determinado que esta replicación presenta analogías y diferencias con el mecanismo de la replicación cíclica como con otras replicaciones de estrés (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero *et al.*, 2008; Kogoma, 1997; Messer y Weigel, 1996; Morigen *et al.*, 2005; Sakakibara, 1996).

Se ha establecido *oriC* como el único lugar cromosómico para el inicio de la replicación HIR, y dentro de *oriC* es esencial la secuencia del trecémero L, rico en pares AT, donde tiene lugar la desestabilización de la doble hélice de DNA inducida por el aumento de temperatura. No afectan a la inducción de HIR alteraciones independientes de las secuencias de unión a proteínas que regulan el inicio de la replicación, como DnaA, IHF y FIS. Sin embargo, HIR requiere estrictamente la actividad de la proteína de iniciación DnaA para facilitar la entrada de la helicasa DnaB. La desestabilización térmica del trecémero L sería el primer paso en la iniciación de HIR y su apertura determinaría la entrada de las proteínas de iniciación de la replicación (González-Soltero *et al.*, 2006b).

Mediante la técnica de *microarray* de RNA se ha determinado que el estrés térmico que induce HIR no provoca cambios globales en el superenrollamiento del DNA, medido por el

cambio de la expresión de 306 genes sensibles a la alteración del superenrollamiento. Por tanto, HIR no puede ser atribuida a una alteración topológica del cromosoma tras estrés térmico. Sin embargo, esta inducción sí depende del estado topológico del cromosoma previo a la situación de estrés térmico. Así, se ha visto que la termoinducción de la replicación es mayor cuando el DNA está relajado y disminuye en células con un alto grado de superenrollamiento negativo en su DNA (González-Soltero, 2007).

Aunque HIR se inicia por un aumento de temperatura, se ha demostrado que no se requiere ninguna función de la respuesta de choque térmico, dado que tanto la delección de *rpoH* como su sobreexpresión bajo el control del promotor *lac* no afectan a HIR. Aunque el inicio de la replicación termoinducida se lleva a cabo exclusivamente en *oriC*, esta iniciación de estrés no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas *de novo*, que sí se necesitan para el inicio de la replicación cíclica (Botello, 1994). Se han determinado otros requerimientos de proteínas que diferencian a HIR de la replicación cíclica. HIR es estrictamente dependiente de la proteína de ensamblaje del primosoma PriA y utiliza la vía PriA-PriB de ensamblaje del primosoma. También requiere la helicasa Rep estrictamente, mientras que no es así en la replicación cíclica. Además, en el replisoma de HIR intervienen tanto la DNA polimerasa III como la DNA polimerasa I. La necesidad de la DNA polimerasa I determina una diferencia fundamental con la composición del replisoma de la replicación cíclica (González-Soltero *et al.*, 2006b). Este replisoma avanza a una velocidad de replicación más lenta que en la replicación cíclica, lo que podría explicarse por el uso de la actividad de síntesis de DNA de la DNA polimerasa I. La dependencia de la helicasa Rep también podría estar relacionada con la menor velocidad de replicación de HIR. Por otro lado, y también a diferencia de la replicación cíclica, HIR requiere la proteína RecA. La proteína RecA, implicada en recombinación homóloga y en la respuesta SOS, tiene un doble papel en la replicación: el de sensor de problemas en la replicación, y el estructural, protegiendo la horquilla de replicación de la degradación. Las funciones de RecA requeridas en la replicación termoinducida parecen estar relacionadas con la estabilización de estructuras de replicación, que serían más inestables que las de la replicación cíclica, y a bajo nivel con la recombinación homóloga, pero no requiere su actividad proteasa, ni de reparación. También se ha descrito una dependencia parcial de la actividad helicasa de RecBCD. A pesar de requerir RecA y, parcialmente, RecBCD, HIR no puede ser considerada una replicación dependiente de recombinación (RDR) porque no se detectan roturas de DNA de cadena doble que pudieran generar una estructura para el inicio de HIR.

Los resultados aquí presentados se recogen en varias publicaciones y han llevado a proponer un modelo para el inicio de HIR (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008).

OBJETIVOS Y APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

La replicación inducida por estrés térmico en *Escherichia coli*, HIR (*heat induced replication*), fue descubierta y caracterizada por el grupo de investigación al que me incorporé para realizar esta Tesis Doctoral (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 1988; Jiménez-Sánchez *et al.*, 1993). Una vez ha sido caracterizada y definida en gran parte la replicación termoinducida en *E. coli*, se planteó ampliar el estudio y la caracterización de la replicación inducida por estrés térmico a otros replicones bacterianos. El objetivo final sería el de establecer la generalidad –o no– de esta replicación de estrés en el mundo bacteriano y determinar los mecanismos por los que tiene lugar en los diferentes replicones.

Para el presente trabajo, en primer lugar se planteó el análisis de la replicación en condiciones de estrés térmico en especies diferentes a *E. coli*: *Salmonella typhimurium*, que pertenece a la misma familia que *E. coli* e igualmente es una especie representativa del grupo de las Gram negativa; *Bacillus subtilis*, como organismo modelo de especies Gram positiva y cuyo hábitat natural es el medio ambiente y no el intestino de animales de sangre caliente; y *Vibrio cholerae* que a diferencia de la mayoría de las bacterias presenta más de un cromosoma, como generalmente se encuentra en las células eucarióticas.

Otra extensión del análisis de HIR planteada fue la ampliación del estudio de la replicación a plásmidos con diferente control de la replicación. La replicación plasmídica está acoplada al ciclo celular de la célula que lo alberga, ajustando la frecuencia de iniciación de la replicación a una replicación por cada copia de plásmido y por ciclo celular. Se mantiene así una concentración fija de plásmido en la población celular. Resultados previos del grupo, llevados a cabo en diferentes plásmidos de *E. coli*, indicaban que HIR puede ser una respuesta al estrés térmico probablemente de carácter general en el mundo bacteriano (González-Soltero, 2007). Con este trabajo se planteó completar el estudio preliminar de la replicación de minicromosomas (*oriC*) y de plásmidos con diferentes tipos de control de la replicación: derivados de F, P1 y pSC101, controlados mediante iterones; y derivados de R1, p15A y pBR322, con control de la replicación por RNA antisentido.

Según lo expuesto anteriormente, los objetivos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la replicación en condiciones de estrés térmico en las especies *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*.
2. Caracterizar la replicación termoinducida en *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*, en caso de detectarla, y profundizar en el estudio de HIR en el cromosoma de *E. coli* para ampliar su caracterización.
3. Estudiar la replicación termoinducida en minicromosomas y plásmidos de *E. coli*, para determinar si HIR es un mecanismo general de estrés entre diferentes tipos de replicones o está restringido al cromosoma, analizando los replicones preliminarmente estudiados y que expresan la proteína GFP $mut2$ (González-Soltero, 2007; Lobner-Olesen, 1999).
4. Analizar la replicación de minicromosomas y plásmidos de *E. coli* a través de la determinación del número de copias de minicromosoma o plásmido mediante diferentes técnicas y establecer un protocolo óptimo para este análisis.

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

- El estudio de la replicación termoinducida en las diferentes bacterias se abordó mediante la medida de la síntesis relativa de DNA (acumulación de DNA) tras estrés térmico. Cultivos de las diferentes especies estudiadas se sometieron a un cambio en la temperatura de crecimiento de 30 °C a 41 °C, a la vez que se inhibieron los nuevos inicios de la replicación cíclica por adición de rifampicina o cloranfenicol. La comparación de la síntesis de DNA en presencia del inhibidor registrada tras el cambio de temperatura con respecto al cultivo tratado y mantenido a 30 °C permite la determinación del porcentaje de orígenes cromosómicos en los que el estrés térmico induce la replicación HIR (*i* %). Este parámetro se utilizó para detectar y definir el nivel de inducción de HIR.

Adicionalmente, la replicación inducida por estrés térmico se estudió mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Por citometría de flujo se obtuvieron histogramas de poblaciones bacterianas que presentaban la distribución de la cantidad de DNA o cromosomas por célula, determinada por la medida de la fluorescencia (FL) tras la tinción de las muestras con un fluorocromo (mitramicina más bromuro de etidio, PicoGreen o SybrGreen), y la distribución del tamaño celular, por la medida de la dispersión de la luz (LS). Se analizaron muestras en crecimiento exponencial o tratadas con antibióticos inhibidores del inicio de la replicación (rifampicina o cloranfenicol) y de la división celular (cefalexina). La microscopía de contraste de fases y fluorescencia complementó el estudio, aportando información sobre el tamaño y la forma de las células de cada especie y el número medio de nucleoides (teñidos con DAPI) por célula en cada una de las condiciones de crecimiento.

- El estudio de la replicación de minicromosomas y plásmidos se basó en la cuantificación de la fluorescencia emitida por la proteína GFP $mut2$ codificada en todos los replicones analizados. Se determinó el número de copias de minicromosoma o plásmido en diferentes condiciones de crecimiento mediante la cuantificación de la fluorescencia de GFP $mut2$ por espectrofluorimetría y citometría de flujo. Adicionalmente se cuantificó directamente la dosis génica de la secuencia del gen GFP $mut2$ mediante su amplificación por qPCR.

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas usadas en este trabajo se relacionan a continuación en las Tablas 1 y 2.

La estirpe MC1000 fue proporcionada por el Coli Genetic Stock Center de la Universidad de Yale (Connecticut, EE. UU.). Las estirpes de *V. cholerae* y las de *E. coli* ALO1454, ALO1455, ALO1456, ALO1458, ALO1459, ALO1460, ALO1465 y ALO1469 fueron enviadas por el Dr. A. Løbner-Olesen, Universidad de Roskilde (Roskilde, Dinamarca). Las cepas de *S. typhimurium* fueron proporcionadas por el Dr. J. Casadesús, Universidad de Sevilla (Sevilla, España). Las estirpes de *B. subtilis* fueron enviadas por el Dr. J. C. Alonso, Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España). La estirpe AB1157, de *E. coli*, fue suministrada por el Dr. G. C. Walker, Instituto de Tecnología de Massachusetts (Massachusetts, EE. UU.). Las cepas IC400, IC2320 e IC2319 fueron enviadas por la Dra. M. E. Armengod, Instituto de Investigaciones Citológicas (Valencia, España). La estirpe MG1655 fue proporcionada por la Dra. J. W. Zyskind, Universidad Estatal de San Diego (California, EE. UU.). La estirpe CM735 se recibió de la Dra. K. Skarstad, Universidad de Oslo (Oslo, Noruega).

2. PRODUCTOS QUÍMICOS

Salvo las excepciones indicadas, todos los productos químicos empleados en este trabajo fueron suministrados por Sigma Chemical, las sales y los azúcares por Panreac y los productos radiactivos se obtuvieron de MP Biomedicals.

Tabla 1. Estirpes utilizadas para el análisis de HIR (apartado 1 de Resultados).

Nombre de la estirpe	Especie y estirpe	Genotipo	Referencia
ALO2495	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor est. N16961	CTX ⁻ attB ⁻	Pearson <i>et al.</i> , 1993
ALO2399	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor est. N16961	CTX ⁻ attB ⁻ recA ⁻	Pearson <i>et al.</i> , 1993
LT2	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium est. LT2	silvestre	Garzón <i>et al.</i> , 1995
SV1235	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium est. LT2	recA1	Garzón <i>et al.</i> , 1995
BG214	<i>Bacillus subtilis</i> est. 168	amyE attSBP metB5 sigB37 trpC2 xin-1	Yasbin <i>et al.</i> , 1980
BG190	<i>Bacillus subtilis</i> est. 168	amyE attSBP metB5 sigB37 trpC2 xin-1 recA6	Yasbin <i>et al.</i> , 1980
AB1157	<i>Escherichia coli</i> est. K-12	thr-1 leuB6 Δ(gpt-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 rfbD1 mgl-51 kdgK51 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44	Donnelly y Walker, 1989
IC400	<i>Escherichia coli</i> est. K-12	thr-1 leuB6 Δ(gpt-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galk2 ara-14 xyl-5 rfbD1 mgl-51 kdgK51 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44 recA430	Armengod, 1982
MG1655	<i>Escherichia coli</i> est. K-12	silvestre	Jensen, 1993
CM735	<i>Escherichia coli</i> est. K-12	metE46 trp-3 his-4 thi-1 galk2 lacY1 mtl-1 ara-9 tsx-3 ton-1 rps-8 supE44	Skarstad <i>et al.</i> , 1989

Tabla 2. Estirpes de *Escherichia coli* K-12 utilizadas para el análisis del número de copias de plásmidos (apartado 2 de Resultados)

Estirpe	Genotipo	Referencia/origen
MC1000	<i>araD139 Δ(ara-leu)7697 Δ(codB-lacI)3 galK16 galE15(Gal^S) relA1 rpsL150 (Str^R) spoT1 mcrB1</i>	Casadaban y Cohen, 1980
IC2320	<i>araD139 Δ(ara-leu)7679 galUK ΔlacX74 rpsL150 (Str^R) thi Tet^R</i>	IIC *
IC2319	IC2320 <i>recA13</i>	IIC *
ALO1454	MC1000/pALO261 [pALO261 (R1): <i>oriR1 Amp^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1455	MC1000/pALO264 [pALO264 (minicromosoma): <i>oriC Kam^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1456	MC1000/pALO267 [pALO267 (minicromosoma): <i>oriC sopABC Kam^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1458	MC1000/pALO269 [pALO269 (pBR322): <i>ori Amp^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1459	MC1000/pALO270 [pALO270 (P1): <i>oriR ΔincA Cam^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1460	MC1000/pALO275 [pALO275 (p15A): <i>ori Amp^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1465	MC1000/pALO280 [pALO280 (F): <i>oriS oriV sopABC Kam^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
ALO1469	MC1000/pALO284 [pALO284 (pSC101): <i>ori Kam^R araC pBAD-GFPmut2</i>]	Løbner-Olesen, 1999
BMC01	IC2319/pALO261 (R1)	Este trabajo
BMC03	IC2320/pALO267 (<i>oriC SopABC</i>)	Este trabajo
BMC05	IC2319/pALO269 (pBR322)	Este trabajo
BMC07	IC2319/pALO270 (P1)	Este trabajo
BMC09	IC2319/pALO275 (p15A)	Este trabajo
BMC11	IC2319/pALO280 (F)	Este trabajo
BMC13	IC2319/pALO284 (pSC101)	Este trabajo
BMC15	IC2320/pALO261 (R1)	Este trabajo
BMC17	IC2319/pALO267 (<i>oriC SopABC</i>)	Este trabajo
BMC19	IC2320/pALO269 (pBR322)	Este trabajo
BMC21	IC2320/pALO270 (P1)	Este trabajo
BMC23	IC2320/pALO275 (p15A)	Este trabajo
BMC25	IC2320/pALO280 (F)	Este trabajo
BMC27	IC2320/pALO284 (pSC101)	Este trabajo

* IIC: Instituto de Investigaciones Citológicas (Valencia, España).

2.1. Antibióticos

Ampicilina (Amp). Preparada a 100 mg/ml en agua y conservada a -20 °C. Utilizada a 50 µg/ml.

Cefalexina (Cpx). Preparada a 5 mg/ml en agua en el momento del uso y conservada a 0 °C. Utilizada a 50 µg/ml.

Cloranfenicol (Cam). Preparado a 30 mg/ml en etanol y conservado a -20 °C. Utilizado a 10 µg/ml para seleccionar estirpes resistentes y a 200 ó 250 µg/ml para inhibir síntesis de proteínas.

Kanamicina (Kam). Preparada a 50 mg/ml en agua y conservada a -20 °C. Utilizada a 25 µg/ml.

Rifampicina (Rif). Preparada a 50 mg/ml en metanol y conservada en hielo. Utilizada recién preparada a diferentes concentraciones para inhibir el inicio de la replicación cromosómica: 50, 100, 150 ó 300 µg/ml.

2.2. Productos radiactivos

Timidina-(metil-³H) (³H-TdR). Suministrada con una actividad específica de 20 Ci/mmol y a una concentración de 1 mCi/ml en una solución etanol:agua (7:3). Utilizada a una actividad de 1 μ Ci/ml.

3. SOLUCIONES Y TAMPONES

3.1. Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico

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

Solución EDTA-tritón-lisozima. Tris HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 100 mM (pH 8,0), Tritón 0,1 % (p/v) y lisozima 2 mg/ml (adicionada justo antes de usar) en agua destilada.

Solución PEG-NaCl. Polietilenglicol 8000 al 20 % y NaCl 1M en tampón TE.

Solución de resuspensión. Tris HCl 25 mM (pH 8,0), sacarosa al 10 % (p/v) y EDTA 25 mM en agua destilada.

Solución de lisis alcalina. NaOH 0,3 N y SDS al 2 % (p/v) en agua destilada.

Solución de acetato potásico. Acetato potásico 3 mM y ácido glacial acético 11,5 % (v/v) en agua destilada.

Tampón STE. Tris HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0) y NaCl 100 mM en agua destilada estéril.

Tampón TE. Tris HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (pH 8,0) en agua destilada (Sambrook *et al.*, 1989).

Mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Preparado mezclando fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en la proporción 25:24:1 y 50 mg/100 ml de 8-hidroxiquinoleína. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,8-8,0 añadiendo Tris HCl 100 mM (pH 8,0) hasta alcanzar, tras agitar y permitir la separación de las fases acuosa y orgánica, el pH deseado en la fase acuosa. La mezcla se conserva en oscuridad a 4 °C (Sambrook *et al.*, 1989).

Lana de vidrio silanizada. En un vaso de precipitados se depositó la lana de vidrio y se cubrió con suficiente volumen de diclorometilsilano para que se impregnara bien, se retiró el producto excedente y la lana silanizada se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se esterilizó por calor seco durante 150 minutos a 180 °C.

3.2. Medida de la síntesis de DNA *in vivo*

Mezcla de centelleo. Preparada disolviendo 4 g de PPO y 100 mg de POPOP, en el orden indicado, en un volumen final de tolueno de 1000 ml en oscuridad y a 4 °C. La mezcla se conserva en oscuridad a 4 °C.

3.3. Manipulación *in vivo* de bacterias

Tampón M9 (TM9). Preparado mezclando 100 ml de solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,01M, 10 ml de MgSO₄ 0,1M 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 HNa_2PO_4 , 30 g de H_2KPO_4 , 5 g de NaCl y 10 g de NH_4Cl , en el orden indicado y en un volumen final de agua destilada de 1000 ml (Miller, 1992). El pH de la solución se ajustó a 7,2 y posteriormente se esterilizó repartida en volúmenes de 200 ml.

Solución Tris-Ca. CaCl_2 100 mM y Tris 1 M (pH 8,0).

Tampón NaCl. NaCl 0,9 % en agua destilada. Filtrado antes de utilizar a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

3.4. Electroforesis de DNA

Tampón TAE (50x). Preparado añadiendo 242 g de Tris Base a 57,1 ml de ácido acético y 100 ml de EDTA 0,5 M. El volumen final se completa con agua destilada hasta 1000 ml y se ajusta el pH a 8,0 (Sambrook *et al.*, 1989). Utilizado a concentración 1x.

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

Solución BBF (6x). Azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y sacarosa 40 % (p/v) en agua destilada. Se conserva a 4 °C. Utilizada a concentración 1x.

Solución de bromuro de etidio. Preparada a 5 mg/ml en TES y almacenada en oscuridad a 4 °C. Utilizada a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Gel de agarosa. Agarosa al 0,8 % (p/v) en tampón TAE 1x. La mezcla se calentó ligeramente hasta la completa disolución de la agarosa. Antes de verter en el molde del gel, se añadió bromuro de etidio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.5. Citometría de flujo

Solución de fijación de células de *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis*. Etanol a concentración final del 70 % (v/v).

Solución de fijación de células de *V. cholerae*. Paraformaldehído 1 % (p/v) y glutaraldehído 0,05 % (v/v).

Tampón de tinción TrisMg. TrisHCl 10 mM (pH 7,4) y MgCl_2 10 mM. Filtrado a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

Solución de bromuro de etidio. Preparada a 400 mg/ml en tampón de tinción TrisMg. Utilizada a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Solución de mitramicina. Preparada a 1 mg/ml en tampón de tinción TrisMg. Utilizada a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Solución de tinción mitramicina-bromuro de etidio. Mitramicina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y bromuro de etidio a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón TrisMg. Preparada justo antes de utilizarla.

Solución de tinción PicoGreen. Preparada diluyendo PicoGreen (Invitrogen) en dimetil sulfóxido en la proporción 1:100.

Solución de tinción SybrGreen. Preparada diluyendo SybrGreen (Invitrogen) en agua destilada estéril en la proporción 1:100.

3.6. Microscopía

Solución de fijación. De igual manera que en citometría de flujo, las células de *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis* se fijaron en etanol a una concentración final del 70 % (v/v). Las de *V. cholerae* se fijaron en paraformaldehído al 1 % (p/v) y glutaraldehído al 0,05 % (v/v).

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Preparado a 50 µg/ml en agua destilada y estéril y conservado a -20 °C. Utilizado a 0,5 µg/ml.

Preparación del portaobjetos. Se utilizó una solución caliente de agar al 1 % (p/v) en NaCl 0,9 % (p/v), previamente filtrada a través de poros de 0,8 µm de diámetro. Justo antes de usarla se mezcló con DAPI a una concentración final de 0,5 µg/ml. La mezcla caliente se extendió sobre el portaobjetos y se colocó un cubreobjetos sobre el agar, para obtener una superficie plana donde depositar la muestra. Tras solidificar la mezcla se retiró el cubreobjetos y se permitió que el agar se secase de 2 a 5 minutos a 37 °C.

4. MEDIOS DE CRECIMIENTO

Medio mínimo M9. Preparado añadiendo 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl₂ 0,01 M, 10 ml de MgSO₄ 0,1 M, 10 ml de una solución de los aminoácidos requeridos por la estirpe a 2 mg/ml, 10 ml de una solución de tiamina a 0,2 mg/ml a 860 ml de agua destilada que contienen 4 g de glucosa, glicerol o succinato. Todas las soluciones se esterilizan previamente por separado. En algunos casos, este medio se enriquece con una solución de caseína hidrolizada (casaminoácidos) hasta una concentración final del 0,1 % (p/v). Para el crecimiento de las estirpes utilizadas para el análisis del número de copias de plásmido, mediante la medida de la expresión de la construcción pBAD-GFP_{mut2} (Tabla 2), el medio fue además suplementado con arabinosa a una concentración final del 0,2 %.

Medio mínimo AB. Preparado añadiendo 200 ml de la solución A en 800 ml de la solución B. El medio se complementa añadiendo glucosa a una concentración final del 0,2 % (p/v), el aminoácido serina a 100 µg/ml, casaminoácidos al 0,5 % (p/v) y tiamina a 0,2 mg/ml.

La solución A se prepara disolviendo 2 g de (NH₄)₂SO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 3 g de NaCl y 0,011 g de Na₂SO₄ en 200 ml de agua destilada. Posteriormente se esteriliza en el autoclave.

La solución B se prepara añadiendo 1 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M, 1 ml de MgCl₂ 1 M y 1 ml de FeCl₃ 0,003 M a 797 ml de agua destilada estéril. Las soluciones se autoclavan previamente por separado.

Medio rico Luria-Bertani (LB). Preparado disolviendo 10 g de bactotripton (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid) y 10 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada. El pH se ajusta entre 7,2 y 7,4 y se esteriliza en el autoclave.

Medio sólido rico Nutrient-Broth con timidina (NAT). Se disuelven 8 g de caldo nutritivo Nutrient-Broth y 20 g de agar en 1000 ml de agua destilada. Se esteriliza en el autoclave y posteriormente se complementa con 5 µg/ml de timidina estéril.

5. ENZIMAS

DNA polimerasa Taq. Suministrada por Promega a una concentración de 5 U/ml, junto con una solución de MgCl₂ 25 mM y su tampón de dilución concentrado 10 veces.

Lisozima. Se utiliza en soluciones recién preparadas a 2 mg/ml, que se mantienen a 0 °C hasta su uso.

RNasa II-A pancreática. Preparada a 2 mg/ml en Tris HCl 10 mM (pH 7,5). Se incubó 10 minutos a 90 °C para eliminar las posibles DNasas. Conservada a -20 °C.

6. MARCADORES DE DNA, OLIGONUCLEÓTIDOS Y SECUENCIAS

6.1. Marcadores para electroforesis

Marcador λ HindIII. Suministrado por Stratagene (N° catálogo 201109) a una concentración de 500 μ g/ml. Presenta ocho fragmentos de DNA con un rango de tamaños entre los 125 pb y los 23,13 kb. Utilizado a una concentración final de 50 ng/ μ l.

Marcador GeneRuler 1kb DNA ladder. Suministrado por Fermentas (N° catálogo SM0313) a una concentración de 100 μ g/ml. Presenta fragmentos de DNA con un rango de tamaños entre 250 pb y 10 kb. Utilizado a una concentración final de 100 ng/ μ l.

6.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se detallan en la Tabla 3. Fueron diseñados con la aplicación Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), teniendo en cuenta las recomendaciones sobre temperatura de fusión (T_m) y tamaño del producto establecidas por Thornton y Basu (Thornton y Basu, 2011). La casa SIGMA Genosys los suministró en estado liofilizado y una vez disueltos a una concentración de 100 μ M se conservaron a -20 °C. Se emplearon a una concentración final de 12,5 pM.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de qPCR.

Nombre	Secuencia	Secuencia amplificada	Tamaño del producto
gfp1	5'-TGGTTTGTCTGCCATGATGT-3'	GFPmut2	282 pb
gfp2	5'-TTCGCGTATGGTCTTCAATG-3'		
oriC1	5'-GCACTGCCCTGTGGATAACAA-3'	oriC, origen de replicación del cromosoma de <i>E. coli</i>	66 pb
oriC2	5'-ACAGTTAATGATCCTTTCCAGGTTG-3'		
xasA1	5'-TGGGTGTTCTGGCGGAA-3'	Término de replicación del cromosoma de <i>E. coli</i>	50 pb
xasA2	5'-TCCCGCGAGAAGGACCA-3'		
oriSt-1	5'-AATGCGTTGAAAGGATCAC-3'	Origen de replicación cromosómica de <i>S. typhimurium</i>	62 pb
oriSt-2	5'-TCCAGCTTATACGGACCAC-3'		
terSt-1	5'-TCGAGGTAACGCAACATCTG-3'	Término de replicación del cromosoma de <i>S. typhimurium</i>	103 pb
terSt-2	5'-GCTTTACTGCTGCGGTTTTC-3'		
oriBs-1	5'-CAATCGGGGAAAGTGTGAAT-3'	Origen de replicación del cromosoma de <i>B. subtilis</i>	113 pb
oriBs-2	5'-GTAGGCCTGTGGATTGTG-3'		
terBs-1	5'-ATACCGTCTTTGCATGAGC-3'	Término de replicación del cromosoma de <i>B. subtilis</i>	79 pb
terBs-2	5'-CTGGAGCTTAGCCCTTCTT-3'		
oriVcl-1	5'-AGGAGCAGGATCTTTGTGGA-3'	Origen de replicación del cromosoma I de <i>V. cholerae</i>	146 pb
oriVcl-2	5'-TTAGATCCCAAGGTGGCTGT-3'		
terVcl-1	5'-CCTTTTGCTTGGCGTAAAAA-3'	Término de replicación del cromosoma I de <i>V. cholerae</i>	104 pb
terVcl-2	5'-TTAACAGCACCAAGCGACTG-3'		
oriVcII-1	5'-CGGATCGATGATCAAGAGGT-3'	Origen de replicación del cromosoma II de <i>V. cholerae</i>	73 pb
oriVcII-2	5'-GCCTGACATCGACCGTAAAT-3'		
terVcII-1	5'-GCCAAATGGTGTACATGCTG-3'	Término de replicación del cromosoma II de <i>V. cholerae</i>	59 pb
terVcII-2	5'-AATGCCGATATCCACTTTGC-3'		

6.3. Secuencias

Las secuencias utilizadas en este trabajo para el análisis de los orígenes de replicación mediante las curvas Z y la localización de sitios SIDD, así como para el diseño de oligonucleótidos para qPCR, se listan en la Tabla 4.

7. KITS

SsoAdvanced SYBR Green Supermix. Suministrado por Bio-Rad (N° catálogo 172-5260). Contiene un tampón que incluye todos los componentes necesarios para reacciones de qPCR, excepto los cebadores y el DNA molde. Conservado a -20 °C y en oscuridad. Utilizado para la determinación del número de copias de plásmidos por PCR cuantitativa.

DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit. Suministrado por Thermo Scientific (N° catálogo F-416). Contiene un tampón que incluye todos los componentes necesarios para reacciones de qPCR, excepto los cebadores y el DNA molde. Conservado a -20 °C y preservado de la luz. Utilizado para determinación del número de copias de plásmidos y de secuencias de DNA por PCR cuantitativa.

Tabla 4. Secuencias consultadas en este trabajo y datos para su acceso.

Secuencia (especie)	Número de acceso	Base de datos (nucleótidos analizados)	Uso en este trabajo
Cromosoma completo (<i>E. coli</i> est. K12)	NC_000913	NCBI (1..4639675)	Curva Z
Cromosoma completo (<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium)	NC_003197	NCBI (1..4857432)	Curva Z
Cromosoma completo (<i>B. subtilis</i> est. 168)	NC_000964	NCBI (1..4214630)	Curva Z
Cromosoma I completo (<i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor est. N16961)	NC_002505	NCBI (1..2961149)	Curva Z
Cromosoma II completo (<i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor est. N16961)	NC_002506	NCBI (1..1072315)	Curva Z
<i>oriC</i> ¹ (<i>E. coli</i> K12)	ORI10020001	DoriC (3923716..3923983)	qPCR, SIDD
<i>xas</i> ² (<i>E. coli</i> K12)	NC_000913.2	NCBI (1566978..1568513)	qPCR
<i>oriC</i> ¹ (<i>S. typhimurium</i>)	ORI10020009	DoriC (4083931..4084217)	qPCR, SIDD
<i>tus</i> ³ (<i>S. typhimurium</i>)	AE006468.1	NCBI (1545400..1546329)	qPCR
<i>oriC</i> ¹ (<i>B. subtilis</i>)	ORI10010005	DoriC (1751..1938)	qPCR, SIDD
<i>rtp</i> ³ (<i>B. subtilis</i>)	NC_000964.3	NCBI (2017095..2017463)	qPCR
<i>oriC</i> ¹ (<i>V. cholerae</i> , cromosoma I)	ORI10020003	DoriC (2961047..234)	qPCR, SIDD
VC1389 ⁴ (<i>V. cholerae</i> , cromosoma I)	NC_002505.1	NCBI (1480408..1480587)	qPCR
<i>oriC</i> ¹ (<i>V. cholerae</i> , cromosoma II)	ORI10030009	DoriC (247..1133)	qPCR, SIDD
VC_A0599 ⁴ (<i>V. cholerae</i> , cromosoma II)	NC_002506.1	NCBI (535461..536366)	qPCR
<i>oriS</i> ¹ (F)	NC_002483.1	NCBI (48136..48352)	SIDD
<i>oriV</i> ¹ (F)	NC_002483.1	NCBI (45934..46135)	SIDD
<i>oriR</i> ¹ (P1)	NC_005856.1	NCBI (62688..62929)	SIDD
<i>ori</i> ¹ (pSC101)	K00042.1	NCBI (1..670)	SIDD
<i>oriR1</i> ¹ (R1)	AF129504	NCBI (2625..3416)	SIDD
<i>ori</i> ¹ (ColE1)	V00270.1	NCBI (1..602)	SIDD
<i>ori</i> ¹ (ColE1; p15A)	V00309	NCBI (764..1026)	SIDD
<i>ori</i> ¹ (ColE1; pBR322)	J01749.1	NCBI (2534..3122)	SIDD

¹ *ori*, *oriC*, *oriS*, *oriV*, *oriR*, *oriR1*: origen de replicación de los cromosomas y plásmidos indicados.

² *xas*: gen próximo al término de la replicación en el cromosoma de *E. coli*.

³ *tus*, *rtp*: genes codificadores de la proteína de terminación de la replicación en *S. typhimurium* y *B. subtilis*, respectivamente.

⁴ VC1389, VC_A0599: genes para una proteína hipotética situada en la región diametralmente opuesta al origen de replicación en los cromosomas I y II, respectivamente, de *V. cholerae*.

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO DE ESTIRPES

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

El **crecimiento en masa** de un cultivo líquido se determinó por aumento de la absorción en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 20 (Thermo Scientific). Para los cultivos de bacterias utilizados en el apartado 1 de Resultados, la absorción se determinó a 450 nm de longitud de onda cuando el cultivo era crecido en medio mínimo, con o sin casaminoácidos, y a 600 nm cuando crecía en medio rico. Para los cultivos utilizados en el apartado 2 de Resultados, la absorción se determinó a 488 nm, debido a que la cuantificación de la proteína GFP en estas estirpes mediante espectrofluorimetría requiere el uso de esta longitud de onda. Para realizar la medida de absorbancia se utilizaron tubos estériles de 1 cm de paso de luz previamente precalentados a la temperatura de crecimiento del cultivo. El volumen utilizado para realizar la medida se devolvió al cultivo de donde se tomó.

El **tiempo de generación**, τ , se obtuvo mediante la representación en gráfica semilogarítmica de los valores de absorción del cultivo bacteriano a lo largo del tiempo de crecimiento y determinando, a partir de esta representación, el tiempo en que la masa se duplica. La **tasa o velocidad de crecimiento**, μ , se obtuvo considerando el tiempo de generación y expresándolo como duplicaciones / hora.

El **crecimiento en medio sólido** se requirió para la selección, comprobación o conservación de las estirpes en uso. La siembra de las estirpes se consiguió mediante extensión, por agotamiento o haciendo uso de un palillo sobre el medio sólido adecuado para cada objetivo, selectivo o no, en placas Petri y se incubaron en posición invertida en estufas que aseguraban la temperatura deseada.

2. CAMBIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

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

El **cambio de la temperatura de incubación** de un cultivo creciendo exponencialmente se realizó cuando éste alcanzó una absorbancia entre 0,06 y 0,08.

La rifampicina es un antibiótico que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana, inhibiendo su actividad y deteniendo así la transcripción. El cloranfenicol se une a la peptidil transferasa, el rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas. Ambos antibióticos han sido ampliamente utilizados en estudios sobre la replicación bacteriana como inhibidores de la iniciación, al ser esta etapa dependiente de la transcripción y la síntesis de proteínas (Bremer y Churchward, 1977; Lark, 1972; Messer, 1972). El **tratamiento con rifampicina o cloranfenicol** se realizó añadiendo el antibiótico al cultivo creciendo exponencialmente cuando éste alcanzó una absorbancia entre 0,06 y 0,08. Los

antibióticos se utilizaron para la inhibición de posteriores inicios de replicación, a una concentración final entre 50 y 300 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de la rifampicina y entre 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del cloranfenicol. Cuando se realizó el tratamiento simultáneo de cambio de la temperatura de incubación y adición del antibiótico, se procedió en primer lugar al cambio de temperatura e inmediatamente después a la adición del inhibidor de los inicios. El momento de la adición del antibiótico se consideró el tiempo cero de este tratamiento.

3. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

La conservación de las estirpes durante largos periodos de tiempo se llevó a cabo por congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 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 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en placas Petri con el medio sólido adecuado. Las estirpes que iban a ser utilizadas durante cada etapa del trabajo se obtuvieron por extensión de 10 a 20 μl del volumen conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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. Las colonias bacterianas con las que se trabajó se obtuvieron mediante siembra por agotamiento de una colonia comprobada y correcta. Trascorridas aproximadamente dos semanas, las estirpes comprobadas y conservadas en placa se trasapaban a placas con medio fresco para continuar trabajando con ellas.

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

4.1. Marcaje de DNA *in vivo*

El progreso de la síntesis de DNA se determinó mediante la cuantificación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) incorporada en el DNA a diferentes tiempos. La timidina trifosfato (TTP) es un nucleótido específico de la síntesis de DNA. Las células sintetizan este nucleótido a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP), que es transformado en timidina monofosfato (TMP) por la enzima timidilato sintetasa, producto del gen *thyA*. Este monofosfato es fosforilado hasta trifosfato (TTP) para ser utilizado en la síntesis del DNA y su exceso es degradado por la timidilato quinasa (*tdk*) a timidina (TdR) y por la timidina fosforilasa (*ttp*) el nucleósido pasa a timina (T). La adición de la base o del nucleósido a una estirpe silvestre hace que la mayor parte sea degradada (O'Donovan, 1978), aunque también una bacteria *Thy*⁺ puede usar la ruta degradativa para sintetizar TMP a partir de timina o timidina exógenas sin los problemas de una posible limitación del nucleótido que presentan las bacterias *Thy*⁻. En este trabajo, para conseguir el marcaje del DNA se añadió al medio de crecimiento uridina en concentraciones altas, 1,5 mM, que inhibe la timidina fosforilasa (*ttp*), y 1 $\mu\text{g/ml}$ de TdR, por lo que la concentración de TdR en la célula fuerza su incorporación en el DNA a partir del nucleósido exógeno (Budman y Pardee, 1967; Beachman *et al.*, 1968; Pritchard, 1974).

Para llevar a cabo el marcaje del DNA de un cultivo creciendo en medio líquido, se diluyó el cultivo nocturno en el mismo medio conteniendo uridina 1,5 mM, 1 $\mu\text{g/ml}$ 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.

4.2. Medida de la síntesis de DNA

Para cuantificar la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ en el DNA se tomaron alícuotas de 200 μl y se depositaron en tubos que contenían 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % a 0 °C. Transcurridos no menos de 30 minutos, para permitir la precipitación del material insoluble en el ácido, el volumen de cada tubo se filtró a través de un filtro Wathman GF/C de fibra de vidrio de 24 mm de diámetro, previamente humedecido en agua destilada. Se lavaron los tubos con TCA al 5 % y se filtró este volumen a través del mismo filtro, y finalmente los filtros se lavaron 2 veces con agua destilada. Los filtros se secaron a 60 °C y posteriormente se colocaron en viales a los que se añadió 3 ml de la mezcla de centelleo (apartado 3.2 de Materiales). La medida de la cantidad de $^3\text{H-TdR}$ incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

4.2.1. 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 y se utilizó para calcular la relación DNA/masa (dpm/absorbancia x 1000).

4.2.2. Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los inicios de replicación

La inhibición del inicio de nuevos ciclos de replicación se llevó a cabo por adición de rifampicina o cloranfenicol. En el momento del comienzo del tratamiento se tomaron varias muestras de 200 μl del cultivo que se precipitaron en ácido tricloroacético (TCA). Se continuó con la toma de alícuotas y su precipitación a diferentes tiempos hasta al menos un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe estudiada.

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

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

Según la ecuación anterior, y conocido el ΔG experimentalmente, se determinó n utilizando la aplicación REPLICON v10.3 (Jiménez-Sánchez y Guzmán, 1988). El número medio de orígenes por cromosoma en el cultivo exponencial será igual a 2^n .

4.2.3. Medida de la síntesis de DNA tras inducción de inicios de replicación por estrés térmico: análisis de HIR

Para cuantificar la inducción térmica del inicio de la replicación en un cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C, cuando el cultivo alcanzó una absorbancia entre 0,06 y 0,08, medida a 450 nm si el crecimiento es en medio mínimo o a 600 nm si el medio es rico, se transfirió una alícuota a 41 °C. Inmediatamente después al cambio de temperatura se añadió rifampicina o cloranfenicol y se tomaron varias muestras de 200 μl que se precipitaron en TCA. A continuación se procedió de igual forma con la parte del cultivo que permaneció a 30 °C. Se continuó con la toma de muestras y su precipitación hasta al menos un tiempo igual al doble del tiempo de generación de la estirpe.

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

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

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

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

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

5. AISLAMIENTO DE DNA

5.1. DNA cromosómico

Para el aislamiento del DNA cromosómico bacteriano se partió de un cultivo nocturno obtenido por la inoculación de 10 ml de LB con una colonia aislada de la estirpe de interés. El cultivo se centrifugó a 15465 g durante 10 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1,6 ml de tampón STE (apartado 3.1 de Materiales). Del lisado celular obtenido se eliminaron las proteínas mediante la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (apartado 3.1 de Materiales; apartado 6.1 de Métodos) y se procedió a la precipitación del DNA cromosómico por adición de un décimo del volumen de acetato potásico 3 M (pH 5,2) y un volumen de isopropanol o bien dos volúmenes de etanol, mezclando bien después de cada adición. Se mantuvieron las muestras a -80 °C durante un mínimo de 30 minutos, y posteriormente se recuperó el DNA precipitado centrifugando a 10300 g durante 10 minutos a 4 °C y eliminando el sobrenadante en su totalidad. El precipitado se resuspendió en 40 μ l de tampón TE, y la solución resultante se trató con RNasa II-A a 50 μ g/ml durante 30 minutos a 37 °C. El DNA aislado se conservó a 4 °C.

5.2. DNA plasmídico

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

La elección de los métodos de aislamiento de DNA plasmídico utilizados durante la realización de este trabajo ha dependido del número de copias del plásmido en la célula así como de la cantidad de DNA que se necesitaba. El método de lisis alcalina se utilizó para aislar DNA de plásmidos de alto número de copias a partir de un volumen mediano de cultivo (Birnboim, 1983). Cuando el aislamiento requirió conseguir una mayor cantidad de DNA se

extrajo a partir de mayores volúmenes de cultivo y la separación del DNA plasmídico se llevó a cabo por el procedimiento de precipitación con polietilenglicol (Sambrook *et al.*, 1989). Las soluciones utilizadas en ambos protocolos se describen en el apartado 3.1 de Materiales.

5.2.1. Aislamiento por lisis alcalina

Se inocularon 50 ml de medio rico LB con el antibiótico apropiado con una colonia de la estirpe portadora del plásmido y se incubó el cultivo durante una noche a la temperatura de crecimiento de la bacteria, 30 °C ó 37 °C, con agitación vigorosa, hasta alcanzar la fase estacionaria. Se centrifugó el cultivo a 10740 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 8 ml de solución de resuspensión. Seguidamente se añadieron 5 ml de la solución de lisis alcalina y se mezcló por inversión para evitar la rotura mecánica del DNA. Se incubó la mezcla en un baño con agua a 65 °C durante 20 minutos. Después de este tiempo, a la mezcla se le añadieron 6 ml de la solución de acetato potásico y se mantuvo a 0 °C durante 30 minutos. Se centrifuga la mezcla a 10740 g durante 5 minutos y a 4 °C y se recupera el sobrenadante en otro tubo. Se precipitó el DNA mediante adición de un volumen de isopropanol (unos 20 ml) y tras mezclar bien se centrifugó a 10740 g durante 10 minutos y a 20 °C, eliminando después todo el sobrenadante. El sedimento obtenido se disolvió en 500 µl de tampón TE con RNasa II-A a 50 µg/ml y se incubó 30 minutos a 37 °C. La solución final de DNA se conservó a 4 °C.

5.2.2. Aislamiento por el método de precipitación con polietilenglicol (PEG)

Inicialmente, se obtuvo un cultivo líquido denso de la estirpe portadora del plásmido en 250 ml de medio rico LB con el antibiótico apropiado a 30 °C ó 37 °C, según la temperatura óptima de crecimiento de la estirpe. El cultivo se centrifugó a 10954 g durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y mediante aspiración se secó el sedimento bacteriano. Las células se resuspendieron en 20 ml de una solución de Tris-sacarosa y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 20 ml de una solución de EDTA-tritón-lisozima y se mezcló con la suspensión celular por inversión suave del tubo. La mezcla resultante se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó el tubo con las células en un baño con agua a 70 °C durante 20 minutos. El lisado obtenido se centrifugó a 10740 g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento con los restos celulares se eliminó con un palillo de dientes estéril y se procedió a la concentración del DNA del sobrenadante. Para ello se añadió un volumen igual de una solución de PEG-NaCl y se incubó a 4 °C durante al menos 6 h. A continuación, se centrifugó la mezcla a 10740 g durante 15 minutos a 4 °C y posteriormente se eliminó el sobrenadante en su totalidad. Para finalizar, el sedimento se resuspendió en 50 µl de tampón TE con RNasa II-A a 50 µg/ml y se incubó 30 minutos a 37 °C. La solución final de DNA se conservó a 4 °C.

6. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE DNA

6.1. Purificación mediante extracción con fenol:cloroformo

Tras el tratamiento con enzimas proteolíticas a lisados celulares y cuando no se requerían otras medidas adicionales de purificación, la eliminación de las proteínas de una solución de ácidos nucleicos se realizó por el procedimiento de extracción de la solución acuosa con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y posteriormente con cloroformo para eliminar los residuos de fenol de la preparación (apartado 3.1 de Materiales).

A la solución de ácidos nucleicos se añadió un volumen igual de la mezcla de fenol y se mezclaron los componentes por agitación hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0 °C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 10300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica y la interfase se volvieron a extraer añadiendo un volumen igual de TE para conseguir una mayor recuperación y, tras mezclarse y mantenerse 15 minutos a 0 °C, de nuevo se separaron las fases por centrifugación y se recogió la fase acuosa, que se unió al primer volumen recuperado. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase. A la solución acuosa final obtenida se añadió el mismo volumen de cloroformo, se mezclaron y se separaron las fases por centrifugación, y finalmente se recuperó la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos en solución.

6.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Cuando fue necesario obtener DNA plasmídico con menor grado de contaminación por DNA cromosómico, se procedió a la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

En primer lugar, se separaron y localizaron en un gel de electroforesis las distintas conformaciones de la molécula plasmídica y se distinguieron de los restos de cromosoma. Se cortó la porción del gel que contenía el plásmido en forma circular covalentemente cerrada (superenrollada). Cada porción se transfirió a un tubo Eppendorf perforado en el fondo, que contenía lana de vidrio estéril silanizada con un espesor de 3 a 4 mm y que estaba acoplado a otro Eppendorf, en el que se recogerá el eluido tras centrifugación. El corte del gel dentro de los tubos acoplados se mantuvo a -20 °C entre 15 y 30 minutos para permitir su congelación, y posteriormente se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos. Con el fin de recuperar la máxima cantidad de DNA, tras la primera centrifugación, al tubo superior se añadieron 100 µl de tampón TE (apartado 3.1 de Materiales) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

6.3. Concentración de DNA mediante precipitación

Para concentrar soluciones de DNA se procedió a su precipitación con isopropanol o etanol. A la solución de DNA se añadió acetato potásico (pH 5,2) a una concentración final de 0,3 M, se mezclaron suavemente y se añadió un volumen de isopropanol o bien dos volúmenes de etanol, que de nuevo se mezclaron bien. El preparado se mantuvo a -80 °C durante 30 a 60 minutos para facilitar la precipitación y el DNA se recuperó centrifugando a 10300 g durante 15 minutos a 4 °C y eliminando el sobrenadante. Los restos de sobrenadante se eliminaron secando los tubos al vacío y con calor en el concentrador CentriVap (Labconco). El DNA precipitado y seco se resuspendió en el volumen deseado de tampón TE (apartado 3.1 de Materiales).

7. ELECTROFORESIS DE DNA

La separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa del gel dependió del tamaño y la conformación del DNA que se pretendía separar, generalmente oscilando entre 0,6 % y 0,8 % (p/v). Las electroforesis se realizaron aplicando una intensidad de corriente constante, para evitar el sobrecalentamiento del tampón de electroforesis, cuyo valor dependió del grado de resolución que se pretendía obtener. Para la preparación del gel y como tampón de electroforesis se utilizó TAE (apartado 3.4 de Materiales). Las electroforesis se llevaron a cabo en presencia del colorante fluorescente bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml incorporado tanto en el gel como en el tampón, que aunque reduce la movilidad del DNA

permite su visualización durante y al final de la electroforesis cuando se ilumina el gel con luz ultravioleta de onda corta. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Las muestras a cargar en el gel se mezclaron previamente con 1/6 de volumen de una solución de BBF 6x (apartado 3.4 de Materiales). La sacarosa que contiene la solución incrementa la densidad de la muestra, facilitando y asegurando su entrada en los pocillos del gel. A su vez, el azul de bromofenol confiere color a la muestra y permite seguir a simple vista el recorrido de las muestras durante la electroforesis, teniendo en cuenta que el colorante migra hacia el ánodo aproximadamente igual que un fragmento de DNA lineal de doble cadena de 300 pb.

8. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Para cuantificar la concentración de DNA de una muestra, se determinó la absorción de la solución de DNA a 260 nm mediante el uso de una cubeta de cuarzo utilizando el espectrofotómetro GeneQuantTM de Pharmacia. Una absorbancia de 1 a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para DNA de doble cadena. Para determinar la pureza de la muestra se midió también la absorción a 280 nm. La relación DO 260 nm/DO 280 nm es una estimación de la pureza de la muestra; una solución de DNA puro tendrá un valor de 1,8 para esta relación, mientras que si hay contaminación con proteínas o fenol esta relación disminuirá.

9. TRANSFORMACIÓN

Para la elección de los métodos de transformación de células bacterianas con DNA plasmídico se tuvo en cuenta el número de copias del plásmido a transformar y la dificultad en crear permeabilidad en la bacteria. El método de cloruro cálcico fue el utilizado por lo general, y en los casos en que la transformación presentaba mayor dificultad se procedió con la electroporación.

9.1. Transformación por el método de cloruro cálcico

El método consiste en el tratamiento de células con soluciones de CaCl₂ a 0 °C seguido por un breve calentamiento, induciendo de este modo el estado de competencia en la bacteria receptora durante el cual es capaz de introducir moléculas de DNA de diferente procedencia (Cohen *et al.*, 1972; Mandel y Higa, 1970).

A partir de una dilución 1:50 de un cultivo nocturno crecido en LB de la estirpe a transformar, se obtuvo un cultivo entre 0,3 y 0,4 unidades de absorbancia a 600 nm creciéndolo con agitación vigorosa a la temperatura óptima de crecimiento de la estirpe. Para cada transformación se tomaron 3 ml del cultivo, se mantuvieron 20 minutos a 0 °C y se recogieron las células centrifugando a 10740 g durante 10 minutos a 4 °C.

Las células se resuspendieron en la mitad del volumen de cultivo tomado inicialmente de una solución Tris-Ca a 0 °C (apartado 3.3 de Materiales), se mantuvieron 20 minutos a 0 °C y se recuperaron por centrifugación. El sedimento se concentró en 1/15 del volumen inicial de la solución Tris-Ca. El volumen obtenido se dividió en alícuotas de 0,2 ml que se pasaron a tubos de vidrio enfriados previamente a 0 °C, donde se mantuvieron 2 horas. Tras este tratamiento se añadió el DNA plasmídico en tampón TE. La cantidad de DNA plasmídico añadida por transformación fue como máximo 40 ng disueltos en 100 µl de TE. Se mezclaron las células y el DNA suavemente y se mantuvieron 30 minutos más a 0 °C. Posteriormente la mezcla se transfirió a un baño de agua a 42 °C y se mantuvo durante 2 minutos, para provocar la entrada del DNA.

La expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico, adquirida por las células transformadas, se permitió añadiendo 1 ml de LB a la suspensión celular e incubándola en un baño con agua a 30 °C ó 37 °C, según la temperatura de crecimiento requerida por la estirpe, con agitación muy suave durante 2 horas. La selección de los transformantes se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo, con el antibiótico al cual el plásmido confiere resistencia en la concentración final adecuada, e incubándolas de 14 a 16 horas a 30 °C ó 37 °C hasta la aparición de colonias.

9.2. Transformación mediante electroporación

Alternativamente al método del cloruro de calcio se empleó el método de la electroporación, ya que proporciona una eficiencia en la transformación de 10 a 20 veces más alta que la obtenida con los mejores métodos químicos.

A partir de una dilución 1:100 de un cultivo nocturno en LB de la estirpe a transformar, se obtuvo un cultivo entre 0,5 y 0,8 unidades de absorbancia a 600 nm creciéndolo con agitación vigorosa a la temperatura óptima de crecimiento. En este momento, el cultivo se pasó a 0 °C y se mantuvo 20 minutos, después se recogieron las células mediante centrifugación a 15475 g durante 15 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen que se tomó inicialmente del cultivo de agua bidestilada a 0 °C. Se centrifugaron de nuevo y el sedimento se disolvió en ½ del volumen inicial de cultivo de agua bidestilada a 0 °C. Se volvió a centrifugar y ahora las células se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de cultivo de glicerol al 10 % en agua bidestilada a 0 °C. Tras una última centrifugación, las células se concentraron 1/500 del volumen inicial en glicerol al 10 %. Esta suspensión final contiene células electro-competentes, capaces de incorporar moléculas de DNA de diferente procedencia, a una concentración aproximada de $1-3 \cdot 10^6$ células/ml. Estas células pueden utilizarse inmediatamente o bien almacenarse a -80 °C durante aproximadamente 6 meses.

Una vez conseguidas las células electrocompetentes, se mezclaron 40 µl de la suspensión celular con 1 ó 2 µl de DNA plasmídico disuelto en un tampón de baja fuerza iónica, y la mezcla se mantuvo a 0 °C durante 1 minuto. Todo este proceso se realizó manteniendo la mezcla de células y plásmidos en hielo. La preparación se transfirió al fondo de una cubeta de electroporación de 0,2 cm a 0 °C que se colocó en la cámara de electroporación y se sometió a un pulso constante de 12,5 KV/cm durante 5 milisegundos usando el electroporador Gene Pulser™ de Bio-Rad ajustado a 25 µF, 2,5 KV y 200 Ω. Se sacó la cubeta de la cámara y se le añadió inmediatamente 1 ml de LB, se resuspendieron las células y se transfirieron a un tubo de cristal para su incubación a 30 °C ó 37 °C durante 2 horas con agitación muy suave. Esta incubación permite la expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico adquirida por las células transformadas. Finalmente, la selección de los transformantes se llevó a cabo del mismo modo que en el método de cloruro cálcico (apartado 9.1 de Métodos).

10. CITOMETRÍA DE FLUJO

10.1. Fundamento teórico de la citometría de flujo

Partiendo de una suspensión celular, la citometría de flujo permite medir simultáneamente la fluorescencia y la dispersión de la luz de células individuales en un gran número y en un corto espacio de tiempo. De esta forma, pueden cuantificarse diferentes constituyentes celulares utilizando fluorocromos específicos para cada uno de ellos. Por otro lado, la dispersión de la luz permite obtener información relativa al tamaño y la forma de la célula (Boye *et al.*, 1983; Steen, 1980; Steen y Boye, 1981). La citometría de flujo es, por tanto, una técnica completa y eficaz para caracterizar poblaciones celulares.

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

Para el desarrollo experimental de este trabajo se emplearon diversos citómetros. Un citómetro Bryte HS de Bio-Rad, equipado con una lámpara de xenón, en el que utilizando bloques de filtros intercambiables puede seleccionarse la longitud de onda de excitación, así como la que se desea registrar en los tubos fotomultiplicadores. Durante una estancia breve en Dinamarca se hizo uso de los citómetros de Apogee A10, equipado con una lámpara de mercurio, y A40-military, con láseres intercambiables. Adicionalmente, se empleó un citómetro de flujo Cytomics FC 500 de Beckman Coulter, equipado con un láser de argón, disponible en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

10.2. Tratamiento y análisis de las muestras

10.2.1. Tratamiento de los cultivos y fijación de las células

Se analizaron muestras de cultivos tratados con rifampicina o cloranfenicol y cefalexina durante 4 horas a 30 °C o tras el cambio de temperatura a 41 °C. El tratamiento con rifampicina o cloranfenicol permite que las bacterias completen las replicaciones que tienen en marcha en el momento del comienzo del tratamiento, dando lugar a cromosomas completos, y la cefalexina impide la división celular. El número final de cromosomas por célula dependerá de las rondas de replicación que estén en marcha en la célula en el momento del tratamiento inhibitorio.

Para fijar las células se tomaron alícuotas de 0,4 ml de cultivo, se les añadió etanol hasta una concentración final del 70 % (v/v) y se mantuvieron a 4 °C. En el caso de las células de *Vibrio cholerae*, fue necesario fijar las células en paraformaldehído 1 % (p/v) y glutaraldehído 0,05 % (v/v) (Saint-Dic *et al.*, 2008). Las células fijadas pueden ser almacenadas hasta 4 meses a 4 °C para su análisis posterior.

10.2.2. Tinción con mitramicina-bromuro de etidio

Para la tinción de las células fijadas se empleó una mezcla de mitramicina y bromuro de etidio (apartado 3.5 de Materiales). La mitramicina se une al DNA de modo específico mientras que el bromuro de etidio se une tanto al DNA como al RNA. Puesto que la tinción con mitramicina no permite obtener una señal detectable por el citómetro de flujo, para cuantificar el contenido de DNA por célula se hace uso del solapamiento de los espectros de emisión de la mitramicina y de absorción del bromuro de etidio. La longitud de onda de excitación empleada es la de la mitramicina, mientras que, a esta longitud de onda, la excitación del bromuro de etidio es prácticamente nula. La luz emitida por la mitramicina excita al bromuro de etidio y la longitud de onda de emisión detectada es la del bromuro de etidio. De este modo es posible cuantificar exclusivamente la cantidad de DNA por célula, siendo despreciable la fluorescencia correspondiente al bromuro de etidio unido al RNA. Se utilizó esta tinción para las muestras analizadas en el citómetro de flujo Bryte HS y en los A10 y A40-military.

Para la preparación de las muestras se tomaron 1,5 ml de la suspensión de células fijadas en etanol y 0,4 ml de las fijadas en paraformaldehído y glutaraldehído y, tras precipitar las células por centrifugación, el sedimento se lavó con 1 ml del tampón de tinción Tris-Mg y finalmente se resuspendió en 100 µl del mismo tampón. A esta suspensión se añadió igual

volumen de la solución de tinción mitramicina-bromuro de etidio. La mezcla se mantuvo un mínimo de 30 minutos a 4 °C en oscuridad antes de ser analizada.

Dado que el tamaño medio de una célula de *E. coli* es de aproximadamente 0,5 µm de diámetro, tanto las soluciones de tinción como el agua empleada para la obtención del flujo laminar en el citómetro de flujo se filtraron usando membranas con poros de 0,22 µm de diámetro (Millipore Millex G-V). De este modo se consigue aumentar la relación señal/ruido detectada por los fotomultiplicadores.

10.2.3. Tinción con PicoGreen o SybrGreen

Las muestras que fueron analizadas en el citómetro Cytomics FC500 fueron teñidas con PicoGreen o SybrGreen, colorantes excitables a 488 nm y que emiten con máxima intensidad en el verde (525 nm) con una alta producción de fluorescencia (Marie *et al.*, 1997; Dragan *et al.*, 2010). El fluorocromo PicoGreen es específico del DNA, con gran afinidad por el DNA de doble cadena (dsDNA), y ha sido diseñado para cuantificar estas moléculas en solución sin que la presencia de RNA interfiera con la emisión de fluorescencia del complejo PicoGreen-dsDNA (Haugland, 1992). SybrGreen es un colorante intercalante utilizado para estudiar el ciclo celular por citometría de flujo en eucariotas y requiere el uso de RNasa para evitar la fluorescencia emitida por su unión al RNA (revisado en Díaz *et al.*, 2010). Esta tinción también se empleó en muestras analizadas en el citómetro Bryte HS.

Para la preparación de las muestras se procede de un modo parecido al caso anterior. Se tomaron 1,5 ml de la suspensión de células fijadas en etanol y 0,4 ml de las fijadas en paraformaldehído y glutaraldehído, las células se precipitaron por centrifugación y el sedimento se lavó con 1 ml de tampón TE una o dos veces. Posteriormente las células se resuspendieron en 1 ml de TE y, en el caso de las muestras posteriormente teñidas con SybrGreen, se trataron con RNasa a una concentración final de 50 µg/ml durante 15 minutos a 37°C. A este volumen se añadió 1 µl de la solución de tinción PicoGreen o SybrGreen (apartado 3.5 de Materiales). Las muestras teñidas con PicoGreen o SybrGreen se mantuvieron en oscuridad a 0°C durante 3 horas o media hora, respectivamente, antes de ser analizadas.

10.2.4. Análisis de las muestras

Para calibrar el instrumento se utilizaron esferas fluorescentes de 2,5 µm de diámetro suministradas por Invitrogen y se dispusieron los objetivos y el cono de inyección de la muestra de modo que el coeficiente de variación fuese inferior a 1,5 y el valor medio de la señal correspondiente a las esferas se situara en el canal 100 en el caso del citómetro de flujo Bryte HS (la intensidad máxima corresponde al canal 256) y en el canal 500 en el Cytomics FC 500 (escala de 1024 canales).

Finalmente se analizaron las muestras teñidas en el citómetro ajustando el flujo de modo que se computaran entre 500 y 1000 células por segundo. Se examinaron entre 20000 y 60000 células de cada muestra. Los archivos obtenidos se analizaron utilizando el software para citometría Apogee v1.7, y para la representación el número de células obtenido se hizo relativo a un total de 60000 en todos los archivos. Cada muestra fue analizada por citometría al menos 3 veces, procedente de cultivos y experimentos realizados en diferentes días, y los resultados se consideraron válidos si se obtuvieron en los tres casos los mismos perfiles.

11. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POR VOLUMEN

11.1. Análisis de células viables

Se tomaron alícuotas de cultivos exponenciales de las estirpes de interés a lo largo del crecimiento. Las alícuotas fueron diluidas de manera seriada en TM9 para posteriormente extender la suspensión celular en placas de medio rico, que se incubaron a la temperatura de crecimiento de la bacteria entre 16 y 48 horas. El factor de dilución se eligió en cada caso de modo que tras la siembra en placa se obtuviera un número de colonias por placa entre 30 y 300. El número de colonias obtenidas corregido con el factor de dilución se representó gráficamente frente a la absorbancia del cultivo y se trazaron líneas de regresión lineal para determinar el número de unidades formadoras de colonias presentes por mililitro (cfu/ml) a lo largo del crecimiento.

11.2. Recuento con citómetro de flujo

A partir de cultivos creciendo exponencialmente, se tomaron alícuotas a lo largo del crecimiento. Las muestras tomadas se diluyeron hasta una absorbancia de 0,01 en NaCl al 0,9 % (p/v) mantenido a 0 °C. Tanto el medio de cultivo como la solución de NaCl empleados fueron previamente filtrados a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro. Las muestras diluidas se mantuvieron en hielo hasta que se realizó el análisis.

Previamente al análisis, se tomaron 990 μl de cada una de las muestras y se mezclaron con 10 μl de una dilución 1:100 de una solución calibrada de microesferas fluorescentes (*CountBright Absolute Counting Beads*, Molecular Probes), de modo que en cada muestra la concentración final de microesferas fuera conocida (10 esferas/ μl). El volumen de muestra analizado se calcula a partir del número de microesferas contabilizadas y se utiliza, junto con el número de células registradas, para calcular la concentración celular en la muestra analizada.

El recuento de las células se llevó a cabo en un citómetro Cytomics FC 500. Para cada muestra individual se realizaron al menos tres recuentos de 100 microesferas, a una velocidad entre 50 y 150 eventos por segundo. Posteriormente se calculó el promedio de células detectadas para cada muestra en ese volumen, y a partir de ese dato se obtuvo el número de células/ml para cada absorbancia.

12. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS

La proteína de fluorescencia verde (GFP) de *Aequorea victoria* ha sido ampliamente utilizada en biología molecular desde su clonación al constituir un método no invasivo y que permite el análisis *in vivo* (Prasher *et al.*, 1992). La fluorescencia de GFP es atribuida a un cromóforo que se forma mediante una reacción de ciclación postraducciona, con la consecuente oxidación de tres aminoácidos presentes en la proteína, lo que produce la emisión de luz (Prasher *et al.*, 1992; Cody *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1994). La formación del cromóforo es un proceso de primer orden que presenta múltiples pasos que se corresponden con una fase de retardo, anterior a la emisión de luz por el fluoróforo (Heim *et al.*, 1994). Se han desarrollado variantes de GFP que mejoran la reacción de plegamiento o disminuyen la vida media de esta proteína que es extremadamente estable (Cormack *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998).

En este trabajo se ha analizado, por espectrofluorimetría y por citometría de flujo, la fluorescencia emitida por células portadoras de minicromosomas o plásmidos que contienen la construcción pBAD-GFP $mut2$ (Lobner-Olesen, 1999). La mutación *mut2* de GFP lleva a la

sustitución de tres aminoácidos en la proteína, produciéndose un cambio en el espectro de absorción de GFP, además de un plegamiento más efectivo de la proteína, lo que da lugar a un aumento en la fluorescencia emitida a 488 nm de hasta 20 veces con respecto a la proteína GFP silvestre (Cormack *et al.*, 1996).

Para el análisis de la fluorescencia de la proteína GFP, a no ser que se indique otra cosa, los cultivos fueron crecidos en medio mínimo M9 con glicerol como fuente de carbono, suplementado con casaminoácidos al 0,1 % (p/v) y con arabinosa al 0,2 % (p/v), para la inducción de GFP $mut2$, y en presencia del antibiótico al que cada plásmido confiere resistencia según la estirpe analizada (apartado 2.1 de Materiales). La concentración de arabinosa utilizada se considera la óptima para el promotor pBAD (Canghai *et al.*, 2004).

12.1. Espectrofluorimetría

12.1.1. Medida del número de copias en cultivo exponencial mediante espectrofluorimetría

Se recogieron muestras a lo largo del crecimiento exponencial del cultivo, desde una absorbancia de 0,1 a 488 nm, y cada 60 minutos, hasta un total de 5 horas. Las alícuotas tomadas fueron diluidas hasta aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia a 488 nm, en el mismo medio de crecimiento mantenido a 0 °C, procurando obtener un volumen mínimo de 2 ml.

Las medidas de la fluorescencia por espectrofluorimetría fueron realizadas en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer 650-40 equipado con una lámpara de xenon. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron fijadas a 488 y 505 nm respectivamente (Cormack *et al.*, 1996), y tanto la rejilla de excitación como la de emisión del monocromador de excitación fueron fijadas en 5. La ganancia de la señal se fijó en alta. Para las medidas se empleó una cubeta estándar de vidrio con las cuatro caras ópticamente pulidas. Antes de tomar el valor, se permitió que la señal de fluorescencia se estabilizara durante unos 30 segundos.

El valor de fluorescencia obtenido por espectrofluorimetría debe ser corregido por el efecto de filtro interno ocasionado por el aumento en la absorbancia de la muestra. La intensidad de fluorescencia corregida viene determinada por la siguiente ecuación (Lakowick, 1983):

$$FL_{\text{corregida}} \approx FL_{\text{obtenida}} \cdot \text{antilog} \left(\frac{A_{488} + A_{505}}{2} \right)$$

Para el análisis de los resultados, los datos obtenidos mediante esta ecuación se hicieron relativos a la absorbancia a 488 nm de la muestra diluida para calcular los valores medios de fluorescencia de GFP corregida con respecto a la masa (FL/masa).

12.1.2. Medida de la inducción de la replicación en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico mediante espectrofluorimetría

Para el análisis de la replicación termoinducida, las bacterias portadoras de los minicromosomas o plásmidos se crecieron y, a una absorbancia de 0,06 y 0,08, a 488 nm, parte del cultivo se transfirió a 41 °C. Se tomaron los valores de fluorescencia emitidos por muestras de los cultivos a lo largo del crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio a 41 °C. Estos valores, una vez corregido el efecto de filtro interno, se hicieron relativos a la absorbancia del cultivo medida a 488 nm. Los valores FL $_{\text{corregida}}/DO$ (FL/masa) obtenidos se hicieron todos relativos a la media del valor obtenido a 30 °C y se representaron frente al tiempo de la toma de muestras, obteniendo así la evolución de esta relación a lo largo del cultivo bacteriano a

30 °C y tras el cambio de temperatura. El aumento del número de copias de minicromosomas y plásmidos obtenido a 41 °C respecto a 30 °C se calculó a partir del valor de FL/masa final obtenido a 41 °C respecto al valor medio obtenido a 30 °C.

12.2. Citometría de flujo

12.2.1. Medida del número de copias en cultivo exponencial mediante citometría de flujo

Las muestras se recogieron durante el crecimiento exponencial desde una absorbancia de 0,1 a 488 nm cada 60 minutos, hasta 5 horas totales. Para el análisis por citometría de flujo, las muestras tomadas se diluyeron hasta una absorbancia aproximada de 0,01 a 488 nm en tampón NaCl al 0,9 % (p/v) mantenido a 0 °C y procurando un volumen final mínimo de 2,5 ml. El medio de cultivo y la solución de NaCl empleados para la citometría de flujo fueron previamente filtrados a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Las muestras diluidas se mantuvieron en hielo hasta que se realizó el análisis.

El análisis de la fluorescencia de GFP se llevó a cabo en un citómetro Cytomics FC 500 equipado con un láser de argón capaz de excitar las moléculas de GFP a 488 nm. Para asegurar la estabilidad de las medidas, la posición de las señales emitidas por esferas fluorescentes, excitables a 488 nm y de 2,5 µm de diámetro, fue fijada en el canal 65 para fluorescencia y en el canal 500 para la dispersión o scattering de la luz.

En total fueron analizadas 20000 células por muestra a una velocidad entre 300 y 600 células por segundo. La distribución de la fluorescencia emitida se recogió en una escala lineal y se tomó el valor medio de la distribución. Este valor indica la media de fluorescencia de GFP por célula en el cultivo (FL/célula).

12.2.2. Medida de la inducción de la replicación en minicromosomas y plásmidos tras estrés térmico mediante citometría de flujo

Para estudiar por citometría de flujo la replicación termoinducida, se crecieron las estirpes portadoras de los plásmidos y cuando el cultivo alcanzó absorbancia entre 0,06 y 0,08 medida a 488 nm, se transfirió parte a 41 °C. Se determinaron los valores de fluorescencia emitidos por muestras de los cultivos a lo largo del crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio a 41 °C. Estos valores se hicieron relativos a la media de todas las medidas realizadas a lo largo del crecimiento a 30 °C, que se mantuvieron estables, y se representaron frente al tiempo de toma de muestras, obteniendo así la evolución de esta relación a lo largo del cultivo bacteriano a 30 °C y tras el cambio de temperatura. Del mismo modo que en el caso de la espectrofluorimetría, la inducción de la replicación obtenida a 41 °C respecto a 30 °C se calculó a partir del valor de fluorescencia final obtenido a 41 °C respecto al valor medio obtenido a 30 °C.

13. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La PCR cuantitativa a tiempo real, o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, abreviada qPCR, es un método que se utiliza para la detección, amplificación y cuantificación precisa, sensible y rápida de secuencias de ácidos nucleicos. El principio y la meta de la tecnología de la PCR, ideada por Kary Mullis en 1987 (Mullis y Faloona, 1987), es incrementar específicamente una diana a partir de una cantidad indetectable de material original. En la PCR clásica, las moléculas resultantes al final de la amplificación pueden analizarse en un gel de electroforesis para la detección de un producto específico. En la PCR a tiempo real este paso se

puede obviar, puesto que la tecnología combina la amplificación del material genético con la detección inmediata de los productos generados en el tubo en el que tiene lugar la reacción.

En este trabajo se ha utilizado el método de la qPCR para el análisis de la replicación cromosómica y la determinación del número de copias de plásmido.

13.1. Toma de muestras

Se emplearon dos tipos de muestras para las reacciones de qPCR. Por una parte, para la obtención de rectas de calibración se utilizó DNA cromosómico y plasmídico. El DNA se aisló mediante el procedimiento de precipitación con polietilenglicol a partir de cultivos crecidos en medio rico LB durante 24 horas a 37 °C con agitación vigorosa (apartado 5.2.2 de Métodos). Posteriormente el DNA cromosómico se purificó por tratamiento con fenol:cloroformo (apartado 6.1 de Métodos) y se concentró por precipitación (apartado 6.3 de Métodos). En el caso de los plásmidos, el DNA se sometió a una electroforesis y se seleccionó y cortó la banda correspondiente al DNA circular covalentemente cerrado para cada plásmido. El DNA plasmídico fue purificado desde el fragmento de gel por centrifugación a través de lana de vidrio (apartado 6.2 de Métodos). Se determinó la concentración del DNA aislado y purificado por absorción a 260 nm (apartado 8 de Métodos). Con las suspensiones de DNA obtenidas, se hicieron diluciones seriadas en tampón TE hasta abarcar un rango dinámico de concentraciones de seis unidades logarítmicas y poder obtener una recta de calibrado precisa de la reacción de qPCR.

El segundo tipo de muestras consistió en suspensiones celulares. La toma de muestras para el estudio de la replicación cromosómica se especifica en los correspondientes apartados de Resultados (1.4.1 y 1.4.2) y sigue un protocolo similar al que se describe a continuación para plásmidos. Para el análisis del número de copias de plásmido, se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivos creciendo exponencialmente a 37 °C, en el medio adecuado, cuando el cultivo alcanzó una absorbancia entre 0,1 y 0,2 medida a 488 nm. Estas alícuotas se congelaron rápidamente para provocar la rotura de las células. Para la preparación de las reacciones de qPCR, se descongelaron las células y se añadió 1 µl de la suspensión celular a la mezcla de reacción. En el caso del uso de células para comprobar la eficiencia de la reacción, se prepararon diluciones en tampón TE de las muestras para obtener la recta de calibrado. Las muestras de suspensiones celulares se emplearon para el trazado de las rectas de calibración y para el análisis de muestras problema (Carapuça *et al.*, 2007).

13.2. Condiciones de la reacción

Para el estudio de la replicación cromosómica mediante qPCR, se diseñaron oligonucleótidos que se usaron como cebadores para amplificar secuencias contenidas en el origen de replicación y próximas al término para todos los cromosomas de las estirpes estudiadas. Para el análisis del número de copias de plásmido de la serie pALO se diseñaron cebadores para la amplificación de una parte de la secuencia de la proteína GFP, presente en todos los plásmidos analizados (Tabla 2 de Materiales). Para simplificar la programación del termociclador con las condiciones de la reacción, se procuró diseñar todos los oligonucleótidos con la misma temperatura de fusión. Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se listan en la Tabla 3 y fueron diseñados mediante la aplicación Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

Los experimentos se realizaron con un termociclador iCycler iQ modelo 170-8720 de Bio-Rad y utilizando el kit para qPCR DyNAmo Flash Sybr Green de Thermo Scientific (apartado 7 de Materiales). Se prepararon muestras por triplicado para cada reacción en un volumen final de 20 µl. Cada tubo de reacción contenía 1 µl de muestra (DNA purificado de concentración conocida o células), 1 µl de cada uno de los cebadores a una concentración final de 12,5 pM,

10 μ l de la master mix 2x del kit de Thermo Scientific, y agua hasta completar 20 μ l. En el caso de que la muestra fuera DNA plasmídico purificado, se añadió también 1 μ l de células congeladas de MC1000 (sin plásmido) de modo que la concentración de células en el tubo fuera la misma que en las muestras problema, para aproximar las condiciones de ambas reacciones lo más posible. El número de células por ml se calculó por diluciones seriadas y siembra en placa (apartado 11.1 de Métodos). Como controles negativos, en todos los experimentos de qPCR, se incluyeron tubos conteniendo 20 μ l de agua y también tubos con la mezcla de reacción y los cebadores, pero sin añadir el DNA molde.

Tras una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, la reacción de amplificación en cadena transcurrió en las siguientes etapas: desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación de los cebadores al DNA molde a 60 °C durante 1 minuto y polimerización a 72 °C durante 2 minutos. Estas etapas se sucedieron durante 35 ciclos, para acabar finalmente con una última etapa de extensión de 10 minutos a 72 °C y el mantenimiento de los productos de la qPCR a 4 °C indefinidamente.

Sistemáticamente, y con la finalidad de analizar la especificidad de los productos resultantes de la qPCR, tras completar los 35 ciclos de amplificación se diseñó una nueva etapa de disociación consistente en el aumento progresivo de la temperatura desde la temperatura de hibridación, 60 °C, hasta 95 °C, incrementando la temperatura 0,5 °C cada 30 segundos. Durante estos pasos la señal de fluorescencia fue continuamente monitorizada para obtener la curva de fusión (Figura 10). A la temperatura de fusión a la que la muestra se desnaturaliza, se puede detectar una rápida caída en la fluorescencia apareciendo un pico en la curva de disociación cuando se representa la primera derivada de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura. En la Figura 10 se observa que todas las muestras tratadas en el experimento mostrado presentaron la caída de la fluorescencia a la misma temperatura de fusión, que en la representación de la primera derivada aparece como un único pico a la temperatura de fusión del par de cebadores *gfp1* y *gfp2* (83,5 °C). Por tanto la pareja de cebadores empleada es adecuada para la amplificación específica del producto de interés, parte de la secuencia de GFP.

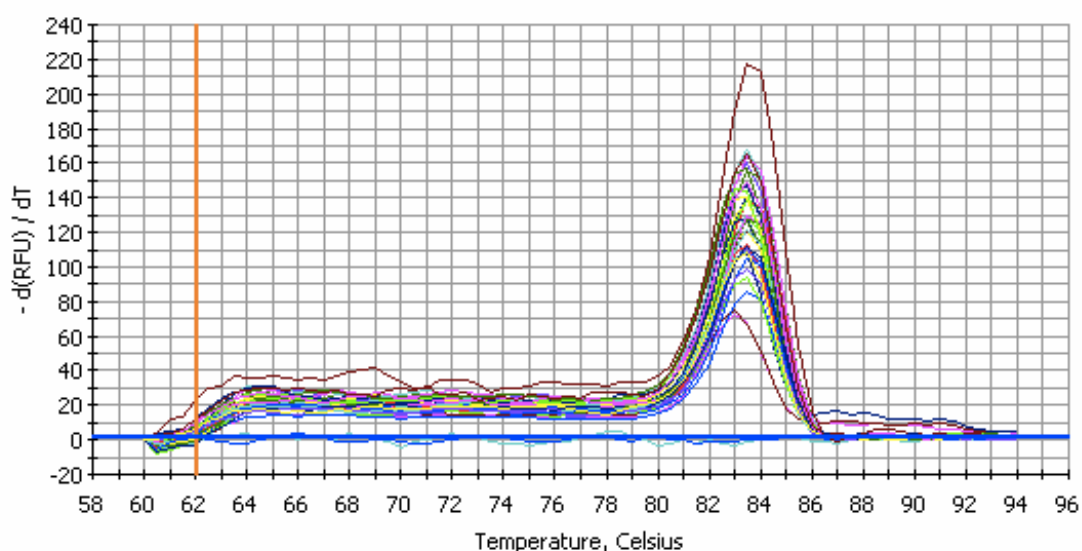


Figura 10. Análisis de la curva de fusión realizado con el software iCycler iQ™ de Bio-Rad para la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2*, representando la primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura de disociación.

13.3. Determinación de la relación origen/término en cromosomas

Se empleó la técnica de qPCR para estudiar la replicación cromosómica en bacterias mediante la determinación del número de copias relativo de las secuencias del origen y el término de la replicación en el cromosoma. A partir de los datos obtenidos de las reacciones de qPCR realizadas con diluciones seriadas en base 10 del DNA cromosómico aislado, purificado y de concentración conocida, se representaron los valores de Ct frente al logaritmo de la concentración inicial de la muestra (Figura 11). La recta de calibrado se generó por regresión lineal de los puntos representados y se determinó el valor de su coeficiente de correlación lineal R^2 . Para cada uno de los cromosomas estudiados, se trazó una recta estándar de calibrado a partir del DNA bacteriano aislado y otra utilizando las muestras tomadas directamente del cultivo celular y congeladas, con el fin de comprobar que la eficiencia con ambos tipos de muestra es similar y próxima al 100 %. En este trabajo se ha calculado la eficiencia para todas las parejas de cebadores empleadas, obteniéndose en todos los casos valores cercanos al 100 % con hasta un 15 % de desviación estándar. En ambos casos se utilizaron diluciones seriadas de las muestras para abarcar un mínimo de 5 unidades logarítmicas de concentración en el trazo de las rectas de calibrado. Las parejas de cebadores empleadas se incluyen en la Tabla 3.

Ajustada la eficiencia de la reacción de qPCR en torno al 100%, se puede determinar la cuantificación relativa de un gen o secuencia de interés con respecto a otro gen o secuencia de referencia, tanto en muestras problema como en muestras control. En el estudio de la replicación cromosómica y HIR, la secuencia de interés es *oriC*, la secuencia de referencia es el término o una región próxima al término de la replicación (Tabla 4), las muestras problemas son los cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C y tras el cambio de la temperatura de incubación a 41 °C y la muestra control es un cultivo en estado estacionario. La secuencia de referencia debe presentar una cantidad constante y sin regulación dependiente de factores como el momento del ciclo celular o la temperatura. En este trabajo se utiliza como referencia la secuencia del término que se presenta en una cantidad de una por cromosoma y que se considera constante a lo largo del ciclo celular.

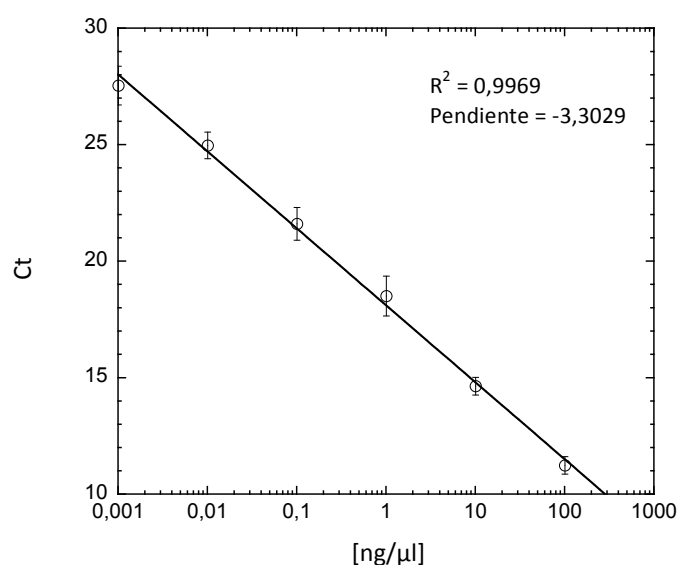


Figura 11. Recta estándar de calibrado para determinar el rango dinámico lineal de la qPCR de DNA plasmídico. Se representa el Ct frente al logaritmo de la concentración de DNA de triplicados de cada concentración (las barras indican la desviación típica).

Si la eficiencia en la amplificación de una secuencia de referencia es la misma que la de la secuencia de interés, se puede utilizar el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ para la su cuantificación relativa (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2006). En este modelo, primero se normalizan los datos obtenidos para la secuencia de interés que se pretende cuantificar con respecto a la secuencia de referencia, tanto en la muestra problema como en la muestra control a la que se desea comparar.

$$\Delta Ct_{\text{muestra problema}} = Ct_{\text{sec. interés}} - Ct_{\text{sec. referencia}}$$

$$\Delta Ct_{\text{muestra control}} = Ct_{\text{sec. interés}} - Ct_{\text{sec. referencia}}$$

A partir de estos valores se calcula la diferencia entre el Ct normalizado (ΔCt) de la muestra problema y el Ct normalizado de la muestra control:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$$

Finalmente, la cuantificación del gen de interés respecto al gen de referencia en la muestra problema, relativa a esta relación en la muestra control, se obtiene con la siguiente ecuación:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Este método asume que las reacciones con todas las parejas de cebadores tienen la misma eficiencia. Cuando la eficiencia en la amplificación de un gen o secuencia de referencia no es la misma que la eficiencia del gen o secuencia de interés, es necesario utilizar un método que tenga en cuenta ambas eficiencias. El método descrito por Pfaffl (2001) permite calcular la cantidad relativa (R) de una secuencia de interés en base a la eficiencia (E) y a la desviación del Ct de una muestra problema en función de una muestra control, expresando la relación en comparación a una secuencia de referencia (Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{sec. interés}})^{\Delta Ct_{\text{sec. interés}} (\text{control-problema})}}{(E_{\text{sec. referencia}})^{\Delta Ct_{\text{sec. referencia}} (\text{control-problema})}}$$

13.4. Construcción de rectas estándar para cuantificación del número de copias de plásmido

La eficiencia de la amplificación de la qPCR viene determinada por la pendiente de la recta estándar de calibración. Si en cada ciclo se incrementa la cantidad de DNA al doble de la cantidad que había en el ciclo anterior, teóricamente, para una diferencia de 10 veces en la cantidad de DNA se esperaría un valor de 3,322 ciclos. Esto se representa por la siguiente relación (Lee *et al.*, 2006; Hildenbrand *et al.*, 2011):

$$\frac{1}{\log_{10} 2} = 3,322$$

Para cada plásmido estudiado, se trazó la línea de regresión lineal o recta estándar de calibración con el fin de determinar la eficiencia de la pareja de cebadores para la secuencia de la proteína GFP en la reacción de qPCR planteada. En la Figura 11 se muestra la recta de calibración obtenida para un rango de diluciones seriadas del plásmido p15A aislado por el procedimiento de precipitación con polietilenglicol y purificado por centrifugación a través de lana de vidrio (apartados 5.2.2 y 6.2 de Métodos). La concentración del plásmido en cada una de las diluciones se determinó por absorción a 260 nm (apartado 8 de Métodos). Esta recta se trazó para todos los plásmidos analizados, procurando abarcar un mínimo de 5 unidades

logarítmicas de concentración de DNA utilizada. De este modo el cálculo de la eficiencia de la reacción de qPCR es más acertado, puesto que se reduce la posible variación matemática en la pendiente de la recta. Se trazaron rectas tanto a partir de DNA plasmídico aislado y purificado como a partir de muestras con células congeladas, para asegurar una eficiencia cercana al 100 % en ambos tipos de reacciones.

A partir de la pendiente de la recta de calibrado, se puede calcular la eficiencia de la reacción mediante la siguiente ecuación (Rasmussen, 2001):

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Utilizando esta ecuación, una pendiente de -3,322 daría un valor de eficiencia igual a 2, que indica una eficiencia del 100 %. Si la reacción de PCR tuviera presenta una eficiencia menor al 100 %, la sensibilidad en la detección de productos es menor. Con eficiencias superiores al 100 % se sobreestima la eficacia real de la amplificación (Pfaffl, 2006). En todas las rectas estándar obtenidas en este trabajo se consiguió una eficiencia del 100 % con un margen de desviación estándar hasta del 15 %.

Teniendo en cuenta que un par de bases tiene un peso molecular medio de 660 Da o g/mol, y que el número de Avogadro representa el número de moléculas / mol, se calcula el número de copias correspondiente a cada plásmido (pcn) mediante la siguiente expresión (Whelan *et al.*, 2003):

$$\text{pcn} = \frac{\text{cantidad de DNA (g)} \times 6,022 \cdot 10^{23} \left(\frac{\text{pb}}{\text{mol}}\right)}{\text{longitud del plásmido (pb)} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}$$

Una vez trazada la recta estándar de calibración a partir de los datos obtenidos de muestras de DNA de concentración conocida, por extrapolación se puede determinar la cantidad de DNA de una muestra problema y, por tanto, el número de copias de plásmido presente en la muestra. Conociendo el número de células por ml en cada cultivo, determinado por siembra en placa (apartado 11.1 de Métodos), fue posible calcular el número de copias por célula en cada muestra.

14. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE Y EPIFLUORESCENCIA

La microscopía de contraste de fase permite visualizar la morfología de las bacterias, gracias a la combinación de la luz difractada por las células con la luz no difractada que pasa a través de las mismas. Por otra parte, la fluorescencia emitida por un fluoróforo permite analizar la distribución de un componente celular. En este trabajo se combinan ambas técnicas para analizar el tamaño de las células y la distribución del DNA.

14.1. Preparación de las muestras

Se trabajó con muestras de cultivos fijadas siguiendo la misma metodología empleada para la fijación de células para citometría (apartado 10.2.1 de Métodos). Las células fijadas se rehidrataron tomando una alícuota de cada muestra, centrifugando a 12091 g durante 10 minutos a 4 °C y resuspendiendo el sedimento en 50 µl de tampón TrisMg (apartado 3.5 de Materiales).

Sobre los portaobjetos de microscopía se crearon microplacas de agar con DAPI (apartado 3.6 de Materiales). Se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se colocaron sobre la superficie plana de las microplacas de agar con DAPI para permitir su tinción. La preparación se dejó

secar y la muestra se cubrió con un cubreobjetos para su análisis en el microscopio. Estos procesos se llevaron a cabo en oscuridad para evitar la excitación del fluoróforo.

14.2. Análisis de las muestras

Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio Nikon modelo Eclipse E600. El microscopio dispone de una lámpara de alta presión de mercurio, modelo HB-10104AF de Nikon, y un filtro UV-2A para seleccionar la emisión de luz ultravioleta con la que excitar al DAPI. Está equipado con una cámara fotográfica digital Hamamatsu modelo C4742-95-10NR y el software IpLab (Scanalytics) para la captura de imágenes.

En los casos en los que fue posible identificar con claridad nucleoides fluorescentes densos suficientemente separados y definidos en el interior de las células, en las imágenes obtenidas por epifluorescencia, se determinó el número de nucleoides por célula analizando un total de entre 180 y 420 células en cada muestra.

15. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ORÍGENES DE REPLICACIÓN

La apertura de la doble hélice de DNA es un evento esencial en la regulación de procesos celulares tales como replicación, transcripción, reparación y recombinación. Este hecho hace interesante un estudio computacional para analizar las propiedades de las secuencias de DNA. En este trabajo se han utilizado el análisis de la curva Z y la predicción de sitios SIDD (*stress-induced DNA duplex destabilization*) de alta probabilidad de desestabilización por estrés.

15.1. Curva Z

Una estrategia útil para localizar los orígenes de replicación en el genoma de cualquier especie procariota, arquea o eucariota, es el análisis de la curva Z. Se trata de una representación geométrica tridimensional a partir de la secuencia de nucleótidos de un genoma. Los componentes de la curva Z representan tres distribuciones independientes que describen la secuencia estudiada, que son la distribución de bases púricas con respecto a las pirimidínicas, de bases amino con respecto a bases cetos, y de los enlaces por puentes de hidrógeno triples con respecto a los dobles. La representación de estas variables puede usarse para predecir orígenes de replicación, ya que en los orígenes existen distribuciones de nucleótidos en torno a *oriC* diferentes a la media del genoma, e incluso con el análisis de las curvas Z se ha propuesto la presencia de más de un origen de replicación en el genoma de algunas bacterias (Gao, 2015).

Las curvas Z para las secuencias de los organismos incluidos en la base de datos Doric están accesibles a través de la aplicación disponible en la dirección web <http://tubic.tju.edu.cn/doric/index.php> (Gao y Zhang, 2007; Gao *et al.*, 2013). En este trabajo se han obtenido las curvas Z correspondientes a las secuencias de los orígenes indicadas en la Tabla 4. De estas representaciones se han extraído los datos más relevantes relativos a la composición del genoma y de la secuencia del origen de replicación, y se recogen en la Tabla 5. Se puede comprobar que para cada uno de los cromosomas estudiados el porcentaje de pares AT es mayor en la secuencia *oriC* que en el genoma completo. En la Tabla 6 se resumen la definición y las características de los diferentes tipos de *oriC* según la clasificación empleada en la identificación y el análisis de las secuencias candidatas a origen que se efectúa para el trazado de las curvas Z (Gao y Zhang, 2007). Los factores de clasificación son el número de secuencias de unión de DnaA, la distancia entre *oriC* y *dnaA*, y la distancia entre *oriC* y el valor mínimo de la curva de disparidad de pares GC en relación con el tamaño del cromosoma.

Tabla 5. Información sobre el genoma y el *oriC* de los cromosomas bacterianos de *E. coli* AB1157, *S. typhimurium* LT2, *B. subtilis* BG214 y *V. cholerae* ALO 2495 extraídos de la base de datos DoriC.

Estirpe (cromosoma)	Genoma		<i>oriC</i>			
	Tamaño (Kpb)	% AT	Tamaño (b)	% AT	Secuencias de unión de DnaA	Tipo *
<i>E. coli</i> AB1157	4,639	49,21	378	56,61	11 ^a	2
<i>S. typhimurium</i> LT2	4,857	47,78	378	55,56	4 ^b	2
<i>B. subtilis</i> BG214	4,214	56,48	188	62,77	20 ^c	1
<i>V. cholerae</i> ALO2495 (I)	2,961	55,30	337	63,20	6 ^d	2
<i>V. cholerae</i> ALO2495 (II)	1,072	53,09	887	61,89	11 ^e	3

* Clasificación del tipo de *oriC* según Gao y Zhang, 2007.

^a Leonard y Grimwade, 2015, Ozaki y Katayama, 2012.

^b Gao y Zhang, 2007; Mackiewicz *et al.*, 2004.

^c Rajewska *et al.*, 2012; Wolanski *et al.*, 2015.

^d Saha *et al.*, 2004; Rajewska *et al.*, 2012.

^e Gerding *et al.*, 2015.

Tabla 6. Definición y características de los diferentes tipos de *oriC* según Gao y Zhang (Gao y Zhang, 2007).

Tipo de <i>oriC</i>	Secuencias de unión de DnaA	Distancia relativa de <i>oriC</i> a:		
		<i>dnaA</i>	valor mínimo de la curva de disparidad en GC	sitio <i>dif</i>
1	≥ 3	Adyacente	< 1 % del tamaño del cromosoma	-
2	≥ 3	< 1 % del tamaño del cromosoma ^a	< 1 % del tamaño del cromosoma ^a	-
3	≥ 3	< 2 % del tamaño del cromosoma ^b	< 2 % del tamaño del cromosoma ^b	La mitad del tamaño del cromosoma
4	1-2	<i>oriC</i> cercano a un gen indicador (<i>dnaA</i> , <i>hemE</i> , <i>gidA</i> , <i>repC</i> , <i>rpmH</i>)	-	-
5	-	Resto de los casos no clasificables del 1 al 4		

^a En el tipo 2 se deben cumplir las dos condiciones simultáneamente.

^b Para definir el tipo 3 es suficiente con satisfacer una de las tres condiciones.

15.2. Predicción de sitios SIDD

Para analizar la secuencia de nucleótidos del origen de replicación de cada uno de los replicones estudiados en este apartado se ha empleado la aplicación WebSIDD, desarrollada por el grupo de Benham para la localización de los denominados sitios SIDD (*stress-induced DNA duplex destabilization*; Bi y Benham, 2004). La aplicación se encuentra disponible en la dirección web <http://benham.genomecenter.ucdavis.edu/sibz/> y analiza la aparición de estructuras transitorias en moléculas de DNA con estado de superenrollamiento alterado mediante el empleo de métodos basados en mecanismos estadísticos. El método predice la localización precisa de sitios, o pares de bases, en la doble hélice de DNA donde el estrés impuesto por la superhélice induce la separación de la misma, lo que permite calcular el patrón de desestabilización experimentado por la secuencia de DNA (Wang *et al.*, 2004).

Tras introducir la secuencia de interés en el formulario, la aplicación devuelve dos gráficos, el perfil de transición P(X) y el de energía de desnaturalización G(x). En el perfil de transición se representa la probabilidad de apertura de la doble hélice, P(X), con respecto a cada nucleótido de la secuencia introducida. El gráfico de energía o perfil de desestabilización muestra el

incremento de energía libre necesario para que la doble hélice se abra en cada una de las posiciones o nucleótidos. Los datos y gráficos derivados del análisis por WebSIDD están disponibles para su descarga.

A partir de las secuencias de orígenes incluidas en la Tabla 4 se han representado los perfiles de transición para la localización de los sitios SIDD en los orígenes de replicación bacterianos y plasmídicos estudiados en este trabajo.

RESULTADOS

1. REPLICACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS TÉRMICO EN CROMOSOMAS BACTERIANOS

Todos los organismos presentan mecanismos que les permiten detectar diferentes cambios ambientales y responder frente al estrés que les supone un cambio en las condiciones de crecimiento. El estrés térmico provocado por aumento de la temperatura de incubación de un cultivo bacteriano en diez o más grados da lugar en *Escherichia coli* a replications extras acíclicas que escapan del control del ciclo celular. Esta replicación inducida por estrés térmico se conoce como HIR (*heat induced replication*) y fue identificada y descrita para el cromosoma de *E. coli* por el grupo de investigación del Dr. Jiménez-Sánchez (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008). HIR es independiente de la repuesta de choque térmico y su iniciación tiene lugar exclusivamente en *oriC*, aunque presenta requerimientos funcionales diferentes a la replicación cíclica; entre ellos HIR no requiere la actividad de la RNA polimerasa, ni la síntesis de proteínas y es dependiente de la actividad de RecA y de la DNA polimerasa I (apartado 5.2.1 de Introducción).

Una vez ha sido caracterizado y definido en gran parte el mecanismo de HIR en *E. coli*, en este apartado de Resultados se amplía el estudio y la caracterización de la replicación inducida por estrés térmico a otros cromosomas bacterianos. Se analiza la replicación en *Salmonella typhimurium*, que pertenece a la misma familia que *E. coli* e igualmente es una especie representativa del grupo de las Gram negativa; *Bacillus subtilis*, como organismo modelo de especies Gram positiva; y *Vibrio cholerae* que, a diferencia de la mayoría de las bacterias, presenta dos cromosomas, el mayor de ellos similar al de *E. coli* y el menor similar a un plásmido, con diferente control de su replicación en el ciclo celular (Egan *et al.*, 2005). En todas las bacterias estudiadas se ha observado la aparición de ciclos de replicación extras inducidos por estrés térmico, aunque a diferentes niveles. Se ha cuantificado esta termoinducción de la replicación en distintas condiciones de crecimiento mediante el análisis de la síntesis de DNA *in vivo* por marcaje radiactivo, citometría de flujo, microscopía de epifluorescencia y contraste de fases y qPCR. También se ha estudiado la dependencia de la proteína RecA para HIR en las distintas especies y de los niveles de DNA polimerasa I para HIR en *E. coli*. Los resultados obtenidos permiten proponer a HIR como un mecanismo de estrés generalizado en los cromosomas bacterianos.

1.1. Análisis de HIR por acumulación de DNA tras la inhibición del inicio de la replicación (Δ DNA)

El primer objetivo de este trabajo fue estudiar la replicación cromosómica en las condiciones que llevan a la aparición de HIR en estirpes silvestres de *Salmonella typhimurium* (LT2), *Bacillus subtilis* (BG214) y *Vibrio cholerae* (Bah2) (Tabla 1). Se utilizaron cultivos bacterianos creciendo exponencialmente a 30 °C, tanto en medio rico LB como en medio mínimo M9 con glucosa al 0,4 % (p/v) como fuente de carbono y complementado con casaminoácidos al 0,1 % (p/v) y tiamina a 0,2 mg/ml. En el caso de *V. cholerae* también se crecieron cultivos utilizando el medio mínimo AB complementado con glucosa al 0,2 % (p/v), serina a 100 µg/ml, casaminoácidos al 0,5 % (p/v) y tiamina a 0,2 mg/ml (apartado 4 de Materiales). Cuando el cultivo alcanzó una absorbancia entre 0,06 y 0,08 (medida a 600 nm en caso de medio rico y a 450 nm para los medios mínimos), se transfirió una alícuota del cultivo a 41 °C, al mismo tiempo que se aplicaba un tratamiento inhibitorio de los inicios de la replicación tanto a 30 °C como tras el cambio a 41 °C. Para la inhibición del inicio de la replicación, al medio de cultivo se adicionó rifampicina o cloranfenicol a diferentes concentraciones (rifampicina a 50, 100, 150 o 300 µg/ml, o cloranfenicol a 200 o 250 µg/ml, según los casos) (apartado 2 de Métodos). Los cultivos se incubaron en estas condiciones

durante al menos el doble del tiempo de generación de cada estirpe en cada una de las condiciones.

De estos cultivos tratados se obtuvieron los valores de la síntesis relativa de DNA (acumulación de DNA o Δ DNA), tras la adición de rifampicina o cloranfenicol a 30 °C (Δ DNA 30 °C) y junto con el cambio a 41 °C (Δ DNA \rightarrow 41 °C), que se presentan en las Figuras 12, 14, 16 y 18. A partir de estos datos se determinaron los valores de n (número de ciclos de replicación por cromosoma) e i (porcentaje de orígenes inducidos tras estrés térmico que dan lugar a cromosomas completos), y se calculó 2^n (número de orígenes por cromosoma en el cultivo exponencial) (apartados 4.2.2 y 4.2.3 de Métodos), con la intención de analizar una posible relación entre los parámetros calculados y las distintas condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 7, 8, 9 y 10 y se describen en los siguientes apartados.

1.1.1. HIR por acumulación de DNA en *E. coli*

Aunque HIR ya ha sido ampliamente caracterizada en *E. coli*, se incluyen en este trabajo los datos obtenidos en la estirpe AB1157 de *E. coli* en las condiciones que el resto de las especies estudiadas, para que sirvan de comparación. En la Figura 12 se presentan los datos de la síntesis relativa de DNA después de la inhibición del inicio por tratamiento con rifampicina a

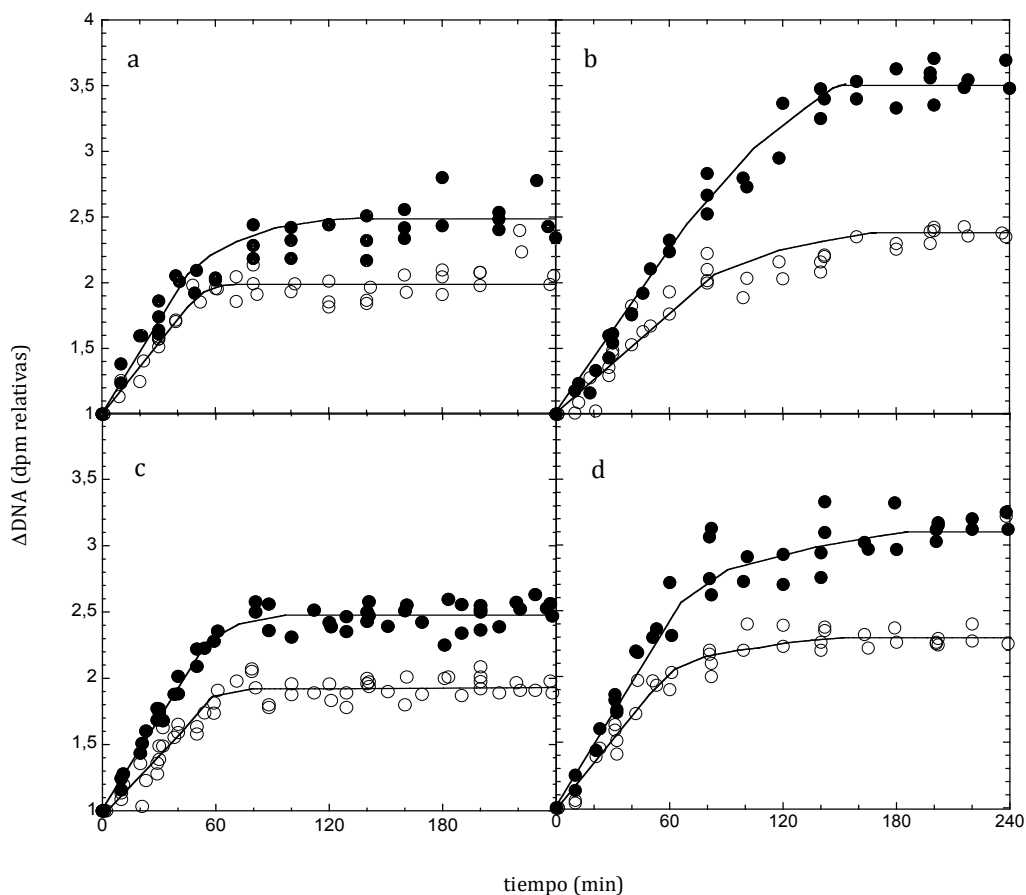


Figura 12. Acumulación de DNA en la estirpe AB1157 de *E. coli* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a y b) y en medio rico LB (c y d) tras la adición de rifampicina a 150 μ g/ml (a y c) o cloranfenicol a 200 μ g/ml (b y d) a 30 °C (○) y junto con el cambio a 41 °C (●).

Tabla 7. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C (→41 °C), número de orígenes por cromosoma a 30 °C (orígenes) y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C (inducción) en la estirpe AB1157 de *E. coli* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas. Se indica el tiempo de generación (τ) del cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C (n = número de cultivos analizados).

Medio de cultivo	Antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	Acumulación (%)		Orígenes (2^n)	Inducción (i%)	τ 30 °C (min)	n
		30 °C	→41 °C				
MM9 casaa	Rif 150	100	150	4,92	24,97	54,5	5
	Cam 200	119	250	6,32	55,23		2
LB	Rif 150	91	148	4,34	29,94	38,8	3
	Cam 200	130	210	7,26	34,84		2

150 $\mu\text{g/ml}$ o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$, tanto en medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos, como en medio rico LB, creciendo a 30 °C y tras el cambio a 41 °C. Cuando la inhibición del inicio de la replicación es mediante rifampicina, la acumulación de DNA alcanza valores finales inferiores y a un tiempo más corto que en el caso del tratamiento con cloranfenicol. Esto indica que el efecto inhibitorio de la rifampicina, como inhibidor de la RNA polimerasa, es más rápido que el efecto del cloranfenicol, inhibidor de la síntesis de proteínas, sobre el inicio de la replicación en *E. coli*. Resultados anteriores del análisis de HIR en *E. coli* mostraron igual patrón y determinaron que la inhibición por rifampicina tiene lugar a tiempo cero o muy próximo; debido a esto la rifampicina es usada como inhibidor del inicio de la replicación en *E. coli* en los estudios de HIR (Botello, 1994).

A partir de los valores de DNA acumulado a 30 °C tras la adición del antibiótico (Figura 12), se determinó el número de ciclos de replicación por cromosoma (n) y se calculó el número de orígenes por cromosoma (2^n) presentes en el cultivo en el momento de la inhibición en cada una de las condiciones estudiadas (apartado 4.2.2 de Métodos). También se determinó el porcentaje de orígenes que iniciaron la replicación por la inducción provocada por el estrés térmico (i) a partir de la acumulación después del cambio de la temperatura de incubación a 41 °C (apartado 4.2.3 de Métodos). Los datos de acumulación de DNA a 30 °C y después del cambio a 41 °C, así como el número de orígenes por cromosoma en crecimiento exponencial a 30 °C y el porcentaje de los orígenes presentes que inducen la iniciación de la replicación por el cambio de temperatura, se recogen en la Tabla 7. El número medio de orígenes por cromosoma obtenido fue superior cuando se inhibió el inicio de la replicación con cloranfenicol en lugar de con rifampicina, debido a que el efecto retrasado del cloranfenicol sobre la iniciación lleva a una sobreestimación de este parámetro. Los porcentajes de orígenes donde se induce HIR ($i\%$) mostraron dependencia del medio, obteniéndose, en el caso del tratamiento con rifampicina, valores superiores en el medio rico (29,94 %) a los del medio mínimo (24,97 %), como se había observado previamente (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

Adicionalmente al análisis de acumulación de DNA tras la inhibición del inicio de la replicación, se analizaron el cultivo inicial creciendo exponencialmente a 30 °C y una alícuota que se transfirió de 30 °C a 41 °C (sin adición de antibióticos). En ambos cultivos se siguió el crecimiento en masa y la síntesis de DNA (apartados 1 y 4.2.1 de Métodos). A partir de estos datos se determinó la relación DNA/masa en los cultivos a lo largo del crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio a 41 °C (apartado 4.2.1 de Métodos). Los valores obtenidos a distintos tiempos se hicieron relativos al valor DNA/masa medio obtenido en el cultivo exponencial a 30 °C y se presentan en la Figura 13. La relación DNA/masa del cultivo exponencial a 30 °C se mantuvo constante, en torno a su media, indicando un crecimiento equilibrado; presentando los cultivos en medio mínimo un tiempo de generación de 54,5 minutos y de duplicación del DNA de 50,0 minutos, siendo estos valores en medio rico de 38,8 minutos y 37,6 minutos, respectivamente. Tras el cambio de temperatura la relación DNA/masa aumentó a lo largo del

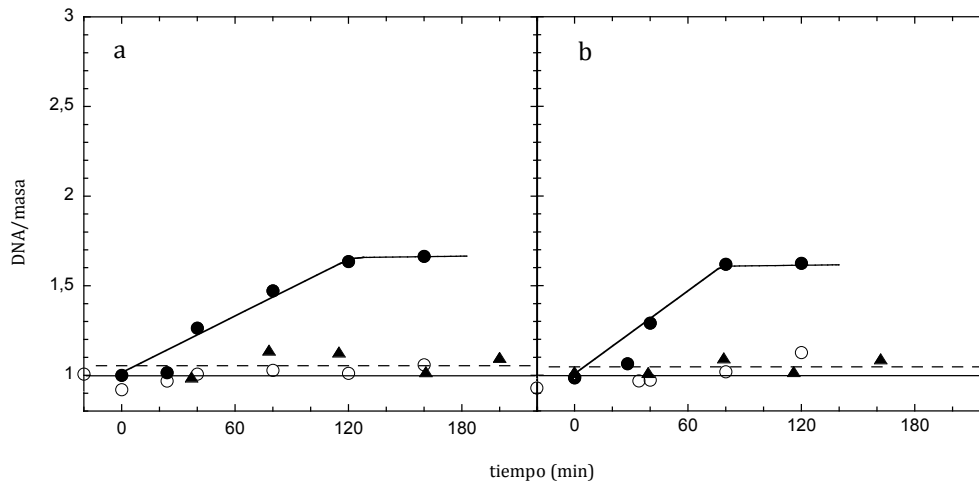


Figura 13. Relación DNA/masa en la estirpe AB1157 de *E. coli* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a) y en medio rico LB (b) a 30 °C (○), a 41 °C (▲) y tras el cambio de 30 °C a 41 °C (●). Datos relativos al valor DNA/masa medio a 30 °C.

tiempo, debido al incremento en la velocidad de la síntesis de DNA relativo al de la masa del cultivo (tiempo de generación de 32,5 minutos y de duplicación del DNA de 26,6 minutos, en medio mínimo; tiempo de generación de 26,0 minutos y de duplicación del DNA de 21,0 minutos, en medio rico). Esta relación se estabiliza en valores en torno al 60 % superiores al valor mantenido a 30 °C transcurridas entre dos y tres generaciones después del cambio de temperatura, cuando el cultivo comienza a entrar en fase estacionaria (Figura 13) (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

Para comprobar si el aumento de la relación DNA/masa observado tras el cambio de temperatura se debe a la temperatura de crecimiento o al estrés térmico, se analizó el crecimiento en masa y la síntesis de DNA en cultivos de *E. coli* AB1157 creciendo exponencialmente a 41 °C. El cultivo exponencial mantenido siempre a 41 °C mostró una relación DNA/masa prácticamente constante en torno a la misma media que el cultivo exponencial a 30 °C, tanto en medio mínimo como en medio rico, a diferencia de la respuesta observada en el cambio de temperatura (Figura 13). Por tanto, la variación en la cantidad de DNA por masa del cultivo observada tras el cambio de temperatura no sería efecto de la alta temperatura sino que tendría dependencia del estrés térmico al que se somete el cultivo.

1.1.2. HIR por acumulación de DNA en *S. typhimurium*

Se estudió la aparición de replications extras inducidas por cambio de temperatura en cultivos de la estirpe LT2 de *S. typhimurium*, en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, creciendo a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, en condiciones de inhibición de inicios de la replicación por tratamiento con rifampicina a 50, 100 o 150 µg/ml o cloranfenicol a 200 µg/ml. La acumulación de DNA en dichas condiciones se muestra en la Figura 14 y los porcentajes de acumulación se presentan en la Tabla 8. Se probaron diferentes concentraciones de rifampicina al observar que la concentración estándar utilizada, 150 µg/ml, producía ocasionalmente degradación del DNA en los cultivos creciendo en medio rico después del cambio de temperatura (Figura 14, g). La concentración más baja utilizada, 50 µg/ml, no fue suficiente para inhibir los inicios de replicación en medio rico (Tabla 8). Para este estudio la concentración más adecuada de rifampicina resultó ser 100 µg/ml en medio rico, aunque en medio mínimo todas las concentraciones actuaron eficientemente. La

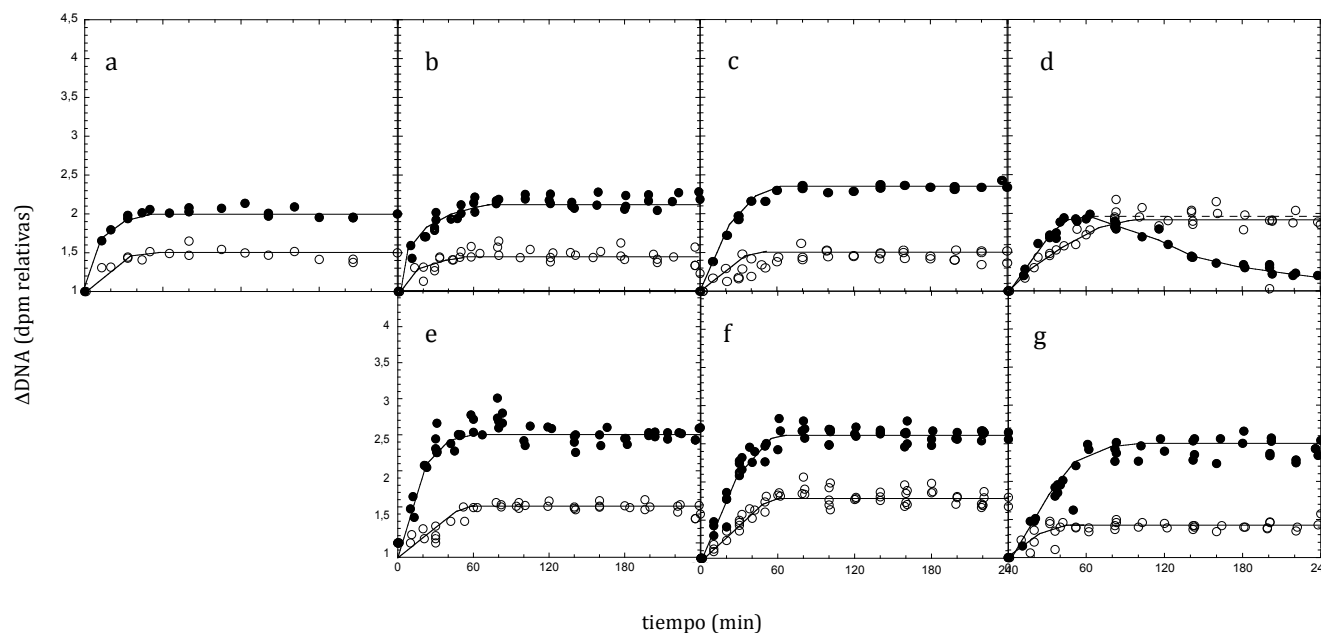


Figura 14. Acumulación de DNA en la estirpe LT2 de *S. typhimurium* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a, b, c y d) y en medio rico LB (e, f y g) tras la adición de rifampicina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (a), 100 $\mu\text{g/ml}$ (b y e) o 150 $\mu\text{g/ml}$ (c y f) o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$ (d y g) a 30 $^{\circ}\text{C}$ (\circ) y junto con el cambio a 41 $^{\circ}\text{C}$ (\bullet).

concentración empleada de cloranfenicol, 200 $\mu\text{g/ml}$, fue suficiente para conseguir la inhibición de la replicación en medio rico aunque en medio mínimo este tratamiento dio lugar a la degradación del DNA acumulado (Figura 14, d). En todas las condiciones, en las que se consiguió la inhibición sin degradación, se observó un aumento en la acumulación de DNA en el cultivo al que se le aumentó la temperatura de crecimiento con respecto al que se mantuvo a 30 $^{\circ}\text{C}$, lo que indica la aparición de la replicación inducida por estrés térmico o HIR.

En la Tabla 8 se presentan el número de orígenes por cromosoma (2^n) en el cultivo exponencial a 30 $^{\circ}\text{C}$ en el momento de la inhibición y el porcentaje de orígenes en los que se indujo la replicación por el cambio de temperatura (i). El número medio de orígenes por cromosoma fue similar en los dos medios de cultivo empleados, estando entre 2 y 2,4 en la mayoría de los tratamientos. Únicamente en el tratamiento con cloranfenicol en medio

Tabla 8. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 $^{\circ}\text{C}$ y tras el cambio a 41 $^{\circ}\text{C}$ ($\rightarrow 41^{\circ}\text{C}$), número de orígenes por cromosoma a 30 $^{\circ}\text{C}$ (orígenes) y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 $^{\circ}\text{C}$ (inducción) en la estirpe LT2 de *S. typhimurium* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas. Se indica el tiempo de generación (τ) del cultivo creciendo exponencialmente a 30 $^{\circ}\text{C}$ (n = número de cultivos analizados).

Medio de cultivo	Antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	Acumulación (%)		Orígenes (2^n)	Inducción (i%)	$\tau_{30^{\circ}\text{C}}$ (min)	n
		30 $^{\circ}\text{C}$	$\rightarrow 41^{\circ}\text{C}$				
MM9 casaa	Rif 50	50	100	2,39	33,38	55,0	1
	Rif 100	45	115	2,37	43,38		4
	Rif 150	51	135	2,42	55,79		4
	Cam 200	90	89	4,29	-		2
LB	Rif 50	280	-	40,78	66,73	42,3	1
	Rif 100	50	150	2,39	66,73		5
	Rif 150	85	160	4,00	40,66		4
	Cam 200	40	150	2,04	78,69		3

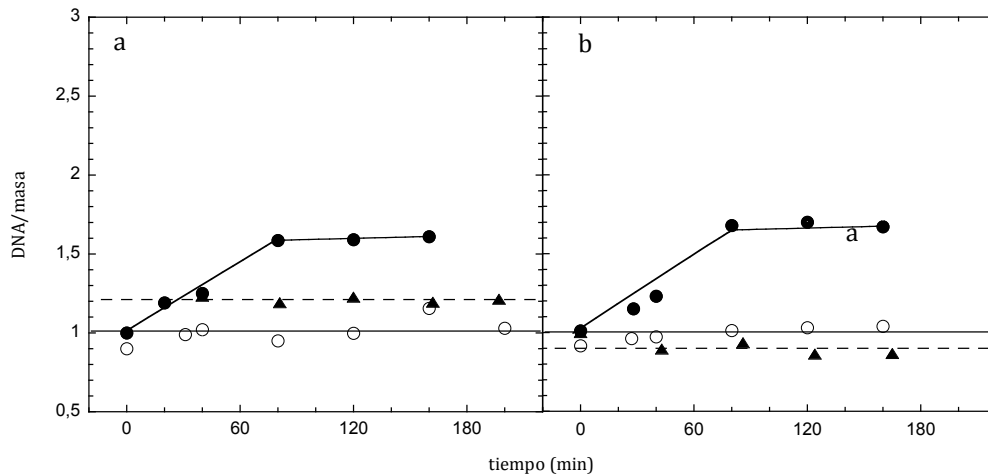


Figura 15. Relación DNA/masa en la estirpe LT2 de *S. typhimurium* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a) y en medio rico LB (b) a 30 °C (○), a 41 °C (▲) y tras el cambio de 30 °C a 41 °C (●). Datos relativos al valor DNA/masa medio a 30 °C.

mínimo y con rifampicina a 150 µg/ml en medio rico se obtuvieron un número de orígenes por cromosoma superior (4,3 y 4,0 respectivamente). Los resultados con cloranfenicol en medio mínimo pueden ser interpretados en el mismo sentido que ocurre en *E. coli*, ya que el cloranfenicol no parece inhibir la iniciación de la replicación al inicio del tratamiento en *S. typhimurium*. Estos valores de 2^n obtenidos en *S. typhimurium* son inferiores a los presentados para *E. coli*, a pesar de presentar ambas especies tiempos de generación similares (Tabla 7). Respecto a los porcentajes de inducción de la replicación, se alcanzó una mayor inducción en los cultivos en medio rico, aunque en todas las circunstancias estudiadas se superaron los valores de inducción obtenidos para *E. coli* en las mismas condiciones (Tabla 7).

De igual manera que en *E. coli*, se analizó la relación DNA/masa en *S. typhimurium* en cultivos exponenciales a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C, en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB (apartados 1 y 4.2.1 de Métodos). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 15. Los cultivos exponenciales mantuvieron una relación DNA/masa constante y con valores absolutos similares a lo largo del crecimiento y el cambio de temperatura llevó al aumento de DNA/masa de forma similar a la observada en *E. coli* (Figura 13).

1.1.3. HIR por acumulación de DNA en *B. subtilis*

Para estudiar la presencia de HIR en bacterias Gram positivas se escogió como organismo modelo *B. subtilis* y se utilizó la estirpe BG214. Se recogieron datos de acumulación de DNA en cultivos creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y medio rico LB, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C, añadiendo rifampicina, a 150 o 300 µg/ml, o cloranfenicol, a 200 o 250 µg/ml. Los resultados de acumulación obtenidos se muestran en la Figura 16 y los porcentajes de acumulación alcanzados se presentan en la Tabla 9. Las gráficas de acumulación del cultivo creciendo en medio rico muestran que la concentración de rifampicina a 150 µg/ml no fue suficiente para conseguir la inhibición de los inicios de la replicación (Figura 16, d), por lo que se aumentó la concentración hasta 300 µg/ml para conseguir el perfil de acumulación que se muestra en la Figura 16, e. En medio mínimo, la concentración estándar de rifampicina fue suficiente para conseguir la inhibición del inicio de la replicación (Figura 16, a), mientras que la concentración de 300 µg/ml provocó la degradación del DNA (datos no

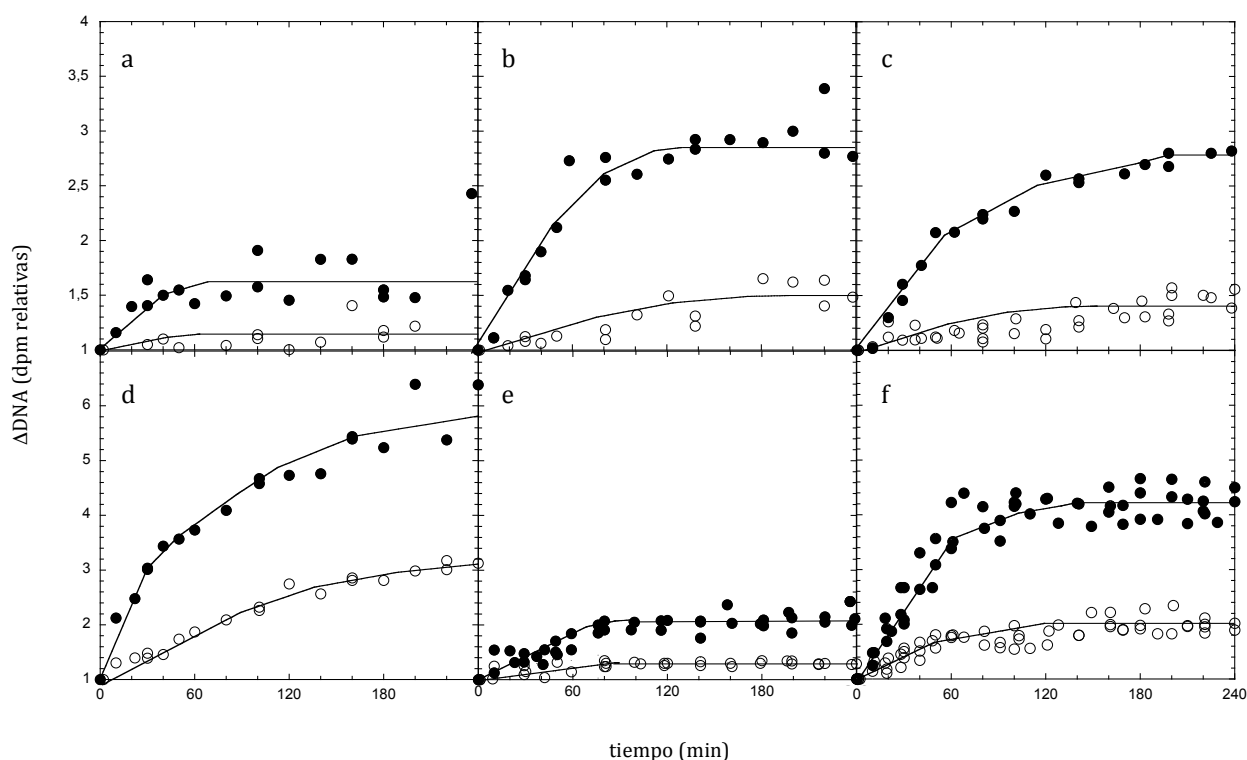


Figura 16. Acumulación de DNA en la estirpe BG214 de *B. subtilis* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a, b y c) y en medio rico LB (d, e y f) tras la adición de rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ (a y d) o 300 $\mu\text{g/ml}$ (e) o cloranfenicol a 250 $\mu\text{g/ml}$ (b) o 200 $\mu\text{g/ml}$ (c y f) a 30 °C (○) y junto con el cambio a 41 °C (●).

mostrados). La inhibición con cloranfenicol se obtuvo con el tratamiento a 200 $\mu\text{g/ml}$ en ambos medios de cultivo (Figura 16, c y f), consiguiendo el mismo resultado con concentraciones superiores (Figura 16, b).

En la Tabla 9 se presentan el número de orígenes por cromosoma (2^n) en crecimiento exponencial a 30 °C y el porcentaje de orígenes inducidos por el cambio de temperatura a 41 °C (i) en las distintas condiciones de crecimiento e inhibición analizadas en las que se detuvo la síntesis de DNA. El número de orígenes por cromosoma determinado, de igual forma

Tabla 9. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C ($\rightarrow 41$ °C), número de orígenes por cromosoma a 30 °C (orígenes) y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C (inducción) en la estirpe BG214 de *B. subtilis* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas. Se indica el tiempo de generación (τ) del cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C (n = número de cultivos analizados).

Medio de cultivo	Antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	Acumulación (%)		Orígenes (2^n)	Inducción ($i\%$)	τ 30 °C (min)	n
		30 °C	$\rightarrow 41$ °C				
MM9 casaa	Rif 150	14	55	1,31	35,81	103,4	1
	Cam 200	50	180	2,39	86,73		2
	Cam 250	55	200	2,58	93,69	1	
LB	Rif 150	210	480	-	-	44,3	1
	Rif 300	30	103	1,73	56,31		3
	Cam 200	100	320	4,92	109,95		4

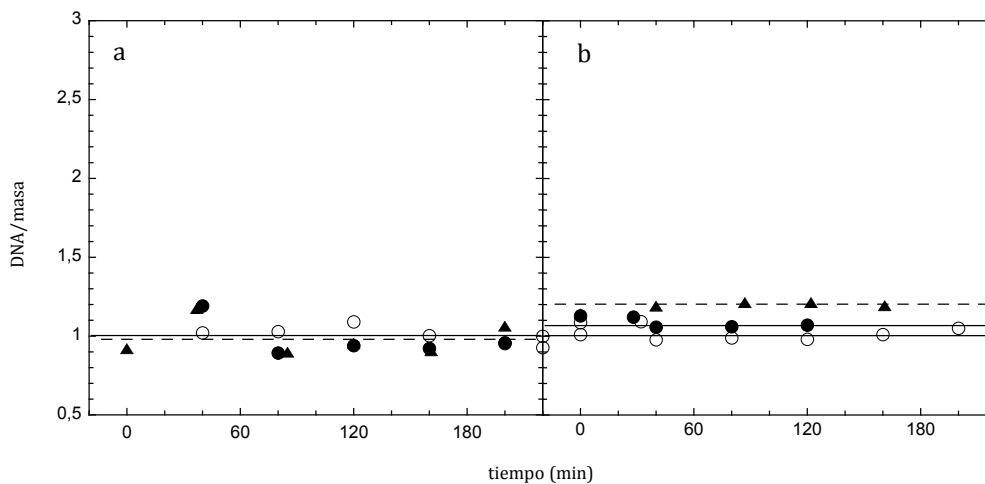


Figura 17. Relación DNA/masa en la estirpe BG214 de *B. subtilis* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos (a) y en medio rico LB (b) a 30 °C (○), a 41 °C (▲) y tras el cambio de 30 °C a 41 °C (●) relativa al valor medio obtenido a 30 °C en cada caso. Datos relativos al valor DNA/masa medio a 30 °C.

que en las especies anteriores (Tablas 7 y 8), es menor en el tratamiento con rifampicina (1,31 y 1,73 en medio mínimo y en medio rico, respectivamente) que con cloranfenicol (en torno a 2,50 en medio mínimo y 4,92 en medio rico), lo que indicaría un retraso en la acción del cloranfenicol sobre la inhibición de los inicios de replicación con respecto al efecto de la rifampicina. En ambos casos, tratamiento con rifampicina o con cloranfenicol, se obtienen valores para 2^n superiores en medio mínimo, que están en concordancia con la diferencia observada para los tiempos de generación de los cultivos en medio mínimo (103,4 minutos) y medio rico (44,3). Los valores 2^n obtenidos en *B. subtilis* son inferiores a los presentados para *E. coli* y *S. typhimurium* (Tablas 7 y 8). Con respecto al porcentaje de orígenes inducidos (*i*), los valores obtenidos en el tratamiento con rifampicina (35,81% y 56,31% en medio mínimo y en medio rico, respectivamente) son algo superiores a los obtenidos en *E. coli* y similares a los presentados para *S. typhimurium* (Tablas 7 y 8). El porcentaje de inducción en el tratamiento con cloranfenicol en *B. subtilis* está en torno al 90% en medio mínimo y supera el 100% en medio rico, lo que indica que todos los orígenes de replicación presentes podrían iniciar HIR; alcanzándose en esta especie valores superiores de inducción que los determinados en *E. coli* y *S. typhimurium* en el tratamiento con cloranfenicol (Tablas 7 y 8).

El análisis de la relación DNA/masa en *B. subtilis* se llevó a cabo en cultivos exponenciales a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C, en medio mínimo y medio rico, como se describió anteriormente para *E. coli* (apartados 1 y 4.2.1 de Métodos). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 17. Los cultivos exponenciales presentaron una relación DNA/masa constante a lo largo del crecimiento y con valores absolutos similares; en el caso del cambio de temperatura, la respuesta fue diferente a la de las anteriores especies analizadas, ya que no se observó el aumento en DNA/masa tras el cambio de temperatura (Figuras 13 Y 15).

1.1.4. HIR por acumulación de DNA en *V. cholerae*

Como modelo de organismo cuyo genoma está contenido en más de un cromosoma, se estudió la inducción de HIR en *V. cholerae*, una especie Gram negativa cuyo genoma está dividido en dos cromosomas de diferente tamaño y con diferente control del inicio de la replicación, aunque ambos cromosomas inician de manera coordinada pero no simultánea durante el ciclo celular (Egan *et al.*, 2004; Duigou *et al.*, 2006). Se estudió la acumulación de

DNA en la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* en medios de cultivo mínimos AB con casaminoácidos y M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C, y se detuvieron las nuevas iniciaciones de la replicación con rifampicina a 150 µg/ml o cloranfenicol a 200 µg/ml. En la Figura 18 se muestra la acumulación de DNA en las diferentes condiciones estudiadas, y en la Tabla 10 se recogen los porcentajes finales de acumulación. Excepto en medio rico, donde se observó degradación del DNA acumulado en el tratamiento con rifampicina (Figura 18, e), en el resto de los casos se observó la aparición de replications extras inducidas por estrés térmico, aunque en varias de las condiciones se produjeron pérdidas del DNA acumulado tras el cambio de temperatura con el paso del tiempo (Figura 18, c y d, símbolos llenos).

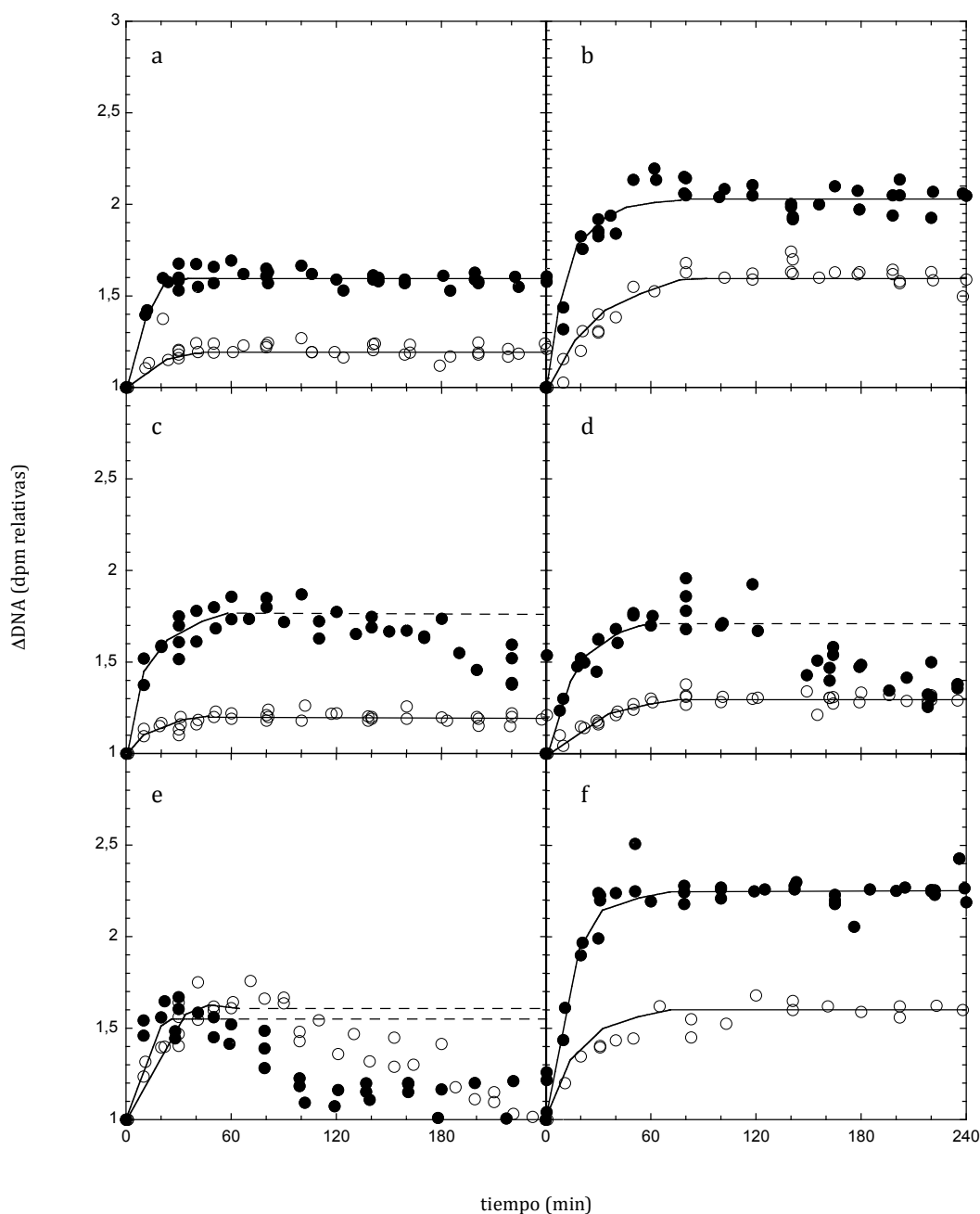


Figura 18. Acumulación de DNA en la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* creciendo en medio mínimo AB con casaminoácidos (a y b), en medio mínimo M9 con casaminoácidos (c y d) y en medio rico LB (e y f) tras la adición de rifampicina a 150 µg/ml (a, c y e) o cloranfenicol a 200 µg/ml (b, d y f) a 30 °C (○) y junto con el cambio a 41 °C (●).

Tabla 10. Porcentaje de acumulación de DNA a 30 °C y tras el cambio a 41 °C (→41 °C), número estimado* de orígenes por cromosoma a 30 °C (orígenes) y porcentaje de orígenes inducidos por el cambio a 41 °C (inducción) en la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* creciendo en medio mínimo AB con casaminoácidos, medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, cuantificados por inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas. Se indica el tiempo de generación (τ) del cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C (n = número de cultivos analizados). *Leer apartado 1.1.4 para detalles.

Medio de cultivo	Antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	Acumulación (%)		Orígenes (2^n)	Inducción (i%)	$\tau_{30^\circ\text{C}}$ (min)	n
		30 °C	→41 °C				
AB casaa	Rif 150	20	60	1,45	33,47	40,5	4
	Cam 200	60	105	2,79	28,19		2
MM9 casaa	Rif 150	20	78	1,45	48,48	44,6	3
	Cam 200	30	70	1,73	30,90		2
LB	Cam 200	60	125	2,79	40,70	30,8	3

En el caso de *V. cholerae* no es válido el cálculo del número de orígenes por cromosoma (2^n) a partir de los datos de acumulación de DNA a 30 °C, ya que su genoma está repartido en dos cromosomas y ambos contribuirán a la acumulación final (apartado 4.2.2 de Métodos). Sin embargo, con el fin de cuantificar el nivel de inducción de la replicación por estrés térmico en *V. cholerae*, el análisis de la acumulación de DNA se llevo a cabo de igual forma que en las especies anteriores (apartados 4.2.2 y 4.2.3 de Métodos). En la Tabla 10 se presentan los valores así obtenidos para 2^n y el porcentaje de orígenes inducidos (i) por el cambio de temperatura. Los valores de 2^n obtenidos fueron menores con rifampicina que con cloranfenicol, como en las especies anteriormente descritas. En todos los casos se obtuvieron valores para 2^n menores que en *E. coli* en las mismas condiciones de crecimiento e inhibición (Tabla 7). El porcentaje de inducción de la replicación calculado va desde 28,19% a 48,48%, según el medio de cultivo y el tratamiento inhibitor, porcentajes similares a los obtenidos para *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis* (exceptuando los valores de inducción obtenidos en *B. subtilis* con cloranfenicol) (Tablas 7, 8 y 9).

La relación DNA/masa se analizó en *V. cholerae* en cultivos exponenciales a 30 °C, a 41 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C, en los diferentes medios de cultivo utilizados, como se describió anteriormente para *E. coli* (apartados 1 y 4.2.1 de Métodos). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19. Los cultivos exponenciales a 30 °C y 41 °C presentaron una relación DNA/masa constante a lo largo del crecimiento, en torno a valores medios

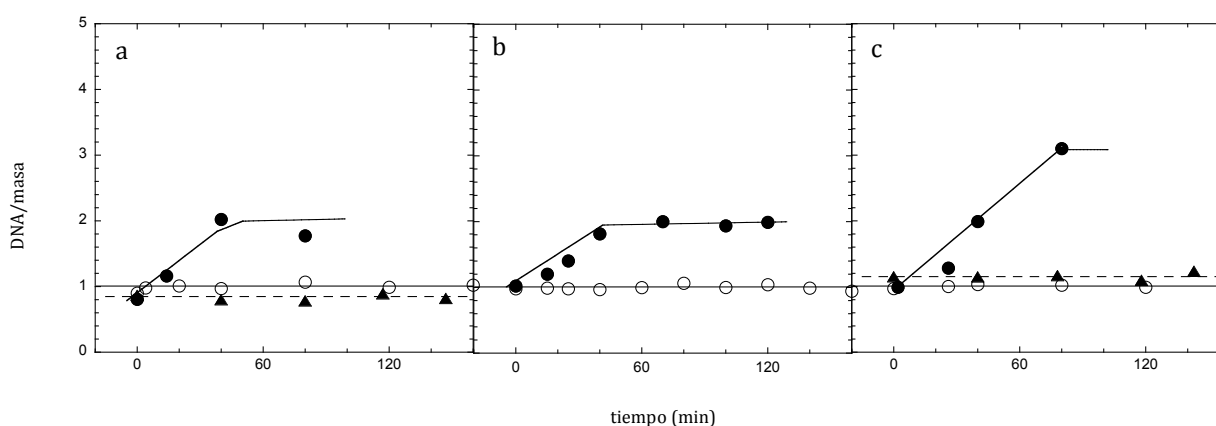


Figura 19. Relación DNA/masa en la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* creciendo en medio mínimo AB con casaminoácidos (a), medio mínimo M9 con casaminoácidos (b) y medio rico LB (c) a 30 °C (○), a 41 °C (▲) y tras el cambio de 30 °C a 41 °C (●). Datos relativos al valor DNA/masa medio a 30 °C.

absolutos iguales para ambos cultivos, en todos los medios analizados. El cambio de temperatura a 41 °C llevó al aumento de la relación DNA/masa, de manera similar a lo observado en *E. coli* y *S. typhimurium* (Figuras 13 y 15). Sin embargo, en *V. cholerae* los valores máximos alcanzados son superiores a los descritos anteriormente, duplicándose en los cultivos en medios mínimos, AB con casaminoácidos y M9 con casaminoácidos, y llegando a triplicarse en medio rico LB.

1.2. Análisis de HIR por citometría de flujo y microscopía

Todas las especies bacterianas estudiadas en el apartado 1.1 de Resultados inducen ciclos de replicación extras después de ser sometidas a estrés térmico. Por tanto, la replicación termoinducida, HIR, no es exclusiva de *E. coli* y podría considerarse como un mecanismo generalizado en el mundo bacteriano. Dados los elevados porcentajes de inducción de la replicación por estrés térmico detectados por acumulación de DNA para las diferentes bacterias analizadas, se complementó el análisis de HIR utilizando las técnicas de citometría de flujo y microscopía de contraste de fase y epifluorescencia descritas en los apartados 10 y 14 de Métodos, respectivamente. La citometría de flujo permite cuantificar el número de cromosomas por célula en el cultivo objeto de estudio, siendo posible determinar si las replications HIR dan lugar a un número mayor de cromosomas por célula al final de la inducción con respecto al cultivo mantenido a 30 °C. La microscopía de contraste de fase y epifluorescencia permite observar la morfología celular y la distribución de los nucleoides en la célula, y ayudaría a corroborar el aumento del número de cromosomas por HIR.

1.2.1. HIR por citometría de flujo y microscopía en *E. coli*

En la Figura 20 se presentan los histogramas de citometría de flujo obtenidos para la estirpe AB1157 de *E. coli*, creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras una, dos, tres o cuatro horas de la inhibición de los inicios de replicación con rifampicina a 150 µg/ml y de la división celular con cefalexina a 50 µg/ml, en cultivos en crecimiento exponencial a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C. Con tan sólo una hora de tratamiento ya se aprecia prácticamente el perfil definitivo del número de cromosomas por célula en el cultivo, aunque es después de cuatro horas de tratamiento cuando la distribución de células en torno a un número entero de cromosomas aparece más definida. Después de cuatro horas de tratamiento, se observa un aumento en el porcentaje de células con ocho cromosomas en el cultivo sometido a cambio de temperatura, que podría justificar la replicación HIR observada

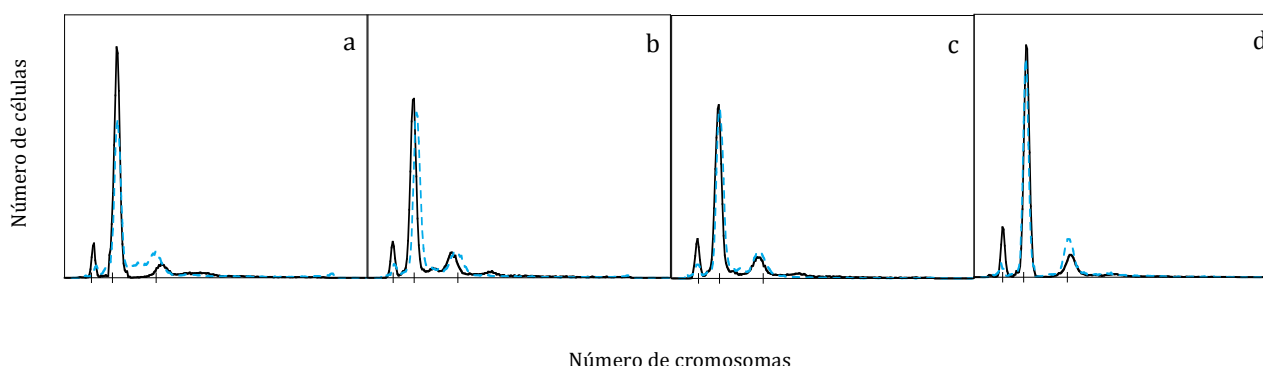


Figura 20. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos tras una (a), dos (b), tres (c) o cuatro horas (d) de la adición de rifampicina a 150 µg/ml junto con cefalexina a 50 µg/ml a 30 °C (línea sólida negra) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (línea azul discontinua).

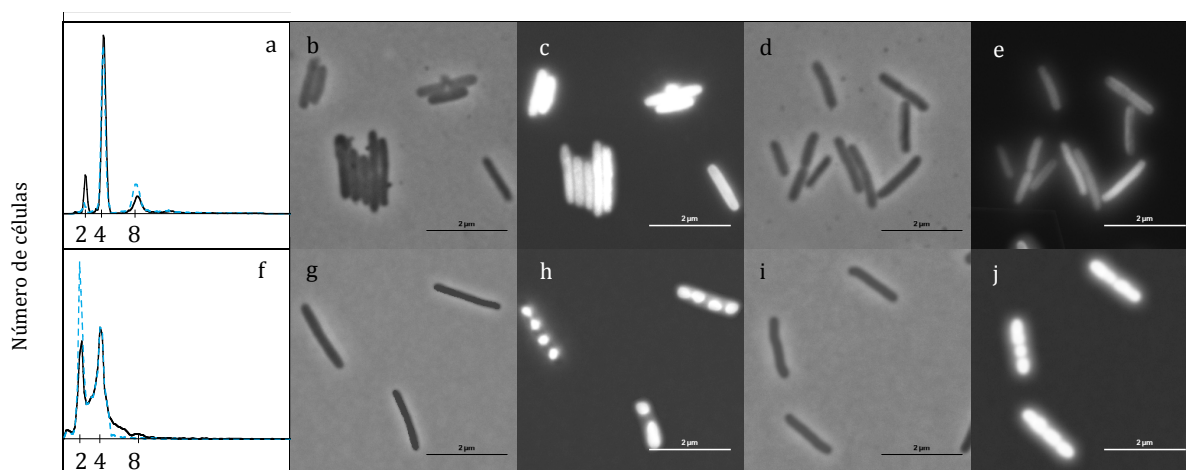
Tabla 11. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y medio rico LB, tras cuatro horas en diferentes condiciones de inhibición del inicio de la replicación, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C (→41 °C; ND = no determinado).

Medio de cultivo	Antibióticos (µg/ml)	Cromosomas/célula		Nucleoides/célula	
		30 °C	→41 °C	30 °C	→41 °C
MM9 casaa	Rif 150 Cpx 50	4,29	4,89	ND	ND
	Cam 200 Cpx 50	3,34	3,13	3,12	3,57
LB	Rif 150 Cpx 50	4,67	5,08	ND	ND
	Cam 200 Cpx 50	ND	ND	2,64	3,07

mediante acumulación de DNA en *E. coli* (Figura 20, d). Esta variación en la distribución de los cromosomas por célula detectada por citometría supone un aumento del 14 % en el número medio de cromosomas por célula, pasando de 4,29 en el cultivo a 30 °C a 4,89 en el cultivo tras el cambio de temperatura a 41 °C (Tabla 11). Este aumento del 14 % detectado por citometría es menor al esperado considerando el valor del porcentaje de orígenes inducido determinado por acumulación de DNA, que en la mismas condiciones, medio mínimo e inhibición por rifampicina 150 µg/ml, alcanza un 24,97 % (Tabla 7).

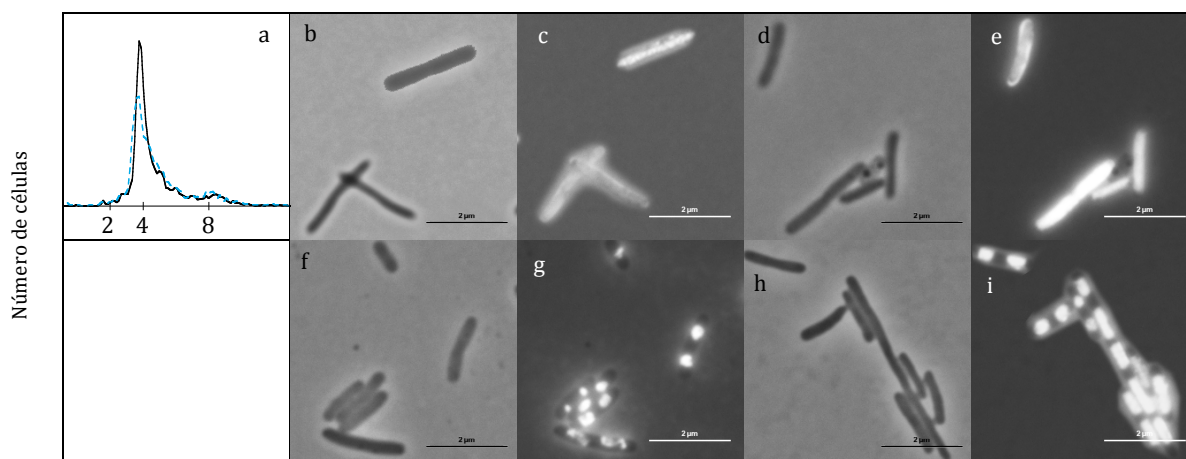
En la fila superior de la Figura 21 se muestran las imágenes de microscopía obtenidas al final de las cuatro horas de tratamiento con rifampicina 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml acompañadas del perfil de citometría en ese momento. Se puede apreciar la morfología celular a 30 °C y tras el cambio a 41 °C (Figura 21, b y d, respectivamente) y la distribución de nucleoides en las mismas condiciones (Figura 21, c y e, respectivamente). No fue posible calcular el número medio de nucleoides por célula a través de las imágenes de microscopía, al no aparecer nucleoides definidos tras el tratamiento con rifampicina.

La Figura 21 muestra el histograma de citometría obtenido en AB1157 tras cuatro horas de la inhibición de los inicios con cloranfenicol 200 µg/ml e inhibición de la división con cefalexina a 50 µg/ml, en cultivos en medio mínimo M9 con casaminoácidos (Figura 21, f). La distribución de los cromosomas por célula en el cultivo a 30 °C y el sometido a cambio de temperatura no



Número de cromosomas

Figura 21. Distribución de cromosomas por célula (a, f), morfología celular (b, d, g, i) y distribución de nucleoides (c, e, h, j) en *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (a, b, c, d, e) o cloranfenicol a 200 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (f, g, h, i, j) a 30 °C (a y f, línea sólida negra; b, c, g, h) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a y f, línea azul discontinua; d, e, i, j) (barra de escala = 2 µm).



Número de cromosomas

Figura 22. Distribución de cromosomas por célula (a), morfología celular (b, d, f, h) y distribución de nucleoides (c, e, g, i) en *E. coli* AB1157 creciendo en medio rico LB, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (a, b, c, d, e) o cloranfenicol a 200 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (f, g, h, i) a 30 °C (a, línea sólida negra; b, c, f, g) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a, línea azul discontinua; d, e, h, i) (barra de escala = 2 µm).

es la misma, observándose una reducción en el número medio de cromosomas por célula de 3,34 a 30 °C a 3,13 tras el cambio a 41 °C (Tabla 11), que no se corresponde con la inducción de la replicación observada por acumulación de DNA (Tabla 7). Los apartados c y d de la misma figura muestran la morfología celular a 30 °C y tras el cambio de temperatura, respectivamente, y en las imágenes mostradas en los apartados e y f se aprecia la distribución de nucleoides en las células a 30 °C y tras cambio a 41 °C, respectivamente, apreciándose células con dos y cuatro nucleoides. En las imágenes del cultivo tratado con cloranfenicol como inhibidor de los inicios de replicación fue posible cuantificar el número de nucleoides por célula, datos que se incluyen en la Tabla 11 y que muestran un ligero aumento en la cantidad de DNA por célula.

En la Figura 22 se muestra la distribución de cromosomas por célula en AB1157 crecida en medio rico LB, tras cuatro horas de adición de rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml, a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C (Figura 22, fila superior). La distribución de cromosomas por célula se asemeja al perfil obtenido en el mismo tratamiento en medio mínimo con casaminoácidos. El número medio de cromosomas por célula, que sólo pudo ser calculado por citometría de flujo (Tabla 11), muestra una tendencia similar a lo observado con el mismo tratamiento en medio mínimo. Se alcanzó un aumento del 9 % del número medio de cromosomas por célula en el cultivo tras el cambio de temperatura (pasando de 4,67 a 30 °C a 5,08 tras el cambio a 41 °C), menor a lo esperado considerando los valores de inducción de HIR por acumulación de DNA (Tabla 7).

Por último, para los cultivos creciendo en medio rico LB, tratados con cloranfenicol a 200 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml, aunque no se consiguieron histogramas definidos para la distribución de cromosomas por célula, sí se analizaron imágenes de microscopía. En la Figura 22 se muestra la morfología de las células y la distribución de los nucleoides en cultivos creciendo a 30 °C (f y g, respectivamente) y tras el cambio a 41 °C (h e i, respectivamente) después de cuatro horas de tratamiento. Se cuantificó una media de nucleoides por célula de

2,64 a 30 °C y 3,07 tras el cambio de temperatura (Tabla 11), que supone un aumento del 16 % tras el cambio de temperatura.

1.2.2. HIR por citometría de flujo y microscopía en *S. typhimurium*

Para la estirpe LT2 de *S. typhimurium* se obtuvo por citometría de flujo la distribución del número medio de cromosomas por célula a partir de muestras procedentes de cultivos creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos o en medio rico LB, tratados con rifampicina 150 µg/ml o cloranfenicol 200 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml, durante una, dos, tres y cuatro horas, a 30 °C y tras el cambio a 41 °C. En la Figura 23 se muestran los histogramas de citometría obtenidos en cultivos creciendo en medio mínimo. En todas las circunstancias los perfiles finales se definen prácticamente tras la primera hora de tratamiento,

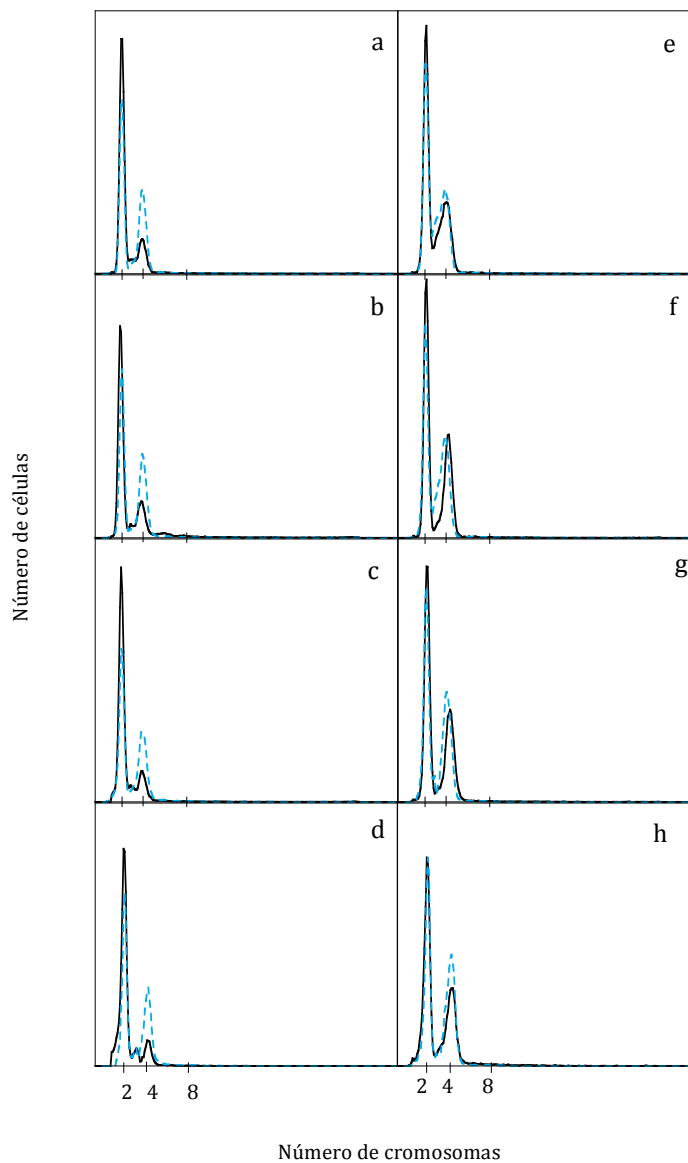
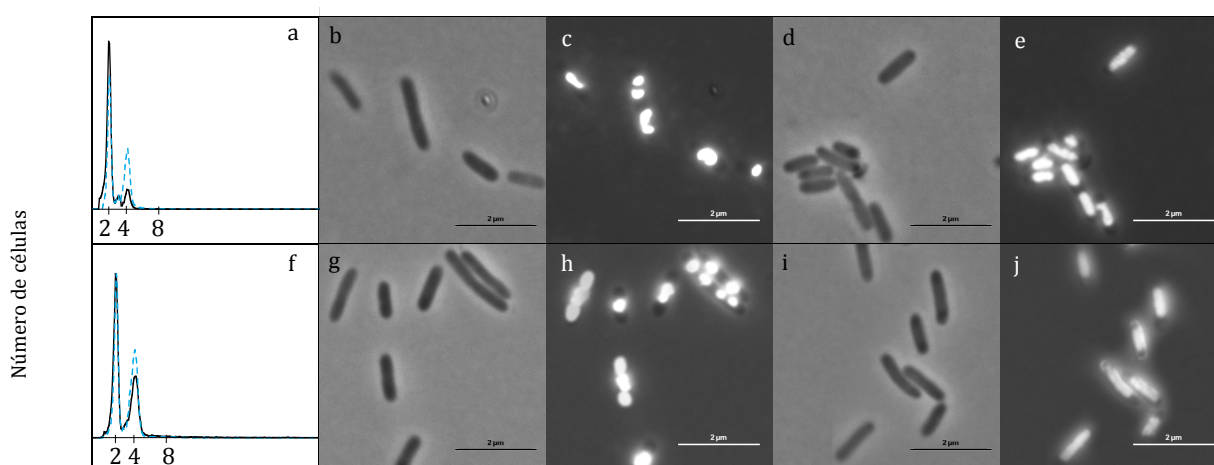


Figura 23. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos tras una (a, e), dos (b, f), tres (c, g) o cuatro horas (d, h) de la adición de rifampicina a 150 µg/ml (a, b, c, d) o cloranfenicol 200 µg/ml (e, f, g, h) junto con cefalexina a 50 µg/ml a 30 °C (línea sólida negra) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (línea azul discontinua).

Tabla 12. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y medio rico LB, tras cuatro horas en diferentes condiciones de inhibición del inicio de la replicación, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C (→41 °C; ND = no determinado).

Medio de cultivo	Tratamiento (µg/ml)	Cromosomas/célula		Nucleoides/célula	
		30 °C	→41 °C	30 °C	→41 °C
MM9 casaa	Rif 150 Cpx 50	2,32	2,92	2,13	2,44
	Cam 200 Cpx 50	2,80	3,02	1,92	ND
LB	Rif 150 Cpx 50	4,19	4,28	3,18	3,27
	Cam 200 Cpx 50	4,09	4,22	3,14	ND

aunque es a las cuatro horas cuando se aprecian los picos más definidos y estables. La degradación de DNA observada en el tratamiento con cloranfenicol en medio mínimo, en el análisis de la acumulación de DNA de *S. typhimurium* (Figura 14), no es detectada por citometría de flujo, obteniéndose con cloranfenicol distribuciones similares a las del tratamiento con rifampicina. Tanto por inhibición con rifampicina como con cloranfenicol, después de cuatro horas de tratamiento se observa un aumento en la proporción de células con cuatro cromosomas en el cultivo con cambio de temperatura con respecto al cultivo a 30 °C (Figura 23, d y h), lo que lleva al aumento del número medio de cromosomas por célula del 24 % y 7 %, respectivamente, tras el cambio de temperatura (Tabla 12). Igual que en *E. coli*, el aumento de cromosomas por célula está por debajo del esperado considerando los valores de inducción determinados mediante la acumulación de DNA (Figura 14, Tabla 8). En la Figura 24 se muestra la morfología celular y la distribución de nucleoides de las mismas células después de cuatro horas de tratamiento con rifampicina y cefalexina (Figura 24, fila superior) o cloranfenicol y cefalexina (fila inferior) a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C. En la misma Figura 24 se incluyen los histogramas de citometría correspondientes (a, f). En los casos en los que fue posible, se calculó el número medio de nucleoides por célula a partir de las imágenes de microscopía. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 12, donde se observa un ligero incremento en este parámetro para en los cultivos tratados con rifampicina tras el cambio de temperatura (14 %).



Número de cromosomas

Figura 24. Distribución de cromosomas por célula (a, f), morfología celular (b, d, g, i) y distribución de nucleoides (c, e, h, j) en *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (a, b, c, d, e) o cloranfenicol a 200 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (f, g, h, i, j) a 30 °C (a y f, línea sólida negra; b, c, g, h) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a y f, línea azul discontinua; d, e, i, j) (barra de escala = 2 µm).

La Figura 25 muestra los histogramas de citometría de flujo obtenidos para cultivos de *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio rico LB, en las mismas condiciones y con los mismos tratamientos que se presentan en medio mínimo. Después de las cuatro horas analizadas, tanto en el tratamiento con rifampicina y cefalexina, como con cloranfenicol y cefalexina, se detecta un ligero aumento en la proporción de células con cuatro cromosomas en los cultivos tras cambio de temperatura, que da lugar a un pequeño incremento en el número medio de cromosomas por célula (2-3 %) (Tabla 12). La Figura 26 muestra las imágenes de microscopía, junto con los histogramas de citometría, para los mismos cultivos analizados por citometría, tras cuatro horas de tratamiento con rifampicina y cefalexina (Figura 26, fila superior) o cloranfenicol y cefalexina (fila inferior). Se cuantificó el número medio de nucleoides por célula a partir de las imágenes de microscopía, en los casos en los que fue posible, y los datos obtenidos se presentan en la Tabla 12. El aumento de la cantidad de nucleoides por célula determinado es muy bajo (2 %), en comparación con la inducción detectada por acumulación de DNA (Figura 14, Tabla 8).

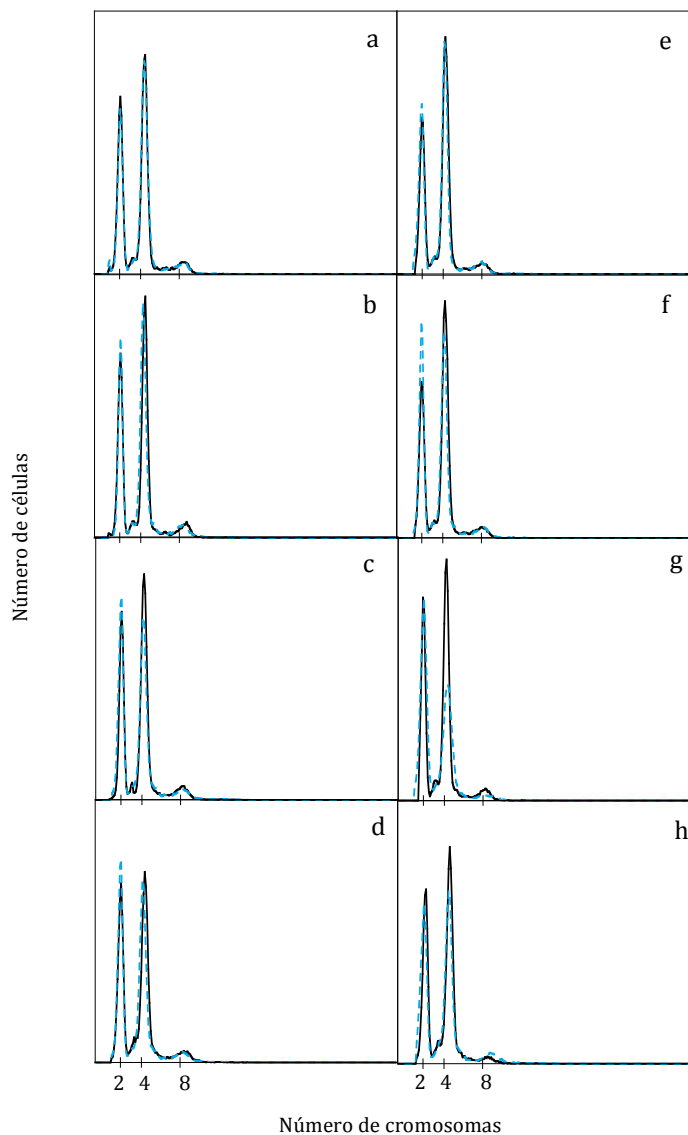


Figura 25. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio rico LB tras una (a, e), dos (b, f), tres (c, g) o cuatro horas (d, h) de la adición de rifampicina a 150 µg/ml (a, b, c, d) o cloranfenicol 200 µg/ml (e, f, g, h) junto con cefalexina a 50 µg/ml a 30 °C (línea sólida negra) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (línea azul discontinua).

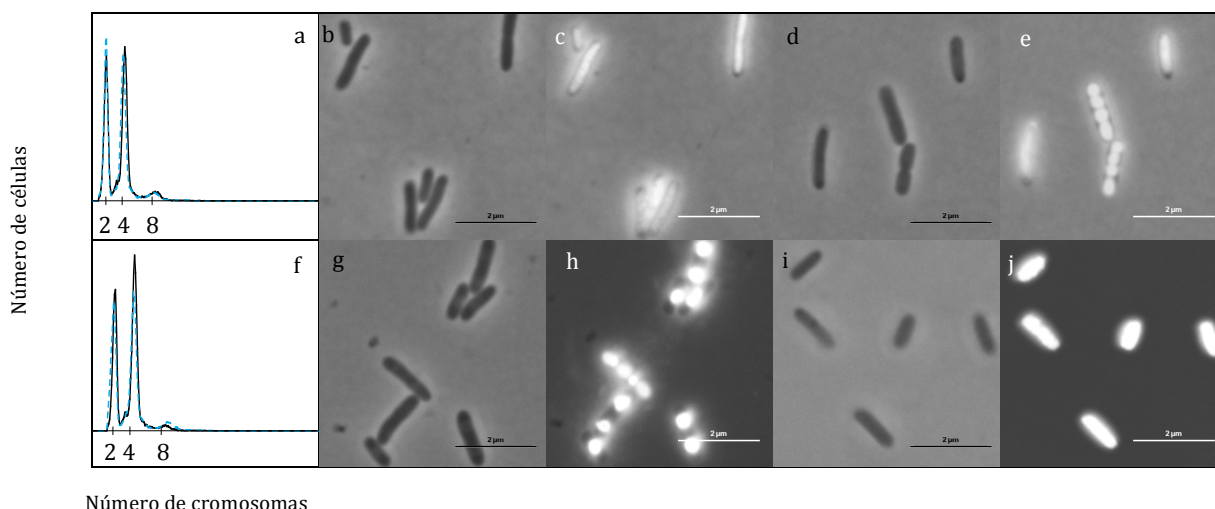


Figura 26. Distribución de cromosomas por célula (a, f), morfología celular (b, d, g, i) y distribución de nucleoides (c, e, h, j) en *S. typhimurium* LT2 creciendo en medio rico LB, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (a, b, c, d, e) o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (f, g, h, i, j) a 30 $^{\circ}\text{C}$ (a y f, línea sólida negra; b, c, g, h) y junto con el cambio de temperatura a 41 $^{\circ}\text{C}$ (a y f, línea azul discontinua; d, e, i, j) (barra de escala = 2 μm).

1.2.3. HIR por citometría de flujo y microscopía en *B. subtilis*

En el caso de *B. subtilis* los tratamientos para el análisis de la replicación por citometría de flujo no incorporaron cefalexina, pues la rifampicina tiene efecto bactericida en los dos primeros minutos de tratamiento (Coote *et al.*, 1973), y el cloranfenicol inhibe simultáneamente el inicio de la replicación del DNA y la división celular en esta especie (Séror *et al.*, 1994; Ogura *et al.*, 2001). Se analizaron, por citometría y microscopía, cultivos de la estirpe BG214 de *B. subtilis* creciendo tanto en medio mínimo M9 con casaminoácidos, como en medio rico LB, tras el tratamiento con rifampicina a 300 $\mu\text{g/ml}$ o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$, a 30 $^{\circ}\text{C}$ y tras el cambio a 41 $^{\circ}\text{C}$.

En medio mínimo se determinó el número medio de cromosomas por célula mediante citometría de flujo y el de nucleoides por microscopía, después de cinco horas de tratamiento con cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 27 y en la Tabla 13. El número de cromosomas por célula obtenido por citometría muestra valores de 5,14 cromosomas por célula a 30 $^{\circ}\text{C}$ y de 5,42 tras el cambio de temperatura, un incremento menor al esperado considerando el nivel de inducción del 86,73 % determinado por acumulación de DNA en estas condiciones (Figura 16, Tabla 9). Por microscopía se observaron células alargadas y formando cadenas, en las que con el recuento de nucleoides se obtuvieron valores inferiores a los de citometría (3,84 a 30 $^{\circ}\text{C}$ y 3,34 tras el cambio a 41 $^{\circ}\text{C}$). Teniendo en cuenta que el cloranfenicol puede provocar coalescencia de los cromosomas, podría ser la causa de la subestimación del número de cromosomas por célula en el recuento de nucleoides por microscopía (Vanhelvoort *et al.*, 1996; Zimmerman y Murphy, 2001). El tratamiento con rifampicina en medio mínimo en esta especie no produjo histogramas de citometría bien resueltos.

En medio rico se pudo obtener la distribución del número de cromosomas por célula por citometría con rifampicina a 300 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 28, fila superior), aunque después de 20 horas desde el inicio del tratamiento los histogramas no aparecen totalmente resueltos. En este caso,

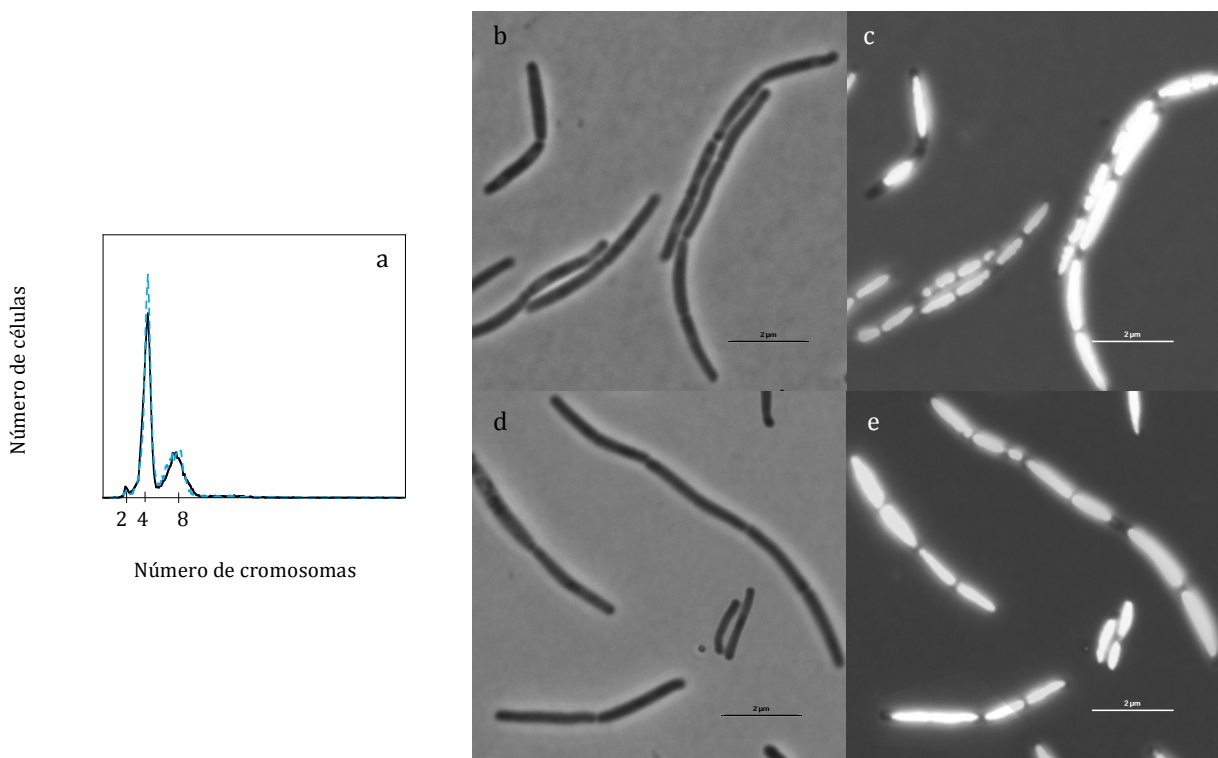


Figura 27. Distribución de cromosomas por célula (a), morfología celular (b, d) y distribución de nucleoides (c, e) en *B. subtilis* BG214 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras cinco horas de la adición de cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$ a 30 °C (a, línea sólida negra; b, c) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a, línea azul discontinua; d, e) (barra de escala = 2 μm).

la distribución de cromosomas por célula en el cultivo tras el cambio a 41 °C muestra un mayor porcentaje de células con dos cromosomas que a 30 °C, disminuyendo por tanto los valores medios determinados tras el cambio de temperatura (Tabla 13). Los valores medios de nucleoides por célula obtenidos por microscopía se recogen en la Tabla 13 y muestran igualmente una bajada después del cambio de temperatura. Los resultados obtenidos con rifampicina por acumulación de DNA parecían indicar que este antibiótico es más eficaz que el cloranfenicol para inhibir los inicios de replicación (Tabla 9); con los resultados obtenidos por citometría se muestra que la rifampicina, quizá por su efecto bactericida, afecta también a la elongación de la replicación en *B. subtilis*, impidiendo la resolución de los cromosomas y dificultando su análisis por citometría.

Tabla 13. Número medio de cromosomas por célula y de nucleoides por célula obtenidos por citometría de flujo y microscopía, respectivamente, en *B. subtilis* BG214 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y medio rico LB, tras cinco o veinte horas en diferentes condiciones de inhibición del inicio de la replicación, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C (\rightarrow 41 °C; ND = no determinado).

Medio de cultivo	Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	Cromosomas/célula		Nucleoides/célula	
		30 °C	\rightarrow 41 °C	30 °C	\rightarrow 41 °C
MM9 casaa	Cam 200 5 h	5,14	5,42	3,81	3,34
LB	Rif 300 20 h	4,67	4,29	4,00	3,33
	Cam 200 5 h	4,65	4,53	3,66	3,14

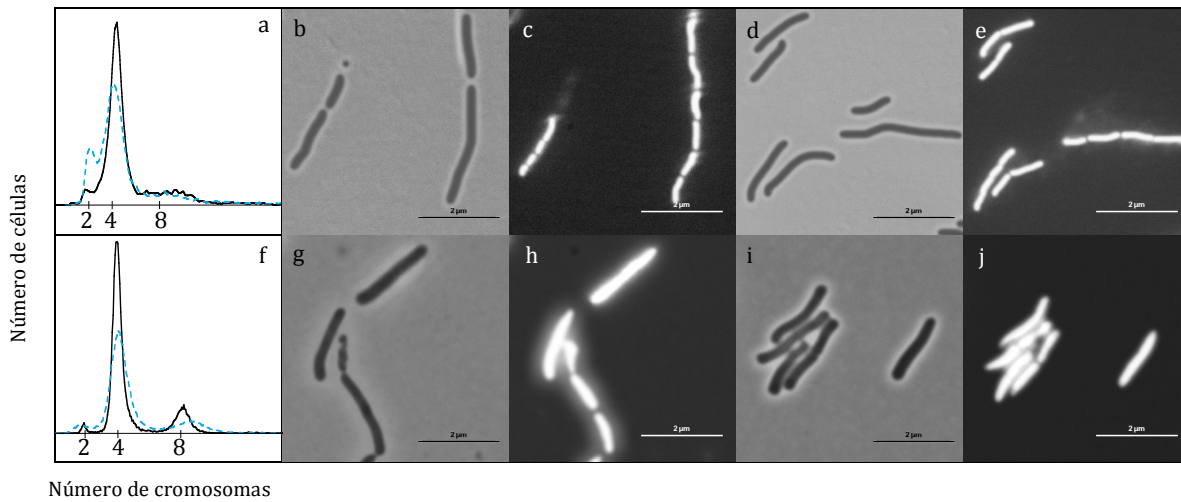


Figura 28. Distribución de cromosomas por célula (a, f), morfología celular (b, d, g, i) y distribución de nucleoides (c, e, h, j) en *B. subtilis* BG214 creciendo en medio rico LB, tras veinte horas de la adición de rifampicina a 300 µg/ml (fila superior) o cloranfenicol a 200 µg/ml (fila inferior) a 30 °C (a y f, línea sólida negra; b, c, g, h) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a y f, línea azul discontinua; d, e, i, j) (barra de escala = 2 µm).

En la fila inferior de la Figura 28 se muestran el histograma de citometría y las imágenes de microscopía de *B. subtilis* en medio rico LB, tras la inhibición con cloranfenicol, a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. El número medio de cromosomas por célula obtenido por microscopía, 3,66 para 30 °C y 3,14 tras el cambio de temperatura, de nuevo subestima el valor obtenido por citometría, 4,65 y 4,53 respectivamente (Tabla 13). En ambos casos, el número decrece tras el cambio de temperatura, a pesar de que la inducción de HIR calculada por acumulación de DNA en estas condiciones fue la más elevada de las cuantificadas (Tabla 9).

1.2.4. HIR por citometría de flujo y microscopía en *V. cholerae*

En el estudio de *V. cholerae* por citometría el parámetro analizado es genomas por célula, ya que no es posible distinguir la aportación de cada uno de sus dos cromosomas en los histogramas. En la Figura 29 se presentan los histogramas de citometría y las imágenes de microscopía obtenidos para la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras la adición de diferentes antibióticos para inhibir los inicios de replicación y la división celular, a 30 °C y junto con el cambio de temperatura a 41 °C. En la fila superior de la figura se muestran los resultados para el tratamiento con rifampicina 150 µg/ml y cefalexina 50 µg/ml, tratamiento habitual empleado en *E. coli*, pero que en el caso de *V. cholerae* no es suficiente para definir la cantidad de genomas por célula después de cuatro horas de incubación, posiblemente debido a la diferente sensibilidad de cada uno de los dos cromosomas de la bacteria a la rifampicina. En estas condiciones, el número medio de copias de genomas por célula a 30 °C y tras el cambio de temperatura muestra una disminución en el número de genomas (Tabla 14). Sí se consiguió un histograma de citometría definido en el tratamiento con cloranfenicol a 200 µg/ml y sin adición de cefalexina, que muestra un aumento en el número de células con ocho copias del genoma después del cambio de temperatura. Este aumento se refleja en el número medio de genomas por célula, que muestra un incremento de 3,16 a 30 °C a 3,48 después del cambio a 41 °C (Tabla 14), y que

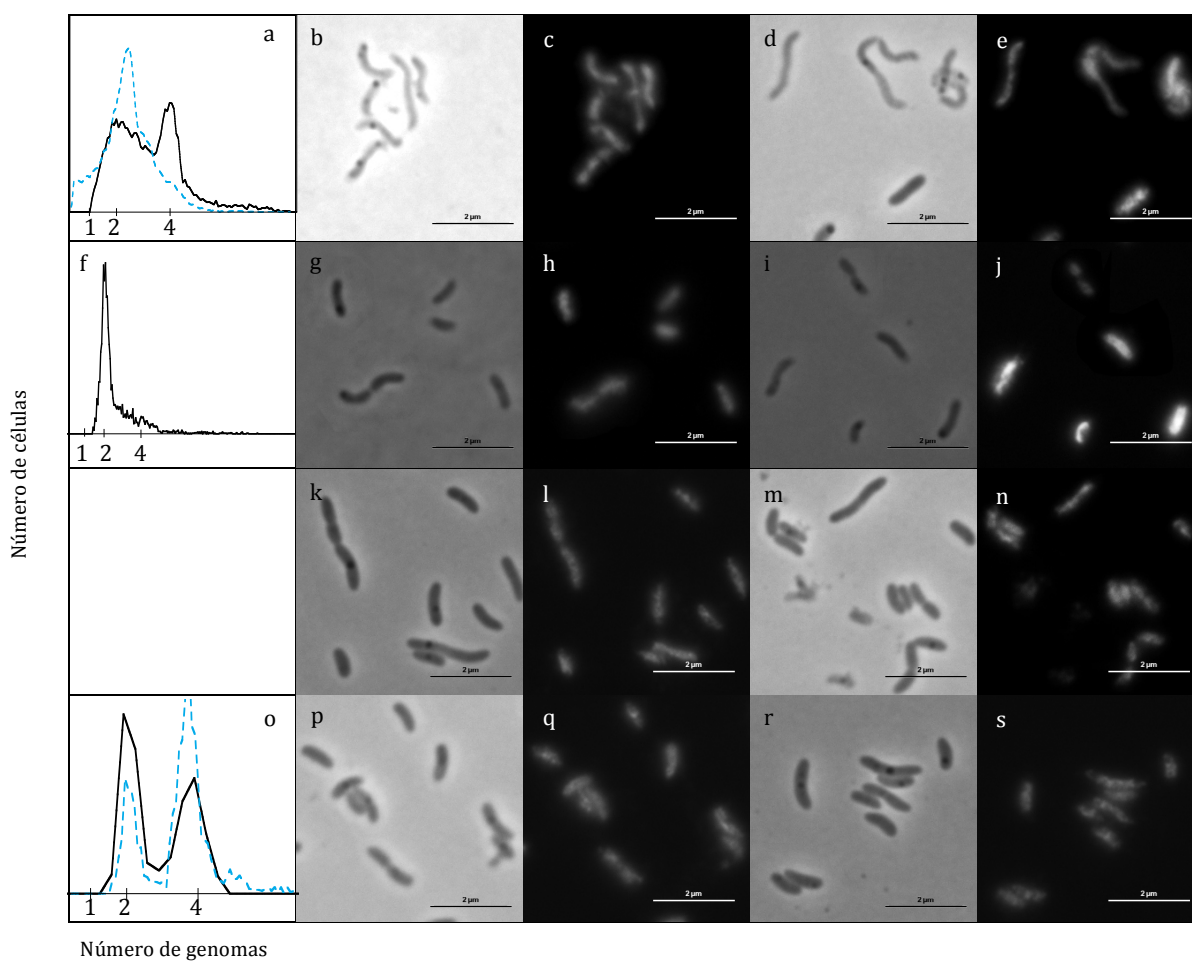


Figura 29. Distribución de genomas por célula (a, f, o), morfología celular (b, d, g, i, k, m, p, r) y distribución de nucleoides (c, e, h, j, l, n, q, s) en *V. cholerae* ALO2495 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (a, b, c, d, e), rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ (f, g, h, i, j), cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ (k, l, m, n) o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$ (o, p, q, r, s), a 30 °C (a, f y o, línea sólida negra; b, c, g, h, k, l, p, q) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a, f y o, línea azul discontinua; d, e, i, j, m, n, r, s) (barra de escala = 2 μm).

Tabla 14. Número medio de genomas por célula obtenidos por citometría de flujo en *V. cholerae* ALO2495 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos y medio rico LB, tras cuatro horas en diferentes condiciones de inhibición del inicio de la replicación, a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C ($\rightarrow 41$ °C).

Medio de cultivo	Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	Genomas/célula	
		30 °C	$\rightarrow 41$ °C
MM9 casaa	Rif 150 Cpx 50	2,87	2,22
	Cam 200	3,16	3,48
LB	Rif 150 Cpx 50	5,63	6,39
	Cam 200	5,65	6,07

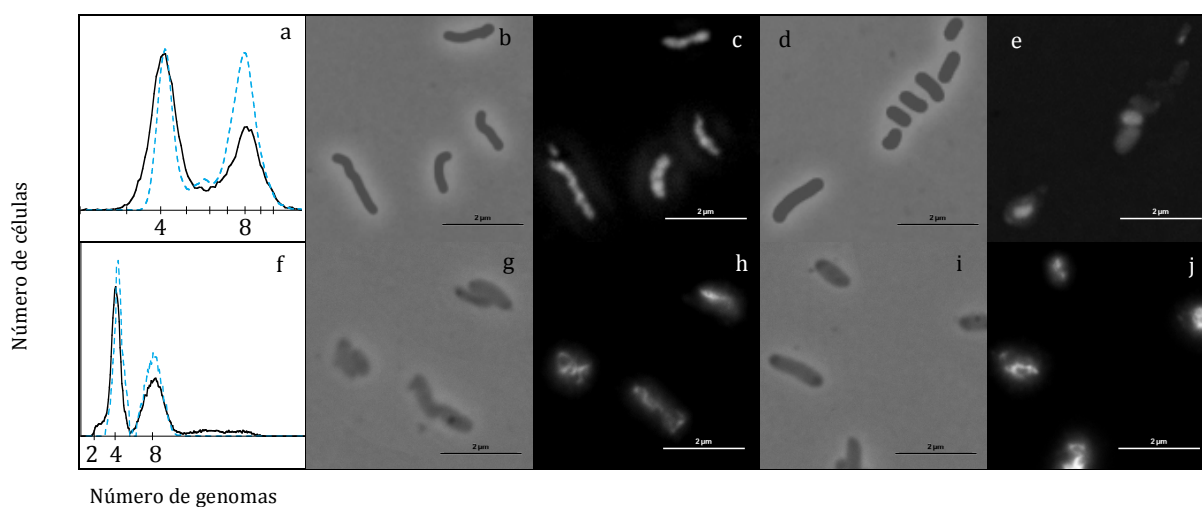


Figura 30. Distribución de genomas por célula (a, f), morfología celular (b, d, g, i) y distribución de nucleoides (c, e, h, j) en *V. cholerae* ALO2495 creciendo en medio rico LB, tras cuatro horas de la adición de rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (a, b, c, d, e) o cloranfenicol a 200 µg/ml (f, g, h, i, j) a 30 °C (a y f, línea sólida negra; b, c, g, h) y junto con el cambio de temperatura a 41 °C (a y f, línea azul discontinua; d, e, i, j) (barra de escala = 2 µm).

supone un aumento del 10 % frente al 30,90 % de inducción obtenido por acumulación de DNA (Tabla 10). En todos los casos estudiados las imágenes de microscopía muestran una morfología celular normal y una distribución de nucleoides ocupando todo el eje axial de la célula, lo que no permite una estimación del número de nucleoides por célula. Incluso tras el tratamiento con cloranfenicol, que suele llevar a una mejor definición de los nucleoides, se obtienen imágenes que impiden el cálculo del número medio de nucleoides por célula.

Para *V. cholerae* creciendo en medio rico LB, se obtuvo la distribución de copias de genomas por célula, a partir de muestras a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, por tratamiento con rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (Figura 30, a), y con cloranfenicol a 200 µg/ml (Figura 30, f). El número medio de genomas por célula obtenido se presenta en la Tabla 14. En ambos casos se observa un incremento del número de genomas tras el cambio de temperatura, en un 13,49 % y un 7 % con rifampicina y cefalexina y con cloranfenicol, respectivamente. El porcentaje de inducción de la replicación determinado por acumulación de DNA tras inhibición con cloranfenicol fue del 40,70 % (Figura 18, Tabla 10), superior a la obtenida por citometría. Las imágenes de microscopía de las muestras analizadas por citometría se muestran en la Figura 30, con rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml (Figura 30, fila superior) o cloranfenicol a 200 µg/ml (fila inferior). A diferencia del resto de especies analizadas, en medio rico las células de *V. cholerae* mostraron un ligero aumento de su diámetro después del cambio de temperatura. No fue posible determinar el número de copias de nucleoides por célula a partir de las imágenes de microscopía con ninguno de los dos tratamientos.

El análisis por citometría de *V. cholerae* creciendo en medio mínimo AB con casaminoácidos no dio resultados aceptables (datos no mostrados).

1.3. Análisis de sitios SIDD en los orígenes de replicación cromosómica

Bacterias, arqueas y eucariotas comparten la característica de que las regiones del origen de replicación de sus cromosomas poseen zonas de alto contenido en AT. El contenido en AT de estas regiones es mayor que en el resto del cromosoma, lo que facilita la apertura de la doble hélice en estos puntos y favorece el posterior ensamblaje del replisoma en la zona del origen de replicación (revisado en Rajewska *et al.*, 2012). La replicación HIR en *E. coli* inicia exclusivamente en *oriC* y se ha determinado que el trecémero L es esencial para su inducción (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006b). Se ha propuesto que la desestabilización térmica de la zona de los trecémeros sea la responsable de la apertura de la región del origen para el inicio de la replicación termoinducida (González-Soltero, 2007).

Mediante el análisis de la distribución del contenido en bases del genoma es posible la identificación del origen de replicación basada en la localización de regiones ricas en pares AT. El análisis SIDD, de la desestabilización del dúplex de DNA inducida por estrés, utiliza las propiedades estructurales del DNA derivadas de su contenido en pares AT para predecir los

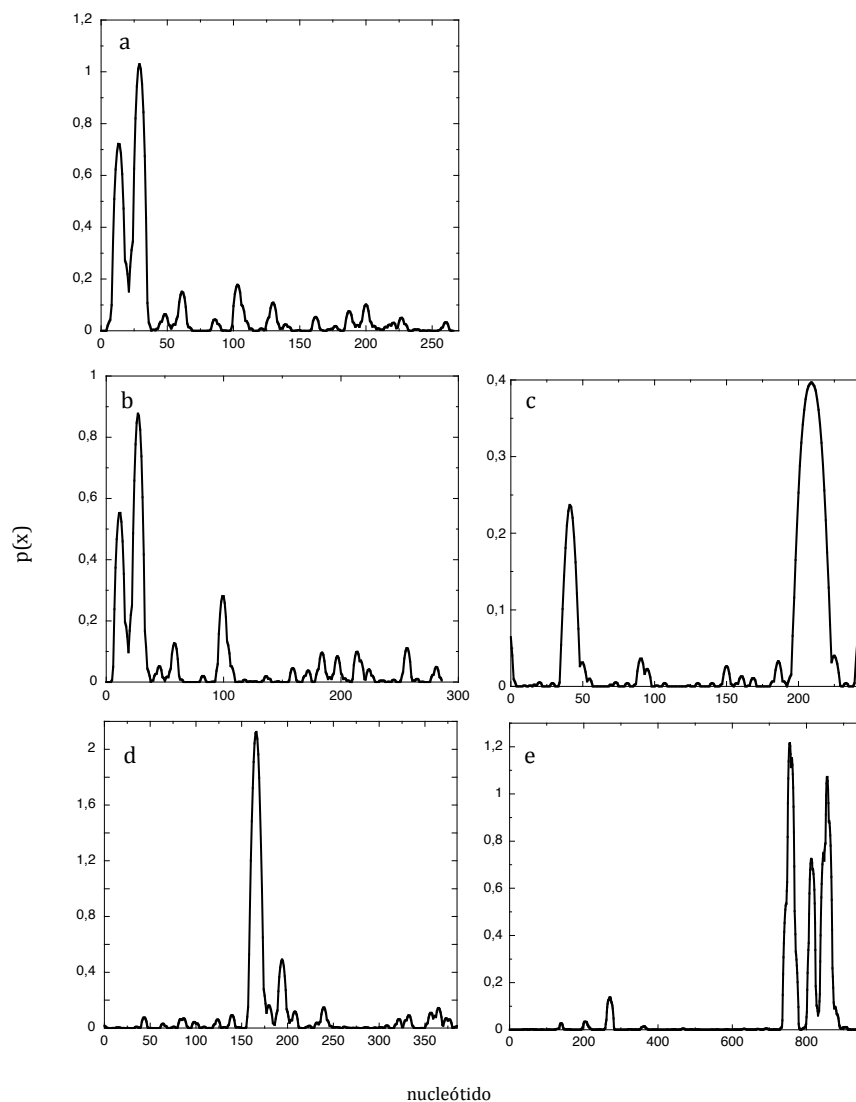


Figura 31. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice ($p(x)$) para la secuencia de los orígenes de replicación de *E. coli* K12 (a), *S. enterica* serovar Typhimurium (b), *B. subtilis* est. 168 (c) y los cromosomas I (d) y II (e) de *V. cholerae* O1 biovar El Tor est. N16961 (Tabla 4).

sitios de la doble hélice que son susceptibles de separarse en situaciones de estrés debido a su baja estabilidad termodinámica (apartado 15.2 de Métodos). El análisis de sitios SIDD en la secuencia de *oriC* de *E. coli* determinó que en el trecémero L se localiza el sitio preferente de apertura de la doble hélice en *oriC* y se ha propuesto que la desestabilización de esta secuencia por estrés térmico llevaría a la inducción de HIR (González-Soltero *et al.*, 2006b).

En este apartado se muestra el análisis de sitios SIDD en las secuencias de los orígenes de replicación de los cromosomas de las especies bacterianas estudiadas (Tabla 1). Se representó el perfil de inestabilidad para los diferentes orígenes cromosómicos mediante el uso de la aplicación WebSIDD (Bi y Benham, 2004). La descripción y procedencia de las secuencias empleadas se recogen en la Tabla 4. En la Figura 31 se muestran los perfiles de desestabilización obtenidos para los orígenes de replicación de los cromosomas de *E. coli* (a), *S. typhimurium* (b) y *B. subtilis* (c), y los cromosomas I y II de *V. cholerae* (d y e, respectivamente). En todos los orígenes analizados se localizan sitios SIDD en sus zonas ricas en AT. Este hecho apoya la hipótesis, ya formulada para *E. coli*, de que la desestabilización térmica del origen de replicación lleva a la apertura de la secuencia del origen y permite el inicio de HIR en todas las bacterias analizadas; así mismo permite considerar que, de igual manera que en *E. coli*, el inicio de HIR en las diferentes especies analizadas tiene lugar en la secuencia *oriC* de los distintos cromosomas (González-Soltero *et al.*, 2006b).

1.4. Análisis de HIR por qPCR

Tras establecer la existencia de sitios SIDD en la secuencia de todos los orígenes de replicación analizados y suponiendo que los inicios de HIR tienen lugar en los *oriC* de las diferentes bacterias, la inducción de HIR debería llevar al aumento de la relación entre las secuencias del origen y del término por cromosoma (relación origen/término), en los primeros minutos posteriores al cambio de la temperatura de incubación de un cultivo de 30 °C a 41 °C.

La qPCR es una técnica fiable por su alta especificidad y reproducibilidad y por el elevado rango dinámico de cuantificación que ofrece, incluso partiendo de una baja concentración de DNA. La técnica de qPCR permite hacer cuantificaciones relativas de la presencia de una secuencia determinada en una muestra de DNA y expresar el resultado con relación a otra secuencia de referencia (Pfaffl, 2006). En este apartado se presenta el estudio de la inducción de HIR mediante la determinación de la relación origen/término por qPCR y cuantificación relativa. El protocolo seguido se describe en el apartado 13.3 de Métodos y las secuencias de los cebadores utilizados se presenta en la Tabla 3. Se emplearon parejas de cebadores diseñados específicamente para secuencias localizadas en las regiones del origen de replicación de cada uno de los cromosomas estudiados y para las regiones diametralmente opuestas o próximas al término. Los cebadores empleados se recogen en la Tabla 3 de Materiales.

1.4.1. Validación del método: curvas estándar y eficiencia de la reacción

La fidelidad de los resultados obtenidos mediante qPCR se basa en la eficiencia de la amplificación de las parejas de cebadores empleados en la reacción. Aunque la cuantificación relativa por qPCR no requiere el trazado de rectas estándar con concentraciones conocidas de DNA, ya que los resultados serán relativos a otra secuencia, se elaboraron dichas rectas para asegurar la eficiencia en las reacciones. Con la intención de evitar el paso del aislamiento del DNA cromosómico previo a la qPCR, se comprobó la eficiencia en reacciones tanto con muestras de DNA cromosómico aislado y purificado como con muestras de células intactas y se trazaron las rectas estándar para cada pareja de cebadores con ambos tipos de muestra.

Se tomaron muestras de DNA cromosómico y se determinó su concentración por absorción a 260 nm, así como muestras de células intactas como se indica en el apartado 13.1 de Métodos. Las muestras de células se tomaron retirando 1 ml del cultivo creciendo exponencialmente cuando éste alcanzó una absorción entre 0,2 y 0,4, medida a 450 nm para medio mínimo y a 600 nm para medio rico. La muestra se congeló rápidamente y se descongeló para añadirla a las reacciones de qPCR. Ambos tipos de muestras se diluyeron de forma seriada en tampón TE abarcando un mínimo de 5 unidades logarítmicas, con el fin de obtener rectas de calibración en ese rango dinámico. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, utilizando el kit para qPCR DyNAmo Flash Sybr Green de Thermo Scientific (apartado 13.2 de Métodos).

Para el análisis de los resultados de las reacciones de qPCR, se estableció un umbral de fluorescencia mediante el software iCycler de Bio-Rad para cada grupo de reacciones que conformarán una recta de calibrado. Estos umbrales se utilizaron posteriormente para determinar los Ct de las muestras estándar y problema.

A partir de los Ct obtenidos en las reacciones se trazaron las rectas estándar presentadas en la Figura 32 (apartado 13.3 de Métodos). La desviación estándar para cada valor medio de Ct nunca fue superior al 13% y el coeficiente de correlación R^2 para cada una de las reacciones calibradas se obtuvo próximo a 1. En la Tabla 15 se presentan el rango dinámico de detección de DNA conseguido para cada pareja de cebadores en las diferentes muestras analizadas, el umbral fijado por el software iCycler utilizado para el análisis de los datos obtenidos, la pendiente obtenida en la recta estándar, y la eficiencia de las reacciones expresada según Rasmussen y en tanto por ciento (Rasmussen, 2001). En todas las situaciones se obtuvieron eficiencias próximas al 100 %, con hasta un 8,5 % de desviación estándar. En la Tabla 16 se recogen las eficiencias obtenidas en las reacciones con células, el rango dinámico obtenido en función de la absorción de la muestra, el umbral definido por el software iCycler para cada grupo de muestras, la pendiente obtenida en la recta de calibración y la eficiencia de las reacciones. En todas las situaciones estudiadas la eficiencia se acerca al 100 % con hasta una desviación estándar del 18 %.

Al haber obtenido eficiencias similares y cercanas al 100% en todas las situaciones estudiadas (tanto en las reacciones con DNA purificado, como con células), fue posible simplificar el muestreo en los análisis posteriores. Se prescindió del aislamiento, purificación y cuantificación de DNA, que a la vez de ser un proceso más laborioso, también resulta en la pérdida de material genético, y se procedió al análisis directo de células completas por qPCR.

Tabla 15. Eficiencia de la reacción de qPCR, expresada según la ecuación de Rasmussen (2001) y en tanto por ciento (E y %), para las parejas de cebadores del origen y del término de la replicación con muestras de DNA cromosómico aislado de las estirpes indicadas. Se muestra el rango lineal de detección conseguido en cada caso, el umbral fijado por el iCycler para optimizar la cuantificación de la fluorescencia y la pendiente de la recta de calibrado.

Estirpe	Medio de cultivo	Región amplificada	Rango de detección (ng de DNA)	Umbral iCycler	Pendiente de la recta	Eficiencia	
						E^*	%
MG1655 (<i>E. coli</i>)	MM9 casaa	ori	$10^{-3} - 10^1$	17,98	-3,3048	2,00	100,72
		ter	$10^{-3} - 10^2$	8,991	-3,3294	1,99	99,69
AB1157 (<i>E. coli</i>)	LB	ori	$10^{-3} - 10^2$	127,2	-3,2620	2,02	102,52
		ter	$10^{-3} - 10^2$	92,8	-3,3206	2,00	100,05
	MM9 casaa	ori	$10^{-3} - 10^2$	16,25	-3,3284	1,99	99,73
		ter	$10^{-3} - 10^1$	4,979	-3,5445	1,91	91,48
BG214 (<i>B. subtilis</i>)	LB	ori	$10^{-2} - 10^2$	117,7	-3,5295	1,92	92,01
		ter	$10^{-2} - 10^2$	4,979	-3,5091	1,91	91,48

* Eficiencia de la reacción según la ecuación $E = 10^{-1/pendiente}$ (Rasmussen, 2001).

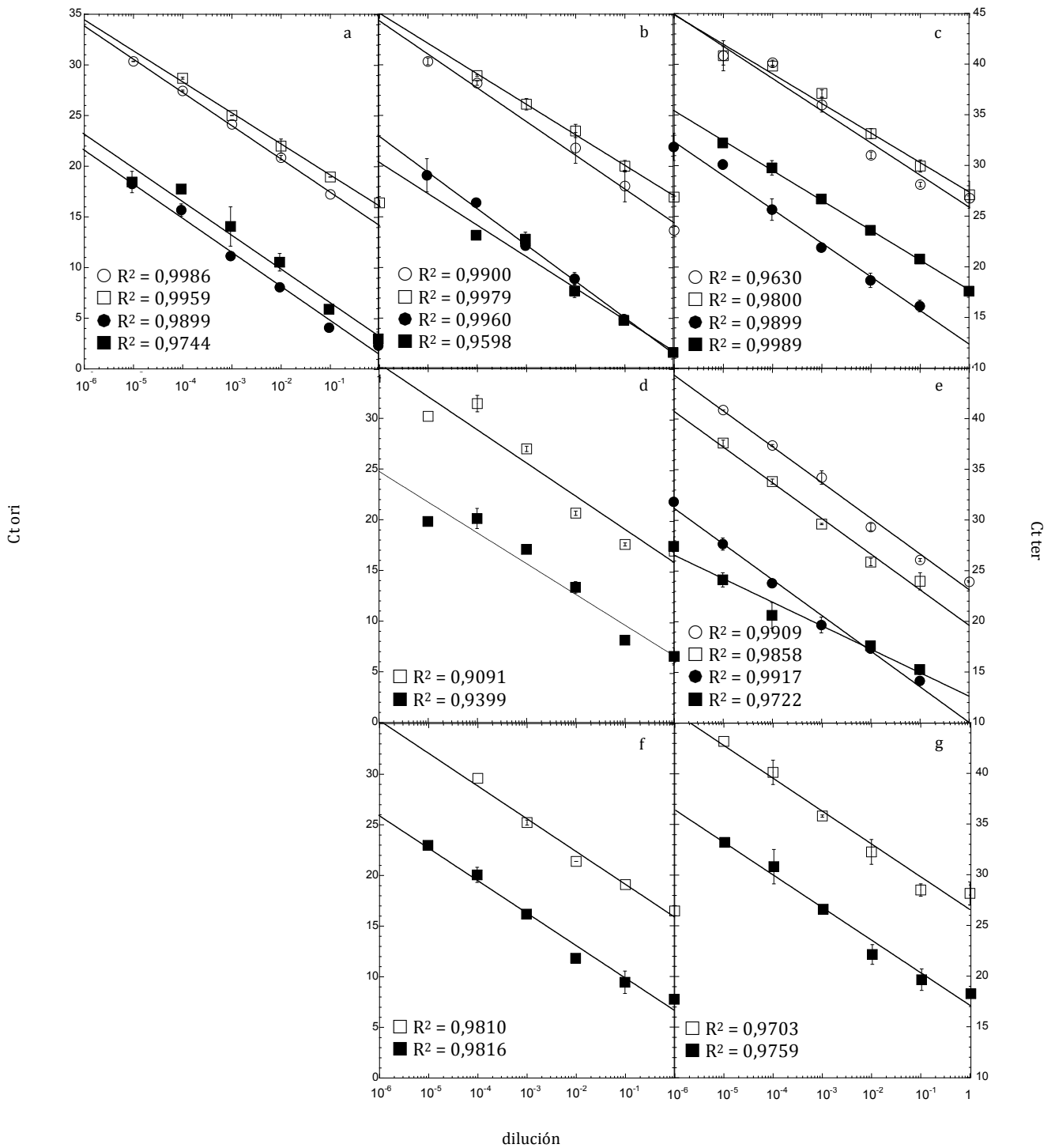


Figura 32. Rectas de calibrado de las reacciones de qPCR obtenidas por regresión lineal de la representación de la media de ciclo umbral obtenido (C_t , *threshold cycle*) frente a la dilución empleada a partir de muestras de DNA cromosómico purificado (\circ , \bullet) y de muestras de células (\square , \blacksquare) para las parejas de cebadores del origen (símbolos vacíos) y del término (símbolos llenos) de cada cromosoma. (a) *E. coli* MG1655 en medio mínimo M9 con casaminoácidos; (b y c) *E. coli* AB1157 en medio mínimo M9 con casaminoácidos y en medio rico LB, respectivamente; (d) *S. typhimurium* LT2 en medio mínimo M9 con casaminoácidos; (e) *B. subtilis* BG214 en medio rico LB; y (f y g) *V. cholerae* ALO2495 en medio mínimo AB con casaminoácidos (cromosomas I y II, respectivamente). Se muestran las barras de error para los valores de C_t y los coeficientes de correlación lineal R^2 .

Tabla 16. Eficiencia de la reacción de qPCR, expresada según la ecuación de Rasmussen (2001) y en tanto por ciento (E y %), para las parejas de cebadores del origen y del término de la replicación para cada cromosoma con muestras de células de las estirpes indicadas. Se muestra la densidad óptica de la muestra (DO), el rango de diluciones utilizado en cada caso, el umbral fijado por el software iCycler para optimizar la cuantificación de la fluorescencia y la pendiente de la recta de calibrado.

Estirpe	Medio de cultivo	Región amplificada	Rango de detección (A ₄₅₀ o A ₆₀₀)	Umbral iCycler	Pendiente de la recta	Eficiencia	
						E^*	%
MG1655 (<i>E. coli</i>)	MM9 casaa	ori	0,320·10 ⁻⁴ – 0,320	21,36	-3,0644	2,11	111,99
		ter	0,320·10 ⁻⁵ – 0,320	2,757	-3,3285	1,99	99,72
AB1157 (<i>E. coli</i>)	LB	ori	0,254·10 ⁻⁵ – 0,254	148,1	-2,9836	2,16	116,35
		ter	0,254·10 ⁻⁵ – 0,254	98,4	-2,9505	2,18	118,23
	MM9 casaa	ori	0,232·10 ⁻⁴ – 0,232	25,89	-3,0104	2,14	114,87
		ter	0,232·10 ⁻⁴ – 0,232	3,992	-3,1147	2,09	109,43
LT2 (<i>S. typhimurium</i>)	MM9 casaa	ori	0,242·10 ⁻⁵ – 0,242	451,1	-3,2729	2,02	102,08
		ter	0,242·10 ⁻⁵ – 0,242	355,0	-3,2226	2,04	104,32
BG214 (<i>B. subtilis</i>)	LB	ori	0,240·10 ⁻⁴ – 0,240	110,6	-3,2400	1,92	092,74
		ter	0,240·10 ⁻⁴ – 0,240	169,6	-3,1129	2,09	109,43
ALO2495 (<i>V. cholerae</i>)	AB casaa	oriI	0,202·10 ⁻⁴ – 0,202	440,6	-3,2333	2,03	103,85
		terI	0,202·10 ⁻⁴ – 0,202	510,1	-3,2048	2,02	102,82
		oriII	0,202·10 ⁻⁴ – 0,202	503,2	-3,2395	2,03	103,17
		terII	0,202·10 ⁻⁴ – 0,202	396,8	-3,2167	2,04	104,58

* Eficiencia de la reacción según la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Rasmussen, 2001).

1.4.2. Análisis de la relación origen/término en HIR

Para determinar la inducción de HIR mediante el uso de qPCR en las distintas especies bacterianas analizadas en este trabajo, se tomaron muestras de cultivos creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos, en medio mínimo AB con casaminoácidos o en medio rico LB, tras 30 minutos de la adición de rifampicina a 150 o 300 $\mu\text{g/ml}$ o cloranfenicol a 200 $\mu\text{g/ml}$, a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C. El tiempo de la toma de muestras se fijó considerando los resultados que se presentan en el apartado 1.6 de Resultados. Con el objetivo de conseguir células en estado estacionario en cuyos cromosomas la relación origen/término es igual a 1, se tomaron muestras de cada bacteria, de cultivos crecidos en los medios correspondientes, tras unas 48 horas de incubación a 30 °C.

Las reacciones se prepararon por triplicado para cada pareja de cebadores (apartado 13.2 de Métodos), añadiendo 1 μl de la muestra del cultivo celular previamente congelada. Los Ct obtenidos se analizaron con el software iCycler, fijando para cada muestra el mismo umbral de detección de fluorescencia establecido en las muestras utilizadas para la calibración de cada pareja de cebadores en cada cromosoma (Tabla 16). Se comprobó que todos los Ct se encontraban dentro de los rangos de detección para los que la eficiencia de las reacciones se había probado con el trazado de las rectas de calibrado. Se calculó la media de los Ct de los triplicados de cada muestra, para cada pareja de cebadores, y se calculó el valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$, considerando como secuencia de interés, la del origen de replicación; secuencia de referencia, la del término (Tabla 4); muestra control, la tomada del cultivo estacionario; y muestras problema, las procedentes del cultivo con rifampicina a 30 °C y del cultivo con rifampicina y cambio de 30 °C a 41 °C. Con estos datos y considerando que las reacciones de qPCR para la amplificación de la secuencia del origen y para la amplificación del término tienen eficiencias próximas al 100 %, se calculó la cuantificación relativa del origen con respecto al término por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$; adicionalmente se hizo el cálculo considerando las eficiencias específicas obtenidas para cada par de cebadores (apartado 13.3 de Métodos, Tabla 16).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17, donde se indican las relaciones origen/término (*ori/ter*) determinadas para los cultivos a 30 °C y tras el cambio a 41 °C, y la relación del valor obtenido tras el cambio 41 °C con respecto al de 30 °C (*ori/ter HIR*). Valores

Tabla 17. Relaciones origen/término de replicación (ori/ter) en cultivos a 30 °C y tras el cambio de temperatura a 41 °C (T) y la relación entre el valor tras el cambio a 41 °C respecto a 30 °C (ori/ter HIR). A las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en los diferentes medios de cultivo, se adicionó rifampicina o cloranfenicol a 30 °C y junto con el cambio a 41 °C; las muestras se tomaron a los tiempos indicados tras el inicio del tratamiento inhibitorio (n = número de muestras analizadas).

Estirpe	Medio	Antibiótico (µg/ml)	tiempo (min)	T	ori/ter ^a	ori/ter ^a HIR →41 °C/30 °C	ori/ter ^b	ori/ter ^b HIR →41 °C/30 °C	n
MG1655 (<i>E. coli</i>)	MM9 casaa	Rif 150	30	30 °C	1,42 ± 0,17	2,53	1,22 ± 0,15	2,33	2
				→41 °C	3,59 ± 0,47				
AB1157 (<i>E. coli</i>)	MM9 casaa	Rif 150	30	30 °C	1,00 ± 0,22	2,01	0,98 ± 0,21	1,94	3
				→41 °C	2,02 ± 0,70				
	LB	Rif 150	30	30 °C	0,99 ± 0,31	3,21	1,26 ± 0,41	3,25	3
				→41 °C	3,17 ± 0,76				
LT2 (<i>S. typhimurium</i>)	MM9 casaa	Rif 150	30	30 °C	0,45 ± 0,02	1,89	0,45 ± 0,01	1,90	2
				→41 °C	0,85 ± 0,10				
			180	30 °C	0,36	1,34	0,37	1,34	1
				→41 °C	0,49				
BG214 (<i>B. subtilis</i>)	LB	Rif 300	30	30 °C	0,50 ± 0,10	3,25	0,90 ± 0,20	3,65	2
				→41 °C	1,63 ± 0,69				
			300	30 °C	1,55 ± 0,42	1,43	4,89 ± 1,55	0,92	2
				→41 °C	2,26 ± 0,15				
ALO2495 (<i>V. cholerae</i>) cromosoma I	AB casaa	Cam 200	30	30 °C	7,82 ± 6,40	2,56	7,74 ± 6,34	2,54	2
				→41 °C	20,04 ± 15,49				
		180	30 °C	2,10	1,16	8,69	1,16	1	
			→41 °C	2,45					10,10
		Rif 150	30	30 °C	13,00 ± 1,73	2,29	12,78 ± 1,60	2,28	2
				→41 °C	29,81 ± 2,73				
180	30 °C	1,98	1,12	8,18	1,12	1			
	→41 °C	2,23					9,19		
ALO2495 (<i>V. cholerae</i>) cromosoma II	AB casaa	Cam 200	30	30 °C	1,41 ± 0,17	1,12	1,02 ± 0,56	0,84	3
				→41 °C	1,58 ± 1,14				
		180	30 °C	0,79	1,14	0,80	1,15	1	
			→41 °C	0,91					0,92
		Rif 150	30	30 °C	2,76 ± 1,43	1,02	0,97 ± 0,21	0,86	3
				→41 °C	2,83 ± 1,98				
180	30 °C	1,62	1,07	1,65	1,07	1			
	→41 °C	1,74					1,77		

^a Calculado por el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001).

^b Calculado teniendo en cuenta la eficiencia de las dos parejas de cebadores por el método propuesto por Pfaffl (Pfaffl, 2001).

superiores a 1 en esta última relación indicarán la inducción de la replicación HIR en los orígenes de replicación, o zonas próximas, de los diferentes cromosomas analizados.

Se analizaron las estirpes MG1655 y AB1157 de *E. coli*, LT2 de *S. typhimurium*, BG214 de *B. subtilis* y ALO2495 de *V. cholerae*, creciendo en diferentes medios e inhibiendo el inicio de la replicación como se indica en la Tabla 17. En el caso de *V. cholerae*, el análisis por qPCR permitió distinguir entre sus dos cromosomas, que se analizaron por independiente. Considerando los datos calculados por el método comparativo $\Delta\Delta Ct$, los valores obtenidos para la relación *ori/ter HIR* tras 30 minutos del inicio del tratamiento inhibitorio, en todos los casos fue significativamente superior a 1, excepto para el cromosoma II de *V. cholerae*. Se obtuvieron valores desde 1,89 para el cromosoma de *S. typhimurium*, creciendo en medio mínimo M9 y con inhibición por rifampicina a 150 µg/ml, hasta 3,25 para el cromosoma de *B. subtilis*, creciendo en medio rico LB y con rifampicina a 300 µg/ml. Para *E. coli*, el valor obtenido para *ori/ter HIR* fue de 2,53 en MG1655 y 2,01 en AB1155, ambas creciendo en medio mínimo M9 y con inhibición por rifampicina a 150 µg/ml, y de 3,21 en AB1155 creciendo en medio rico LB y tratamiento con rifampicina a 150 µg/ml. Para *V. cholerae*, creciendo en medio mínimo AB con casaminoácidos y con inhibición por cloranfenicol a 200

µg/ml o rifampicina a 150 µg/ml, se obtiene una clara diferencia entre sus cromosomas I y II, presentado el primero una relación *ori/ter* HIR de 2,56 y 2,29, según el tratamiento inhibitor, mientras que el cromosoma II presenta valores de 1,12 y 1,04. Por tanto se puede concluir que en *V. cholerae* sólo el cromosoma I induce HIR.

Adicionalmente a las muestras tomadas tras 30 minutos del inicio del tratamiento inhibitor, en *S. typhimurium* y *V. cholerae* se analizaron muestras tras 180 minutos y en *B. subtilis* tras 300 minutos, de cultivos a 30 °C y tras el cambio a 41 °C. Los valores para *ori/ter* HIR obtenidos con estas muestras son más bajos que los determinados tras 30 minutos de inhibición, como se espera al ir progresando la elongación y la terminación de la replicación. En el caso del cromosoma II de *V. cholerae*, los valores permanecen constantes.

Los valores obtenidos para las relaciones *ori/ter* y *ori/ter* HIR considerando la eficiencia de las diferentes parejas de cebadores no mostraron diferencias significativas para la interpretación de los resultados.

1.5. Dependencia de RecA en HIR

La proteína RecA desempeña papeles fundamentales en diversas funciones del metabolismo del material genético, como son la recombinación homóloga, la reparación de las horquillas de replicación detenidas, la reparación de roturas de doble cadena del DNA, la inducción de la respuesta SOS y la mutagénesis (Cox, 2003; Lusetti y Cox, 2002). Se ha determinado que HIR en *E. coli*, a diferencia de la replicación cíclica, requiere las actividades de recombinación homóloga y de mantenimiento de estructuras de replicación asociadas a RecA (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997, González-Soltero *et al.*, 2008b). Para caracterizar funcionalmente a HIR en las especies estudiadas diferentes a *E. coli*, se determinó la dependencia de RecA para la inducción de HIR en estas especies.

Se analizó la inducción de HIR por acumulación de DNA, en estirpes de *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae* mutantes nulos *recA* y sus correspondientes estirpes isogénicas (apartado 4.2.2 de Métodos). Como referencia se utilizó la estirpe IC4000 de *E. coli* que lleva la mutación *recA430*, donde se ha demostrado que no se induce HIR (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997, González-Soltero *et al.*, 2008b). Las estirpes utilizadas se describen en la Tabla 1. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18. Se analizaron cultivos de las diferentes estirpes creciendo en los medios y con el tratamiento de inhibición del inicio de la replicación que se indican en la Tabla 18. Se muestran los porcentajes de orígenes inducidos tras el

Tabla 18. Porcentaje de orígenes inducidos (inducción) por cambio de temperatura en estirpes mutantes RecA⁻ y sus isogénicas RecA⁺ de *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*, creciendo en diferentes medios, tras la inhibición del inicio de la replicación con rifampicina (Rif) o cloranfenicol (Cam) a las concentraciones indicadas.

Estirpe (genotipo)	Medio de cultivo	Antibiótico (µg/ml)	Inducción RecA ⁺ (i%)	Inducción RecA ⁻ (i%)
<i>E. coli</i> - AB1157 (RecA ⁺) - IC400 (<i>recA430</i>)	MM9 casaa	Rif 150	24,97	0
	LB	Rif 150	29,94	0
<i>S. typhimurium</i> - LT2 (RecA ⁺) - SV1235 (LT2 <i>recA1</i>)	MM9 casaa	Rif 150	55,79	24,06
	LB	Rif 150	40,66	30,07
		Cam 200	78,69	40,48
<i>B. subtilis</i> - BG214 (RecA ⁺) - BG190 (BG214 <i>recA6</i>)	MM9 casaa	Cam 250	93,69	66,73
	LB	Rif 300	56,31	14,36
		Cam 200	109,95	66,76
<i>V. cholerae</i> - ALO2495 (RecA ⁺) - ALO2399 (ALO2495 <i>recA</i> -)	AB casaa	Rif 150	33,47	31,32
		Cam 200	28,19	0
	LB	Cam 200	40,70	13,81

cambio de temperatura en las estirpes RecA⁻ y sus isogénicas RecA⁺. En el mutante de recombinación de *E. coli* no se indujo HIR, ni en medio mínimo, ni en medio rico, como ya se había demostrado. En el resto de especies, los mutantes nulos indujeron HIR, aunque en menor porcentaje que sus estirpes isogénicas silvestres. En *S. typhimurium* y *B. subtilis*, HIR se indujo en los mutantes en torno a una media del 50 % de la inducción del silvestre, variando en función del medio de cultivo y del tratamiento inhibitor. En *V. cholerae* los resultados fueron más variables; en el mutante creciendo en medio mínimo se indujo HIR a niveles del silvestre por tratamiento con rifampicina, mientras que no se indujo al inhibir los incios con cloranfenicol, en medio rico HIR se reduce al 30 % en el mutante con respecto al silvestre. Estos resultados indican que HIR es parcialmente dependiente de RecA en *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*, a diferencia de la dependencia completa de las actividades de RecA requeridas para HIR en *E. coli*.

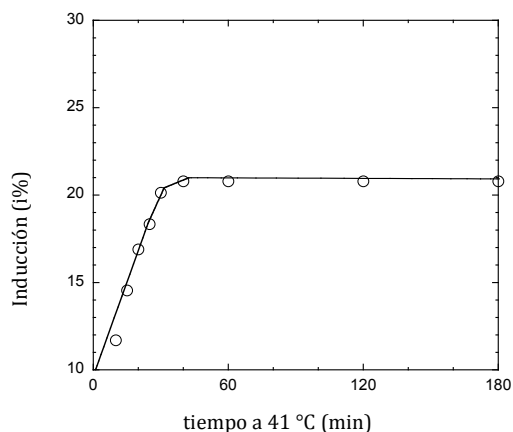
1.6. Ampliación de la caracterización de HIR en *E. coli*

Aunque HIR ha sido extensamente estudiada en *E. coli* (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008), en este apartado se presentan dos análisis que amplían la descripción de esta replicación inducida por estrés térmico.

1.6.1. Determinación del tiempo de inducción de HIR tras el cambio de temperatura

La cuantificación de la inducción de HIR se suele llevar a cabo realizando cambios de temperatura de 30 °C a 41 °C e inhibiendo el inicio de la replicación cíclica simultáneamente por la adición de rifampicina; posteriormente se permite la finalización de las replications en marcha durante un tiempo al menos el doble del tiempo de generación del cultivo. Esta aproximación experimental no permite conocer el tiempo en el que los incios de HIR se producen tras el cambio de temperatura. Aunque se ha determinado que la inducción de HIR es transitoria (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997), no se conoce el tiempo durante el que tienen lugar los incios de la replicación termoinducida tras el cambio de temperatura.

Para determinar el período en el que HIR inicia tras el cambio de temperatura, de cultivos de la estirpe AB1157 de *E. coli* creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30 °C una alícuota se transfirió a 41 °C, y a ambos volúmenes se les añadió rifampicina a 150 µg/ml al mismo tiempo del cambio de temperatura; a tiempos posteriores al cambio se devolvieron a 30 °C alícuotas del volumen a 41 °C; en todos los casos se permitió que las replications en marchase completaran y se determinó la acumulación de DNA alcanzada y el porcentaje de orígenes inducidos en los volúmenes que habían estado a 41 °C (apartados 4.2.2 y 4.2.3 de Métodos). En la Figura 33 se muestran los porcentajes de orígenes inducidos obtenidos para cada uno de los tiempos registrados (inducción). Se observa que inicialmente cuanto más tiempo se mantiene la alícuota a la temperatura elevada, mayor es el porcentaje de inducción que se obtiene. Esto sucede hasta que la alícuota se mantiene 30 minutos a 41 °C antes de devolverla a 30 °C, situación en la que el porcentaje de orígenes inducidos alcanzó el valor máximo, en torno al 20 %. Este porcentaje se mantuvo sin variación en el resto de las alícuotas incubadas durante más de 30 minutos a 41 °C antes de devolverlas a 30 °C. Por tanto, los incios de HIR tienen lugar durante los 30 primeros minutos tras el cambio de temperatura. Este tiempo necesario para alcanzar la inducción máxima de HIR se consideró como el tiempo óptimo para la toma de muestras que se analizaron por qPCR para determinar la relación origen/término en HIR (apartado 1.4.2 de Resultados).



Medio de cultivo	Antibiótico (µg/ml)	Tiempo a 41 °C (min)	Inducción (i%)
MM9 casaa	Rif 150	0	0
		10	11,70
		15	14,55
		20	16,89
		25	18,34
		30	20,14
		45	20,79
		60	20,79
		120	20,79
		180	20,79

Figura 33. Porcentaje de orígenes inducidos (inducción) en cultivos de *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30 °C y sometidos al cambio a 41 °C junto con la adición de rifampicina a 150 µg/ml a tiempo cero, devolviendo alcuotas de 41 °C a 30 °C a los tiempos posteriores indicados. El tratamiento con rifampicina se mantuvo tres horas para todas las muestras.

1.6.2. Análisis por citometría de flujo del efecto del cambio de temperatura en cultivos no tratados

El análisis de cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C y tras el cambio de 30 °C a 41 °C siguiendo el crecimiento en masa y la síntesis de DNA, lleva a un aumento de la relación DNA/masa tras el cambio de temperatura en *E. coli* (apartado 1.1.1 de Resultados, Figura 13) (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Para analizar los cambios que experimenta el cultivo tras el cambio de 30 °C a 41 °C se llevó a cabo su análisis por citometría de flujo.

La estirpe AB1157 de *E. coli* se creció exponencialmente en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30 °C y cuando el cultivo alcanzó una absorbancia entre 0,08 y 0,10 una parte se transfirió a 41 °C. A tiempos posteriores al momento del cambio de temperatura, se separaron alcuotas de ambos volúmenes y se trataron con rifampicina a 150 µg/ml y cefalexina a 50 µg/ml durante cuatro horas. Los cultivos presentaron tiempos de generación de 54 minutos a 30 °C y de 32 minutos tras el cambio a 41 °C. Las muestras tratadas con rifampicina y cefalexina fueron analizadas por citometría de flujo. En la Figura 34 se muestra la distribución de cromosomas por célula en las muestras tratadas. A partir de estos histogramas se calculó el número medio de cromosomas por célula (cromosomas equivalentes/célula) en las muestras de 30 °C y tras el cambio a 41 °C y los datos obtenidos se hicieron relativos al valor medio obtenido a 30 °C. De igual manera se procedió con la relación masa/célula determinada en estas muestras por citometría, considerando el parámetro dispersión de luz (LS/célula).

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 35. El cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C mantuvo los parámetros analizados en torno a su media. Tras el cambio de temperatura, se observó un aumento del número de cromosomas por célula durante los primeros 20 minutos, que va acompañado por el aumento de la masa celular. A tiempos posteriores, las células disminuyeron su contenido en cromosomas al producirse la división celular, alcanzando niveles inferiores a los que mantiene el cultivo exponencial a 30 °C. Por tanto, el cambio de temperatura de 30 °C a 41 °C, induce la replicación y la elongación celular durante la primera generación tras el cambio; a tiempos posteriores, se inducen divisiones celulares extras, que llevan a disminuir el tamaño celular y el contenido cromosómico por célula a valores inferiores a los del cultivo a 30 °C. Durante los primeros minutos tras el cambio, el incremento en cromosomas es más rápido y más alto que el aumento de la masa celular, lo que llevaría al aumento de la relación DNA/masa observado

anteriormente (Figura 13). Las divisiones posteriores disminuyen el tamaño o masa celular de forma similar a la reducción de cromosomas por célula, manteniéndose así los valores DNA/masa altos en el cultivo.

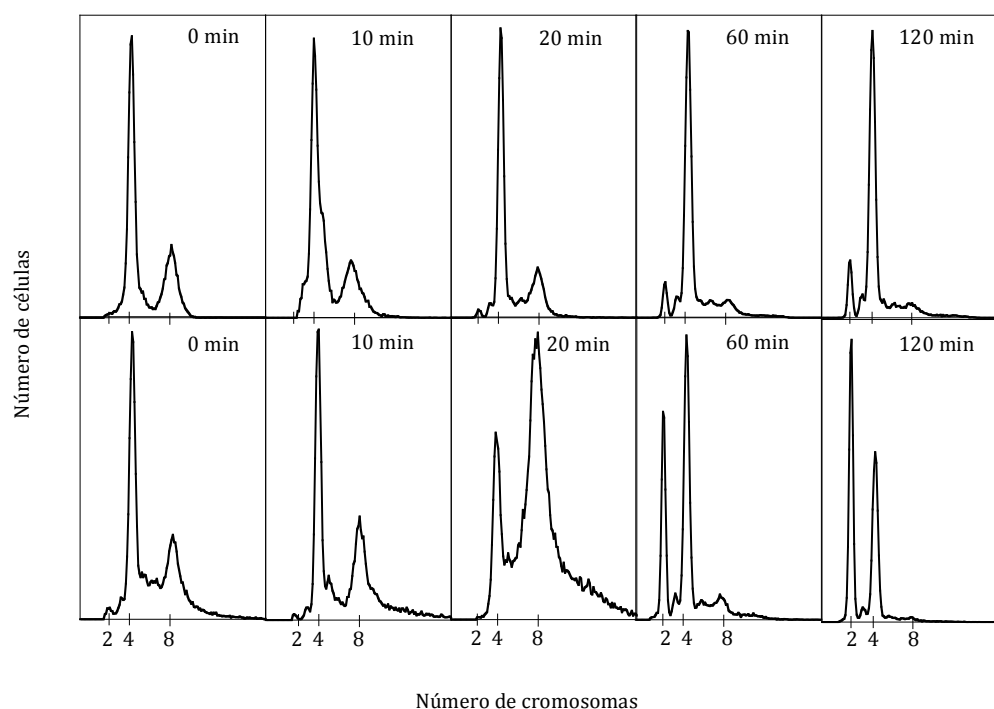


Figura 34. Distribución de cromosomas por célula en cultivos de *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30 °C (línea superior) y tras el cambio a 41 °C (línea inferior). La adición de rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ se llevó a cabo a los tiempos posteriores al cambio de temperatura indicados en cada histograma, tanto a alícuotas del cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C como a alícuotas del cultivo cambiado a 41 °C. El tratamiento con rifampicina y cefalexina se mantuvo cuatro horas para todas las muestras. Tiempos de generación: 54 min a 30 °C y 32 min a 41 °C.

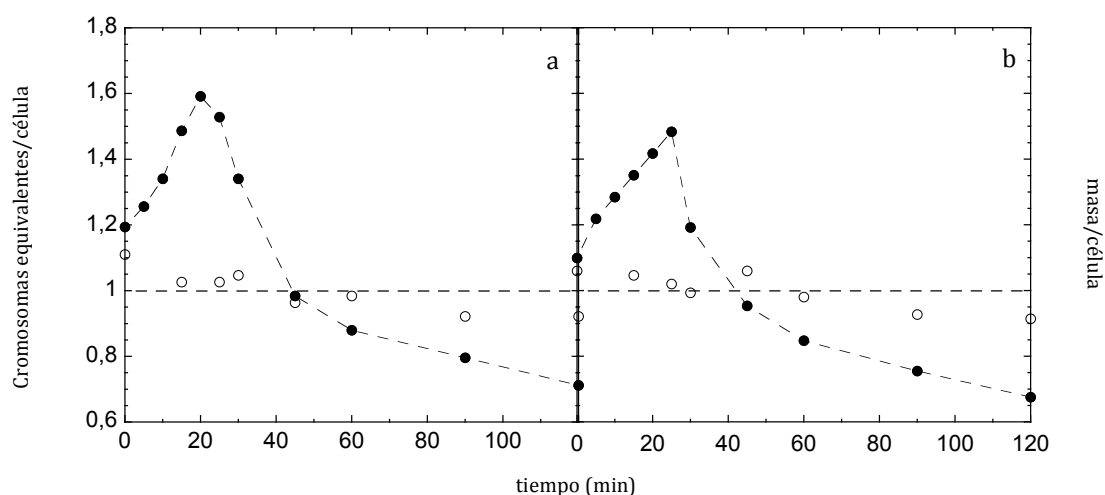


Figura 35. Relaciones cromosomas equivalentes/célula y masa/célula obtenidas por citometría de flujo tras tratamiento con rifampicina a 150 $\mu\text{g/ml}$ y cefalexina a 50 $\mu\text{g/ml}$ a cultivos de *E. coli* AB1157 creciendo en medio mínimo M9 con casaminoácidos a 30 °C (○) y tras el cambio a 41 °C (●) a tiempo cero. La adición de rifampicina y cefalexina se llevó a cabo a los tiempos posteriores al cambio de temperatura indicados, para ambos cultivos, y el tratamiento se mantuvo cuatro horas para todas las muestras.

2. REPLICACIÓN EN MINICROMOSOMAS Y PLÁSMIDOS DE *E. coli*

En el primer apartado de Resultados se presentan datos que indican que la replicación inducida por estrés térmico HIR no es exclusiva de *E. coli*, sino que también tiene lugar en otras especies bacterianas. Preliminarmente se había observado que moléculas de diferentes plásmidos muestran una respuesta a la temperatura similar a HIR (González-Soltero, 2007). En el presente apartado se amplía el estudio y la caracterización de la replicación termoinducida a minicromosomas y plásmidos de *E. coli*. También se estudia el efecto de la temperatura de crecimiento sobre la replicación de minicromosomas y plásmidos en condiciones de crecimiento exponencial a 30 °C, 37 °C y 41 °C. De igual modo que en los orígenes de replicación de cromosomas bacterianos, se han localizado sitios SIDD en los replicones estudiados. Finalmente se analiza la función de la proteína RecA para la replicación plasmídica. El análisis de la replicación mediante marcaje radiactivo se ve dificultado en el estudio de plásmidos debido a su pequeño tamaño, que impide la detección fiable de la señal radiactiva al trabajar con densidades ópticas bajas, a diferencia de su estudio en cromosomas (apartado 1.1 de Resultados); en este trabajo se ponen a punto y se comparan diferentes métodos para determinar el número de copias de plásmido, como la espectrofluorimetría, la citometría de flujo y la qPCR.

2.1. Inducción de la replicación por estrés térmico en minicromosomas y plásmidos

Trabajos anteriores han demostrado que la emisión de fluorescencia por la proteína de fluorescencia verde GFP puede utilizarse para cuantificar la dosis génica o el número de copias de un plásmido (González-Soltero, 2007; Lobner-Olesen, 1999; Mendoza-Chamizo *et al.*, 2012). En este trabajo se ha aprovechado dicha emisión para estudiar HIR en distintos plásmidos portadores del gen *GFPmut2* clonado bajo el control del promotor del operón arabinosa, pBAD, y de su proteína reguladora AraC (apartado 12 de Métodos; Cormack *et al.*, 1996; Lobner-Olesen, 1999). Sistemas como éste, basados en la medida de la fluorescencia de GFP, permiten el uso de técnicas como la espectrofluorimetría y la citometría de flujo para la determinación de su dosis génica o del número de copias de plásmido, porque no miden la actividad enzimática de GFP, sino su fluorescencia intrínseca. Previamente a este trabajo se comprobó que el promotor pBAD no es inducible por el cambio de temperatura de 30 °C a 41 °C (González-Soltero, 2007).

Se han estudiado diferentes replicones con diferentes mecanismos de control de la replicación: los minicromosomas *oriC* y *oriC sopABC*, y los plásmidos F, P1 $\Delta incA$, pSC101, R1, p15A y pBR322 (apartado 4 de Introducción). Las estirpes bacterianas empleadas son portadoras de los minicromosomas o plásmidos: pALO264 (*oriC*), pALO267 (*oriC sopABC*), pALO280 (F), pALO270 (P1 $\Delta incA$), pALO284 (pSC101), pALO261 (R1), pALO275 (p15A) o pALO269 (pBR322) en MC1000 (serie ALO, Tabla 2). En el estudio por espectrofluorimetría, cada valor de fluorescencia, una vez corregido para evitar el efecto de filtro interno (12.1.1 de Métodos), se hizo relativo a la absorbancia de las muestras y se utilizó para determinar el número de copias de plásmido por masa (FL/masa). En el análisis por citometría de flujo se trabajó con el valor medio de cada distribución de fluorescencia por célula de la población analizada y éste valor se utilizó para determinar el número de copias de plásmido por célula (FL/célula) (apartado 12.2.1 de Métodos). En todos los experimentos se mantuvo siempre activo el promotor pBAD mediante la adición al medio de cultivo de arabinosa al 0,2 % (p/v), consiguiendo así que la cantidad de fluorescencia de GFP detectada sea proporcional al número de genes *GFPmut2* en la célula.

En este estudio, los cultivos se crecieron exponencialmente a 30 °C y, al alcanzar una absorbancia de 0,06 y 0,08, medida a 488 nm, una alícuota del cultivo se incubó a 41 °C. Se

utilizó medio mínimo M9 con glicerol como fuente de carbono, suplementado con casaminoácidos al 0,1 % (p/v) y arabinosa al 0,2 % (p/v), y se adicionó el antibiótico al que cada plásmido confiere resistencia según la estirpe analizada (apartado 2.1 de Materiales). Se tomaron muestras a lo largo del crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio de temperatura, y se analizó su fluorescencia mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo (apartado 12 de Métodos). En el estudio de la replicación termoinducida en minicromosomas y plásmidos no se hace uso de los antibióticos rifampicina o cloranfenicol, utilizados en el apartado anterior para inhibir los inicios de la replicación cíclica, puesto que el análisis se basa en la medida del aumento de la fluorescencia de GFP y el tratamiento inhibitor detendría la síntesis de nuevas proteínas.

Los datos de fluorescencia obtenidos para cada replicón, relativos a la masa (FL/masa) o a la célula (FL/célula), se representaron frente al tiempo de toma de muestras. Puesto que los valores FL/masa y FL/célula obtenidos durante el crecimiento a 30 °C en cada cultivo fueron prácticamente constantes a lo largo del tiempo, los datos que se representan se hicieron relativos a la media de estos valores de las muestras tomadas a 30 °C para cada replicón (Figuras 36, 38 y 39).

2.1.1. Inducción de la replicación en minicromosomas

Los minicromosomas son plásmidos que se replican exclusivamente a partir de una copia del origen de replicación cromosómico, *oriC*, y están sujetos al mismo control de la replicación que el cromosoma bacteriano. Se ha estudiado la inducción de la replicación por estrés térmico en los minicromosomas pALO264 (*oriC*) y pALO267 (*oriC sopABC*). El minicromosoma pALO264, a diferencia de los replicones plasmídicos naturales, no acopla su replicación al número de copias por célula puesto que no contiene información para efectuar un reparto equitativo en el momento de la división celular. El minicromosoma pALO267 contiene el sistema de partición *sopABC* del plásmido F, que lleva a cabo un reparto activo y estable entre las células hijas (Lobner-Olesen, 1999; Niki y Hiraga, 1999). En la Figura 36 se representan los valores para FL/masa y FL/célula a lo largo del crecimiento exponencial a 30 °C y tras el cambio a 41 °C para las estirpes ALO1455 (a) y ALO1456 (b y c), que albergan los minicromosomas

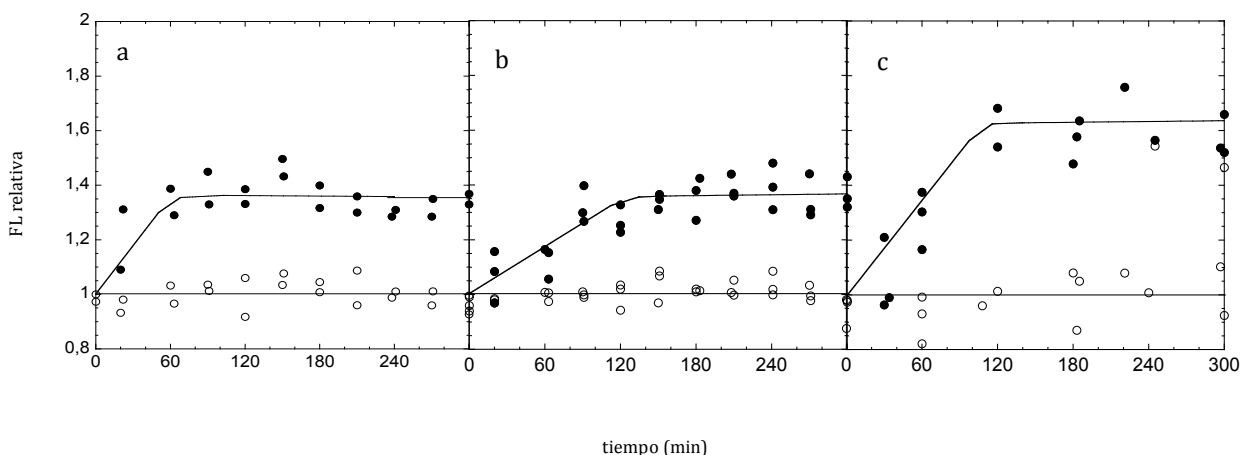


Figura 36. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría (a, b) y FL/célula obtenida por citometría de flujo (c) en las estirpes ALO1455 (a) y ALO1456 (b, c), portadoras de los plásmidos pALO264 (*oriC*) y pALO267 (*oriC sopABC*), respectivamente, durante el crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia.

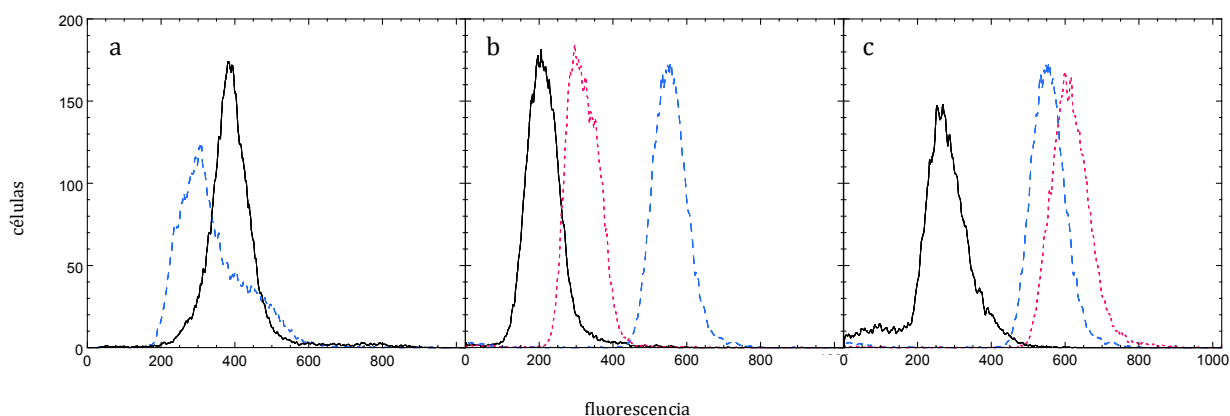


Figura 37. Distribución de la fluorescencia por célula obtenida por citometría de flujo en muestras tomadas a 30 °C (absorbancia de 0,1) para las estirpes ALO1455, ALO1456, ALO15465, ALO1459, ALO1469, ALO1454, ALO1460 y ALO1458, portadoras respectivamente de (a) los minicromosoma pALO264 (*oriC*, línea continua negra) y pALO267 (*oriC sopABC*, línea discontinua azul), (b) los plásmidos con control de la replicación por iterones (b) pALO280 (F, línea continua negra), pALO270 (P1*ΔincA*, línea discontinua) y pALO284 (pSC101, línea punteada fucsia), y (c) para los plásmidos con control por RNA antisentido pALO261 (R1, línea continua), pALO275 (p15A, línea discontinua azul) y pALO269 (pBR322, línea punteada fucsia).

pALO264 (*oriC*) y pALO267 (*oriC sopABC*), respectivamente. Para cuantificar el aumento del número de copias de minicromosoma se dividió el valor alcanzado cuatro horas después del cambio de temperatura a 41 °C entre el valor medio obtenido a 30 °C (Tabla 19). Los resultados obtenidos por espectrofluorimetría indican que el número de copias de los minicromosomas por masa aumenta tras estrés térmico un 35 % tanto para pALO264 como para pALO267. De este modo ambos presentarían un nivel de inducción de la replicación análogo al del cromosoma. En la cuantificación del número de copias por célula, para el minicromosoma pALO264 (*oriC*) se obtuvo una distribución bimodal (Figura 37), correspondiente a la coexistencia de dos subpoblaciones celulares debido a la falta del sistema de reparto *sopABC* (Lobner-Olesen, 1999); este motivo hace que la cuantificación del número medio de copias por célula sea inexacto para este plásmido. Para pALO267 (*oriC sopABC*) se obtuvo un aumento en el número de copias por célula del 65 % tras el cambio a 41 °C, superior al obtenido por espectrofluorimetría (Tabla 19, Figuras 36 y 37 a).

Tabla 19. Incremento del número de copias de plásmido tras el cambio a 41 °C con respecto al crecimiento exponencial a 30 °C, medido por espectrofluorimetría ($\Delta\text{FL}/\text{masa}$) y por citometría de flujo ($\Delta\text{FL}/\text{célula}$), y tamaño celular medio relativo (LS/célula) a 30 °C y tras el cambio a 41 °C en las diferentes estirpes indicadas (n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	Espectrofluorimetría ($\Delta\text{FL}/\text{masa}$)		Citometría de flujo ($\Delta\text{FL}/\text{célula}$)		Tamaño celular (LS/célula)	
				n		n	30 °C ^a	→41 °C ^b
ALO1455	pALO264	<i>oriC</i>	1,35	2	-	-	0,89	-
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	1,35	3	1,65	3	1,09	0,92
ALO1465	pALO280	F	1,13	3	2,20	4	0,99	1,02
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	1,39	3	2,00	4	1,01	1,02
ALO1469	pALO284	pSC101	1,55	4	2,00	3	0,98	1,05
ALO1454	pALO261	R1	1,30	3	1,80	4	1,15	1,21
ALO1460	pALO275	p15A	2,00	3	2,90	5	1,00	1,04
ALO1458	pALO269	pBR322	1,65	3	4,60	6	1,00	1,36
MC1000	-	-	-	-	-	3	1,00	1,13

^a Tamaño celular relativo al tamaño celular medio de la estirpe MC1000 creciendo exponencialmente a 30 °C.

^b Variación del tamaño celular tras el cambio a 41 °C (4h) relativo al tamaño celular durante el crecimiento exponencial a 30 °C.

2.1.2. Inducción de la replicación en plásmidos con control de la replicación por iterones.

Los plásmidos con control de la replicación por iterones son aquellos que contienen secuencias directamente repetidas, o iterones, en sus orígenes de replicación. Estas secuencias son el lugar de unión para la proteína iniciadora Rep, codificada por el propio plásmido (apartado 4.2.1 de Introducción). Dentro de esta categoría, en este apartado se estudian los plásmidos pALO280 (F), pALO270 (P1 $\Delta incA$) y pALO284 (pSC101).

En la Figura 38 se muestran los valores para FL/masa (a, b, c) y FL/célula (d, e, f) en la estirpe ALO1465, portadora del pALO280 (F); ALO1459, portadora de pALO270 (P1 $\Delta incA$); y ALO1469, portadora del pALO284 (pSC101). Tras cinco horas del cambio de temperatura a 41 °C, el número de copias de plásmido en el pALO280 (F) aumenta un 13 % por masa y el incremento es del 120 % al cuantificarlo por célula (Figura 38, a y d, respectivamente). En las mismas condiciones, el número de copias de plásmido por masa aumenta un 40 % para pALO270 (P1 $\Delta incA$) y un 55 % para pALO284 (pSC101) (Figura 38 b y c, respectivamente), mientras que por célula se alcanzan valores superiores, aproximadamente del 100 % para ambos plásmidos (Figura 38 e y f, respectivamente). Estos resultados también se recogen en la Tabla 19. La emisión de fluorescencia obtenida por citometría para los plásmidos estudiados mostró una distribución gaussiana en todos los casos (Figura 37 b).

Considerando estos resultados, en todos los casos estudiados de plásmidos con control de la replicación por iterones se puede concluir que tiene lugar la inducción de la replicación por estrés térmico, cuando los plásmidos se encuentran libres en la célula.

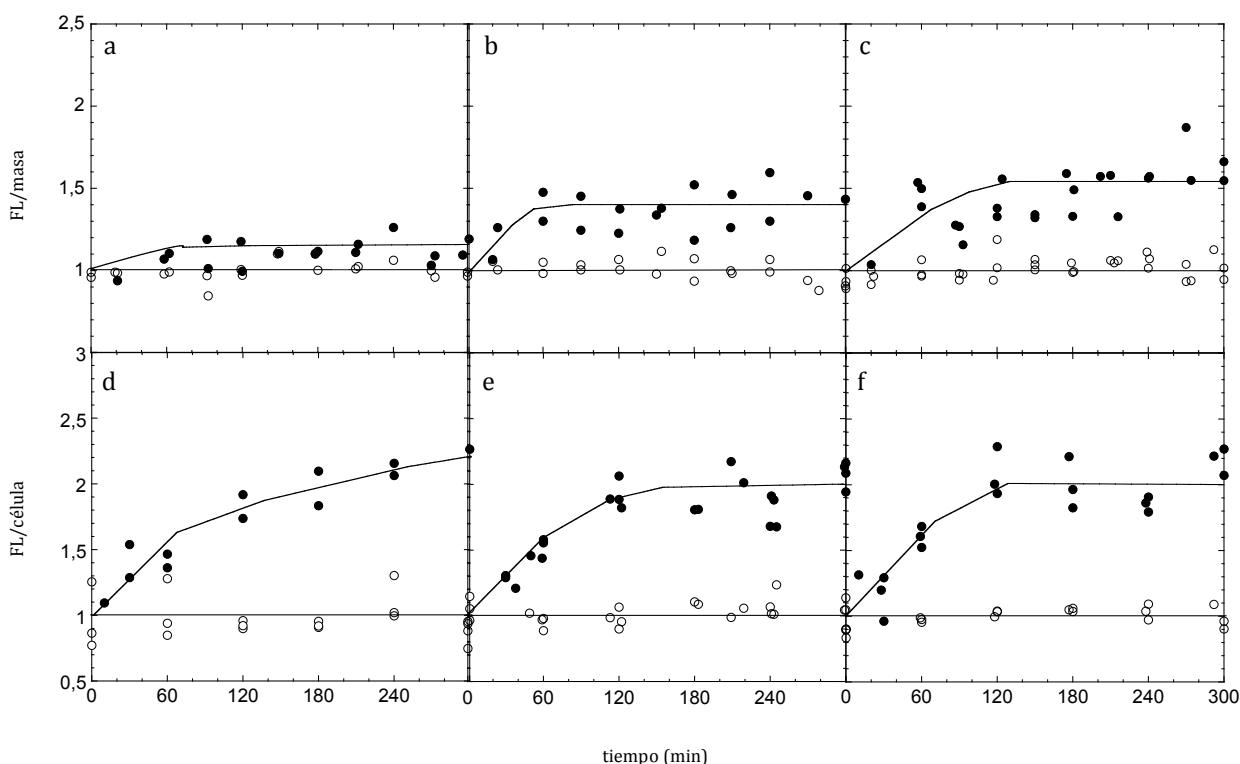


Figura 38. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría (a, b, c) y FL/célula obtenida por citometría de flujo (d, e, f) en las estirpes ALO1465 (a, d), ALO1459 (b, e) y ALO1469 (c, f), portadoras de los plásmidos pALO280 (F), pALO270 (P1 $\Delta incA$) y pALO284 (pSC101), respectivamente, durante el crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia.

2.1.3. Inducción de la replicación en plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido

Los RNA antisentido son pequeñas moléculas codificadas en el DNA del plásmido que al unirse a su diana específica pueden ejercer control sobre la regulación de la replicación, la estabilidad segregacional y la conjugación del propio plásmido (apartado 4.2.2 de Introducción).

En la Figura 39 se presenta el análisis del número de copias de plásmido por espectrofluorimetría y por citometría de flujo de la estirpe ALO1454 (a, d), portadora del plásmido pALO261 (R1) de bajo número de copias, y de las estirpes ALO1460 (b, e) y ALO1458 (c, f), portadoras de los plásmidos pALO275 (p15A) y pALO269 (pBR322), ambos de la familia ColE1 y de elevado número de copias. En todos los plásmidos estudiados se observa inducción de la replicación, aunque a diferentes niveles. Para el plásmido R1 se obtiene, después de 5 horas tras el cambio de temperatura, un aumento del número de copias del 30 % relativo a la masa, frente al 80 % que se obtiene por célula (Figura 39 a y d). En el caso de los plásmidos con elevado número de copias, el plásmido p15A presenta un aumento que varía entre el 100 % y el 190 % según se determine por espectrofluorimetría o por citometría de flujo (Figura 39 b y e); para pBR322 el aumento es del 65 % por masa, mientras que por célula asciende hasta un 360 % (Figura 39 c y f). Los aumentos del número de copias se recogen en la Tabla 19. En la Figura 37 c se muestra la distribución gaussiana de fluorescencia obtenida por citometría para los plásmidos con control por asRNA.

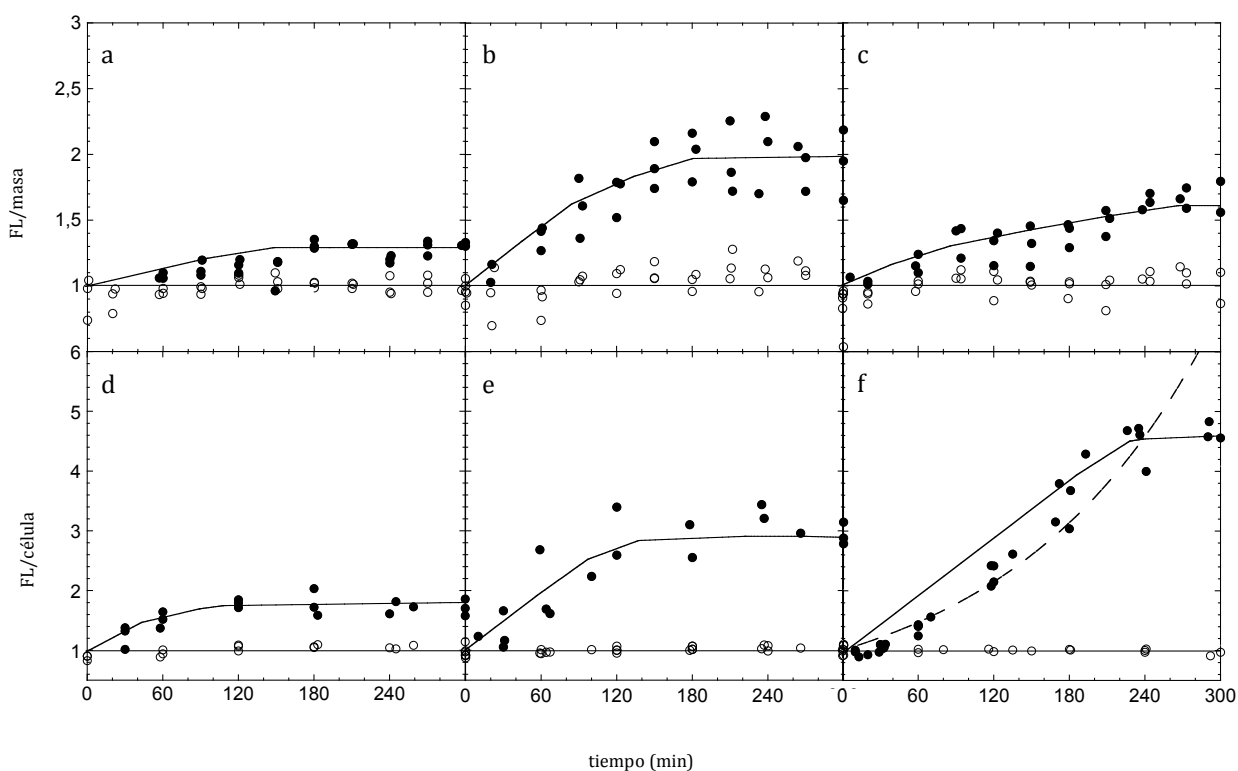


Figura 39. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría (a, b, c) y FL/célula obtenida por citometría de flujo (d, e, f) en las estirpes ALO1454 (a, d), ALO1460 (b, e) y ALO1458 (c, f), portadoras de los plásmidos pALO261 (R1), pALO275 (p15A) y pALO269 (pBR322), respectivamente, durante el crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia.

En el caso del plásmido pALO269 (pBR322), los valores obtenidos de su análisis por citometría, tras el cambio de temperatura, parecen ajustarse a un incremento exponencial y no a las curvas de acumulación obtenidas en el resto de los casos (Figura 39 f, línea discontinua). Esta observación llevó a plantearse si el aumento del número de copias observado en los minicromosomas y plásmidos podía ser debido a una adaptación fisiológica a la nueva temperatura y no debido a una respuesta específica frente al estrés térmico (ver apartado 2.2 de Resultados).

2.1.4. Variación del tamaño celular por cambio de temperatura

Dada la diferencia entre los valores del aumento del número de copias de plásmido tras estrés térmico cuantificados por espectrofluorimetría (FL/masa) y por citometría de flujo (FL/célula), con el fin de interpretar la discrepancia observada se determinó el tamaño celular en cada estirpe estudiada, creciendo exponencialmente a 30 °C y tras el cambio en la temperatura de incubación a 41 °C. El aumento del tamaño celular tras el cambio a 41 °C podría justificar las diferencias observadas.

En los cultivos analizados por citometría de flujo, se utilizó el parámetro dispersión de luz (LS) para determinar el valor medio del tamaño celular (LS/célula), en las diferentes muestras. Los datos obtenidos para los cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C se hicieron relativos a la media obtenida para la estirpe MC1000, de la cual derivan el resto de las estirpes utilizadas por transformación. La variación en el tamaño de las células tras el cambio de temperatura y posterior crecimiento a 41 °C, durante las 4 horas siguientes, se presenta relativa al tamaño de cada estirpe creciendo a 30 °C. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 19. Todas las estirpes empleadas presentan un tamaño similar al de la estirpe control MC1000 cuando se mantienen creciendo a 30 °C, con excepción de la estirpe portadora del plásmido pALO261 (R1) que presenta un tamaño ligeramente superior (15 %). Tras el cambio a 41 °C, en la mayoría de las estirpes analizadas el tamaño celular se mantuvo invariable; las excepciones fueron la estirpe ALO1454, portadora de pALO261 (R1), para la que se observó un incremento en el tamaño celular del 21 %, y la estirpe ALO1458, portadora de pALO269 (pBR322), para la cual el incremento fue del 36 %. Por tanto, la variación del tamaño celular no justifica la discrepancia entre FL/masa y FL/célula; quizá la diferencia en la eficacia de la detección de fluorescencia entre las dos técnicas es la que lleva a la divergencia encontrada.

2.2. Número de copias de minicromosoma y plásmido en crecimiento exponencial a diferentes temperaturas

En el apartado 2.1 de Resultados se ha determinado la inducción de la replicación tras estrés térmico, que lleva al aumento del número de copias en todos los minicromosomas y plásmidos de *E. coli* analizados y que podría considerarse equivalente a HIR en el cromosoma. Con el fin de descartar que la inducción de replications extras en minicromosomas y plásmidos por el estrés térmico al que son sometidos los cultivos, con el cambio de temperatura de crecimiento de 30 °C a 41 °C, tenga relación con la temperatura de crecimiento y no con el estrés térmico, en este apartado se analiza el número de copias en cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C ó 41 °C. Se determinó el número de copias de minicromosoma y plásmidos en las estirpes estudiadas (Tabla 2), creciendo a las diferentes temperaturas, mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo (apartado 12 de Métodos).

Para el crecimiento de las estirpes se utilizó medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos al 0,1 % y arabinosa al 0,2 %, y con la adición del antibiótico correspondiente. Un cultivo nocturno crecido durante 24 horas a 30 °C se diluyó en tres volúmenes de medio fresco y cada uno se mantuvo creciendo a 30 °C, 37 °C ó 41 °C durante 24

Tabla 20. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) obtenidos por espectrofluorimetría en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente; a 30 °C, 37 °C y 41 °C (\pm desviación típica; n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	FL/masa			n
			30 °C	37 °C	41 °C	
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	107,06 \pm 54,30	146,53 \pm 61,00	155,54 \pm 69,04	3
ALO1465	pALO280	F	30,91 \pm 5,33	40,66 \pm 8,39	36,94 \pm 6,97	3
ALO1459	pALO270	P1 Δ <i>incA</i>	160,59 \pm 24,78	225,10 \pm 23,69	264,76 \pm 40,95	4
ALO1469	pALO284	pSC101	102,59 \pm 20,37	151,66 \pm 49,04	171,54 \pm 46,31	3
ALO1454	pALO261	R1	44,94 \pm 20,37	66,01 \pm 24,23	74,69 \pm 29,00	4
ALO1460	pALO275	p15A	400,77 \pm 102,12	737,33 \pm 233,84	863,97 \pm 375,73	5
ALO1458	pALO269	pBR322	910,19 \pm 109,27	1121,71 \pm 572,58	826,49 \pm 672,21	7

horas. El tercer día, cada cultivo se diluyó nuevamente en medio fresco precalentado a la misma temperatura a la que había estado creciendo y al alcanzar una absorbancia entre 0,06 y 0,08, se comenzó la toma de muestras (apartado 12 de Métodos). De este modo se asegura que se está estudiando la misma colonia bacteriana original en las tres condiciones de temperatura y se estabiliza la fisiología bacteriana a las diferentes temperaturas de crecimiento antes de comenzar la toma de muestras.

Durante el crecimiento exponencial todas las estirpes mantuvieron constante las relaciones FL/masa y FL/célula a todas las temperaturas de incubación estudiadas. En las Tablas 20 y 21 se presentan los resultados obtenidos, indicando su valor medio absoluto a lo largo del crecimiento para cada temperatura. Para la mayoría de las estirpes analizadas se observa un incremento en los parámetros FL/masa y FL/célula dependiente del aumento de la temperatura de incubación. La excepción es la estirpe que lleva el plásmido pALO269 (pBR322), para la que se observa una disminución de la fluorescencia en el crecimiento a 41 °C con respecto a 37 °C. El incremento de la fluorescencia dependiente del aumento de la temperatura de incubación observado en la mayoría de las estirpes pone de manifiesto que las replications inducidas tras el cambio de temperatura de 30 °C a 41 °C observadas en el apartado 2.1 de Resultados posiblemente no estén determinadas tanto por el estrés térmico al que se someten los cultivos, sino por el cambio de la fisiología celular para la adaptación a la nueva temperatura de crecimiento.

Con el propósito de comparar la diferencia en la inducción de la replicación observada tras estrés térmico por cambio de temperatura con el incremento del número de copias al aumentar la temperatura de incubación durante el crecimiento exponencial, en la Tabla 22 se recogen las relaciones en tanto por uno de la inducción de la replicación por cambio de temperatura y los incrementos en crecimiento exponencial a 37 °C y 41 °C relativos a 30 °C. En

Tabla 21. Valores medios de fluorescencia por célula (FL/célula) obtenidos por citometría de flujo en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente; a 30 °C, 37 °C y 41 °C para los diferentes minicromosomas y plásmidos estudiados (\pm desviación típica; n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	FL/célula			n
			30 °C	37 °C	41 °C	
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	4,20 \pm 1,11	5,78 \pm 1,30	6,86 \pm 1,92	3
ALO1465	pALO280	F	0,78 \pm 0,10	1,12 \pm 0,16	1,19 \pm 0,20	3
ALO1459	pALO270	P1 Δ <i>incA</i>	4,64 \pm 0,94	8,32 \pm 0,81	9,76 \pm 2,02	4
ALO1469	pALO284	pSC101	2,52 \pm 0,40	4,60 \pm 0,65	6,73 \pm 0,83	3
ALO1454	pALO261	R1	1,54 \pm 0,42	2,32 \pm 0,38	3,95 \pm 1,32	4
ALO1460	pALO275	p15A	17,66 \pm 2,68	44,83 \pm 10,57	74,13 \pm 14,28	5
ALO1458	pALO269	pBR322	38,00 \pm 8,58	103,42 \pm 32,07	67,97 \pm 65,55	7

Tabla 22. Incremento del número de copias de plásmido tras el cambio de 30 °C a 41 °C y en crecimiento exponencial a 37 °C y a 41 °C con relación al crecimiento a 30 °C en las estirpes indicadas.

Estirpe	Plásmido	Replicón	Espectrofluorimetría			Citometría de flujo		
			Cambio de temperatura →41 °C	Exponencial		Cambio de temperatura →41 °C	Exponencial	
				37 °C	41 °C		37 °C	41 °C
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	1,35	1,28	1,32	1,65	1,39	1,63
ALO1465	pALO280	F	1,13	1,28	1,18	2,20	1,44	1,52
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	1,39	1,45	1,75	2,00	1,85	2,09
ALO1469	pALO284	pSC101	1,55	1,45	1,68	2,00	1,83	2,44
ALO1454	pALO261	R1	1,30	1,37	1,52	1,80	1,52	2,52
ALO1460	pALO275	p15A	2,00	1,80	2,86	2,90	2,56	4,45
ALO1458	pALO269	pBR322	1,65	1,24	0,88	4,60	2,84	2,09

esta Tabla se muestra de forma evidente el aumento en la fluorescencia, tanto por masa como por célula, dependiente de la temperatura exponencial de crecimiento, para todas las estirpes estudiadas. En casi todos los casos, el aumento del número de copias por crecimiento exponencial a 41 °C en relación al de 30 °C es superior al que se observa tras el cambio de 30 °C a 41 °C. Estos resultados parecen indicar que la inducción de la replicación observada no es debida al cambio de temperatura aplicado, sino que parece ser una respuesta de adaptación a la nueva temperatura de crecimiento.

El único caso en el que la inducción por cambio de temperatura es superior a la que se obtiene al aumentar la temperatura en crecimiento exponencial, tanto por espectrofluorimetría como por citometría de flujo, es en el caso del plásmido pALO269 (pBR322). Sorprende obtener este resultado para un plásmido derivado de ColE1 cuando para el plásmido pALO275 (replicón p15A), de la misma familia, se observa el efecto contrario. En el apartado 2.4 de Resultados se muestran los perfiles de inestabilidad de la doble hélice en la secuencia del origen de replicación de ColE1, p15A y pBR322 (Figura 43), que presentan diferencias entre estos orígenes que serán discutidas posteriormente.

2.2.1. Tamaño celular durante el crecimiento exponencial a diferentes temperaturas

Del mismo modo que se presenta en el análisis del cambio de temperatura de 30 °C a 41 °C (apartado 2.1.4 de Resultados), se estudió la variación del tamaño celular en las diferentes estirpes portadoras de minicromosoma o plásmidos en las condiciones de crecimiento exponencial a 30 °C, 37 °C y 41 °C. Por citometría de flujo se recogieron los datos de dispersión de luz (LS) de muestras de cultivos, a lo largo del crecimiento exponencial a las temperaturas estudiadas, y se determinó el valor medio de cada histograma LS. Para obtener un valor final del tamaño celular (LS/célula) de cada estirpe a cada temperatura, se calculó la media de los valores medios de los histogramas LS de las muestras tomadas de cada cultivo, a lo largo del crecimiento. En la Tabla 23 se presentan los tamaños celulares relativos calculados respecto al tamaño celular de cada estirpe a 30 °C. En todos los casos, a 37 °C el tamaño celular se mantuvo constante con respecto al valor a 30 °C. Sin embargo en el crecimiento exponencial a 41 °C, aunque algunas estirpes mantuvieron el tamaño invariable (las que contenían los plásmidos pALO267 (*oriC sopABC*) y pALO270 (P1 *ΔincA*)), para la mayoría de los plásmidos el tamaño de sus células portadoras aumentó, aunque en diferente proporción: siendo menor cuando el plásmido pertenece al grupo de control por iterones (12 % para los plásmidos pALO280 (F) y pALO284 (pSC101)), que cuando la regulación de la replicación es por RNA antisentido (36 % para el plásmido pALO275 (p15A)).

Tabla 23. Tamaño celular relativo obtenido por citometría de flujo (LS/célula) en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente; a 30 °C, 37 °C y 41 °C para los diferentes minicromosomas y plásmidos estudiados (n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	Tamaño celular (LS/célula) *			
			30 °C	37 °C	41 °C	n
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	1,00	0,98	1,04	3
ALO1465	pALO280	F	1,00	1,01	1,12	3
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	1,00	0,99	0,98	4
ALO1469	pALO284	pSC101	1,00	1,02	1,12	3
ALO1454	pALO261	R1	1,00	1,03	1,23	4
ALO1460	pALO275	p15A	1,00	0,99	1,36	5
ALO1458	pALO269	pBR322	1,00	1,23	1,25	7

* Tamaño celular relativo a la media obtenida para cada estirpe a 30 °C.

2.3. Número de copias de plásmido a distintas velocidades de crecimiento

Dado que las estirpes portadoras de minicromosoma o plásmidos creciendo a diferentes temperaturas presentan un número de copias de estos replicones que, en general, aumenta al aumentar la temperatura de incubación del cultivo, nos preguntamos si esta respuesta es un efecto directo de la temperatura de incubación o es debida a la distinta velocidad de crecimiento del cultivo. Parámetros importantes del ciclo celular bacteriano dependen de la velocidad de crecimiento, como el tamaño celular, el número de copias de un gen, o el nivel de expresión génica (Bremer y Dennis, 1996; Klumpp *et al.*, 2009; Schaechter *et al.*, 1958). En plásmidos, el número de copias puede mostrar fuerte dependencia de la velocidad de crecimiento por la influencia de ésta sobre el control de la replicación (Klumpp, 2011).

En este apartado se presenta el análisis del efecto de la variación de la velocidad de crecimiento sobre el número de copias de plásmido. La variación de la velocidad de crecimiento de los cultivos se obtuvo por incubación a distintas temperaturas y por crecimiento en diferentes medios.

2.3.1. Variación de la velocidad de crecimiento debida a la temperatura

Los datos FL/masa y FL/célula presentados en las Tablas 20 y 21) se hicieron relativos, para cada parámetro, a los que presenta la estirpe ALO1465 portadora del plásmido pALO280 (F) a 37 °C. Los valores obtenidos representan el número relativo de copias de cada plásmido (pcn relativo), en este caso, relativo al plásmido pALO280 (F) a 37 °C. Considerando los parámetros FL/masa y FL/célula, se determinan así el número relativo de copias de plásmido por masa (pcn/masa) y número relativo de copias de plásmido por célula (pcn/célula), respectivamente. Los tiempos de generación de cada cultivo analizado y a cada temperatura se presentan en la Tabla 24; a partir de ellos se obtuvo el parámetro velocidad de crecimiento, μ (apartado 1 de Métodos).

Tabla 24. Tiempo de generación (τ) de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente; a 30 °C, 37 °C y 41 °C (n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	τ (min)			
			30 °C	37 °C	41 °C	n
ALO1456	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	90,42	66,00	63,57	7
ALO1465	pALO280	F	107,00	75,66	71,00	6
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	93,37	74,37	65,75	7
ALO1469	pALO284	pSC101	94,87	70,50	66,75	8
ALO1454	pALO261	R1	87,62	71,50	64,62	8
ALO1460	pALO275	p15A	111,60	100,50	95,35	10
ALO1458	pALO269	pBR322	125,00	102,80	99,80	10

Los valores relativos de pcn/masa y pcn/célula obtenidos se representaron frente a la velocidad de crecimiento de cada estirpe a 30 °C, 37 °C y 41 °C (Figura 40). Se observa una correlación lineal directa para ambos parámetros (pcn/masa y pcn/célula) y la velocidad de crecimiento, para la mayoría de los plásmidos; aumentando el número de copias cuando lo hace la velocidad de crecimiento, en función de la temperatura de incubación del cultivo. Los datos obtenidos para el plásmido pALO269 (pBR322), en el intervalo de velocidad de crecimiento estudiado, muestran, para ambos parámetros (pcn/masa y pcn/célula), un aumento inicial (pcn 37 °C/30 °C) seguido de una reducción (pcn 41 °C/37 °C).

2.3.2. Variación de la velocidad de crecimiento debida al medio

Para llevar a cabo este mismo análisis, pero variando la velocidad de crecimiento en función de la composición del medio de cultivo, se analizaron por espectrofluorimetría las estirpes ALO1465, ALO1459 y ALO1460, portadoras, respectivamente, de los plásmidos pALO280 (F), usado como referencia; pALO261 (R1), como plásmido de bajo número de copias; y pALO275 (p15A) como plásmido con alto número de copias. Las estirpes se crecieron a 37 °C en medio mínimo M9 con glucosa, glicerol o succinato al 0,4 % como fuente de carbono, suplementado con casaminoácidos al 0,1 % y con arabinosa al 0,2 %, y con la adición del antibiótico correspondiente. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 25. Los datos FL/masa se hicieron relativos a los que presenta la estirpe ALO1465, portadora del plásmido pALO280 (F), creciendo en el medio con glicerol y se representaron frente a la velocidad de crecimiento de cada estirpe en los tres medios de crecimiento (Figura 41). En todos los casos se observó dependencia del número de copias del plásmido en relación a la velocidad de crecimiento, pero al contrario que en el caso de la variación de la velocidad de crecimiento debida a la temperatura de incubación, se obtuvo una reducción del número de copias de plásmido al aumentar la velocidad de crecimiento. Mientras que para el plásmido pALO275 (p15A), de alto número de copias, se obtuvo una correlación lineal inversa de los parámetros representados, en el caso de los plásmidos de bajo número de copias, pALO261 (R1) y pALO275 (p15A), los datos obtenidos parecen indicar que a baja velocidad de crecimiento (medios con glicerol o succinato) el número de copias es estable y sólo disminuye cuando la velocidad de crecimiento supera un umbral (medio con glucosa). La correlación entre el número de copias de plásmido y la velocidad de crecimiento ya ha sido descrita cuando la velocidad de crecimiento varía según el medio de cultivo, estableciéndose la correlación directa entre el número de copias de plásmido por célula y la velocidad de crecimiento (Lin-Chao y Bremer, 1986; Klumpp, 2011).

Por tanto, variando la velocidad de crecimiento por los dos métodos empleados, se observa que el número de copias de un plásmido depende de la velocidad de crecimiento, pero con tendencias opuestas para el caso de la variación por la temperatura o por el medio de cultivo.

Tabla 25. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) y tiempo de generación (τ) de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con distintas fuentes de carbono, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente, a 37 °C (\pm desviación típica; n = número de cultivos analizados).

Estirpe	Plásmido	Replicón	FL/masa			τ (min)			n
			M9 glucosa	M9 glicerol	M9 succinato	M9 glucosa	M9 glicerol	M9 succinato	
ALO1465	pALO280	F	15,54 \pm 1,93	40,75 \pm 7,67	37,93 \pm 3,91	47,66	74,13	77,66	3
ALO1454	pALO261	R1	20,44 \pm 4,93	70,89 \pm 18,06	71,51 \pm 4,50	52,50	70,40	111,50	3
ALO1460	pALO275	p15A	33,64 \pm 9,13	798,15 \pm 224,26	756,50 \pm 76,62	59,50	100,50	165,00	3

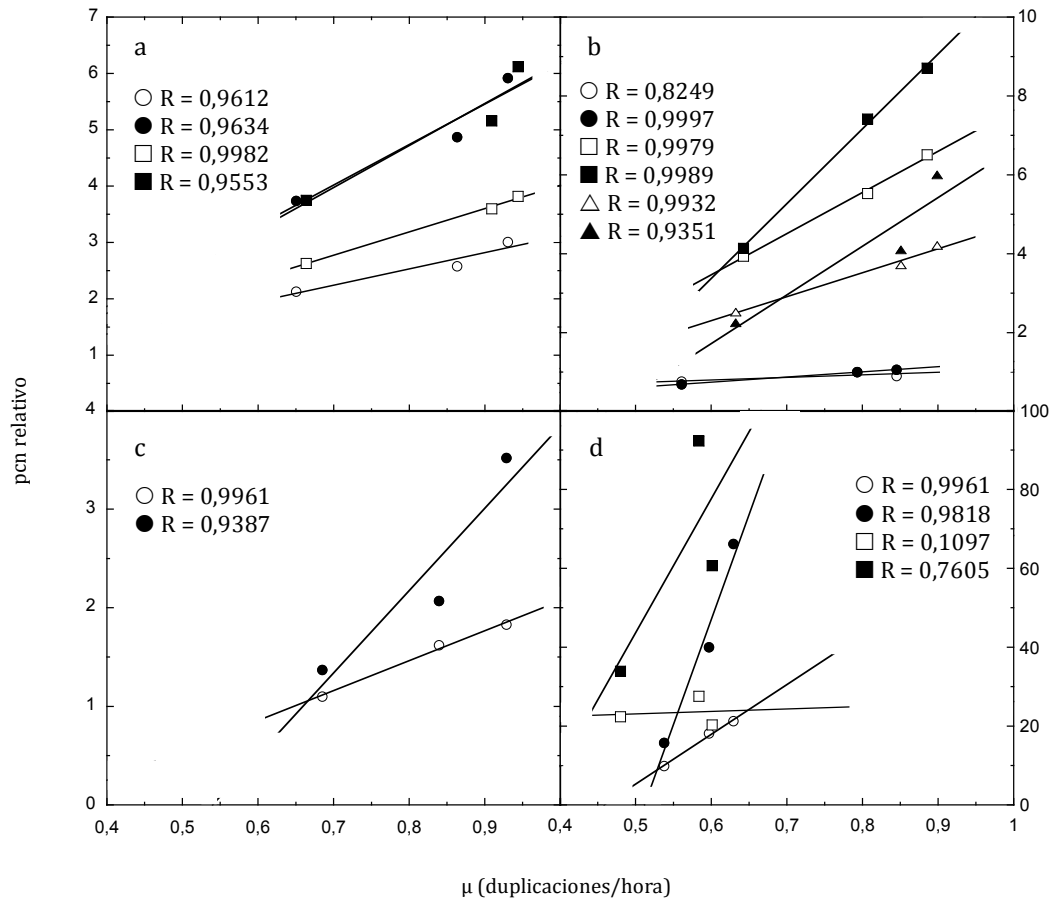


Figura 40. Número relativo de copias de minicromosoma o plásmido por masa (pcn/masa; símbolos abiertos) y por célula (pcn/célula; símbolos cerrados) en función de la velocidad de crecimiento (μ) en cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C y 41 °C en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente, de las estirpes portadoras de los minicromosomas o plásmidos (a) pALO264 (*oriC*; \circ) y pALO267 (*oriC sopABC*; \square), (b) pALO280 (F; \circ), pALO270 (P1 Δ incA; \square) y pALO284 (pSC101; \triangle), (c) pALO261 (R1), y (d) pALO275 (p15A; \circ) y pALO269 (pBR322; \square). El número de copias obtenido para pALO280 (F) a 37 °C se utilizó como referencia.

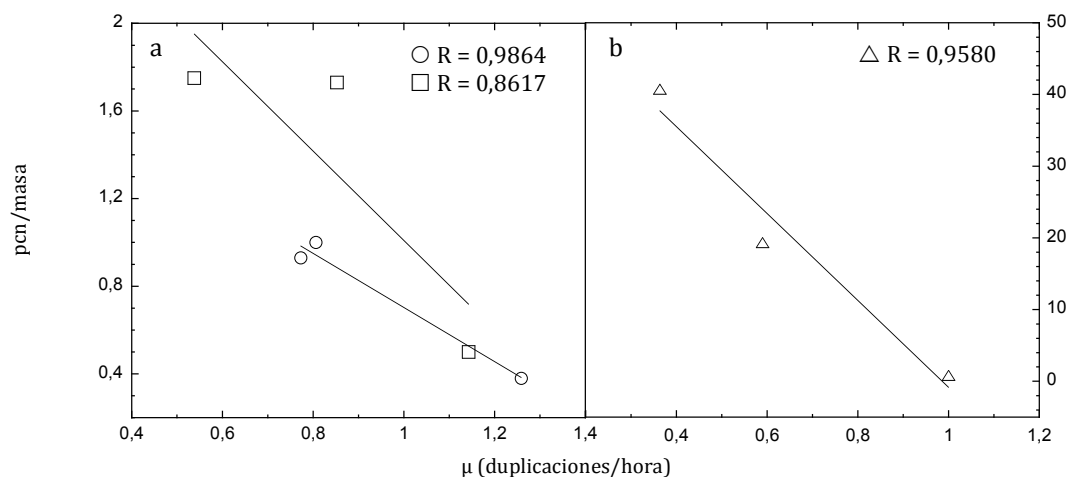


Figura 41. Número relativo de copias de plásmido por masa (pcn/masa) en función de la velocidad de crecimiento (μ) en cultivos creciendo exponencialmente a 37 °C en medio mínimo M9 con diferente fuente de carbono, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente, de las estirpes de los plásmidos pALO280 (F, \circ), pALO261 (R1, \square) y pALO275 (p15A, \triangle). El número de copias obtenido para pALO280 (F) creciendo en glicerol se utilizó como referencia.

2.4. Análisis de sitios SIDD en los orígenes de replicación de plásmidos

Los orígenes de replicación de todos los plásmidos estudiados contienen regiones ricas en pares AT, con repeticiones de secuencias análogas a los trecémeros de *oriC*, donde tiene lugar la apertura de la doble hélice de DNA previa al ensamblaje del replisoma (revisado en Rajewska *et al.*, 2012). En el apartado 1.2 de Resultados se muestra la existencia de sitios de desestabilización de la doble hélice inducida por estrés (SIDD) en los orígenes de las diferentes bacterias estudiadas (Figura 31). Del mismo modo, se analizó la presencia de sitios SIDD en los orígenes de replicación de todos los plásmidos estudiados.

Mediante el uso de la aplicación WebSIDD (Bi y Benham, 2004), se representó el perfil de desestabilización para los diferentes orígenes plasmídicos (Figuras 42 y 43). Las secuencias empleadas y su procedencia se recogen en la Tabla 4 en Materiales. En la Figura 43, además del origen de replicación del plásmido R1 (a), se presenta el análisis del origen de ColE1 (b) junto a los orígenes de p15A (c) y pBR322 (d), al presentar ciertas diferencias la secuencia de ambos plásmidos con respecto a la de ColE1 (Seizer *et al.*, 1983).

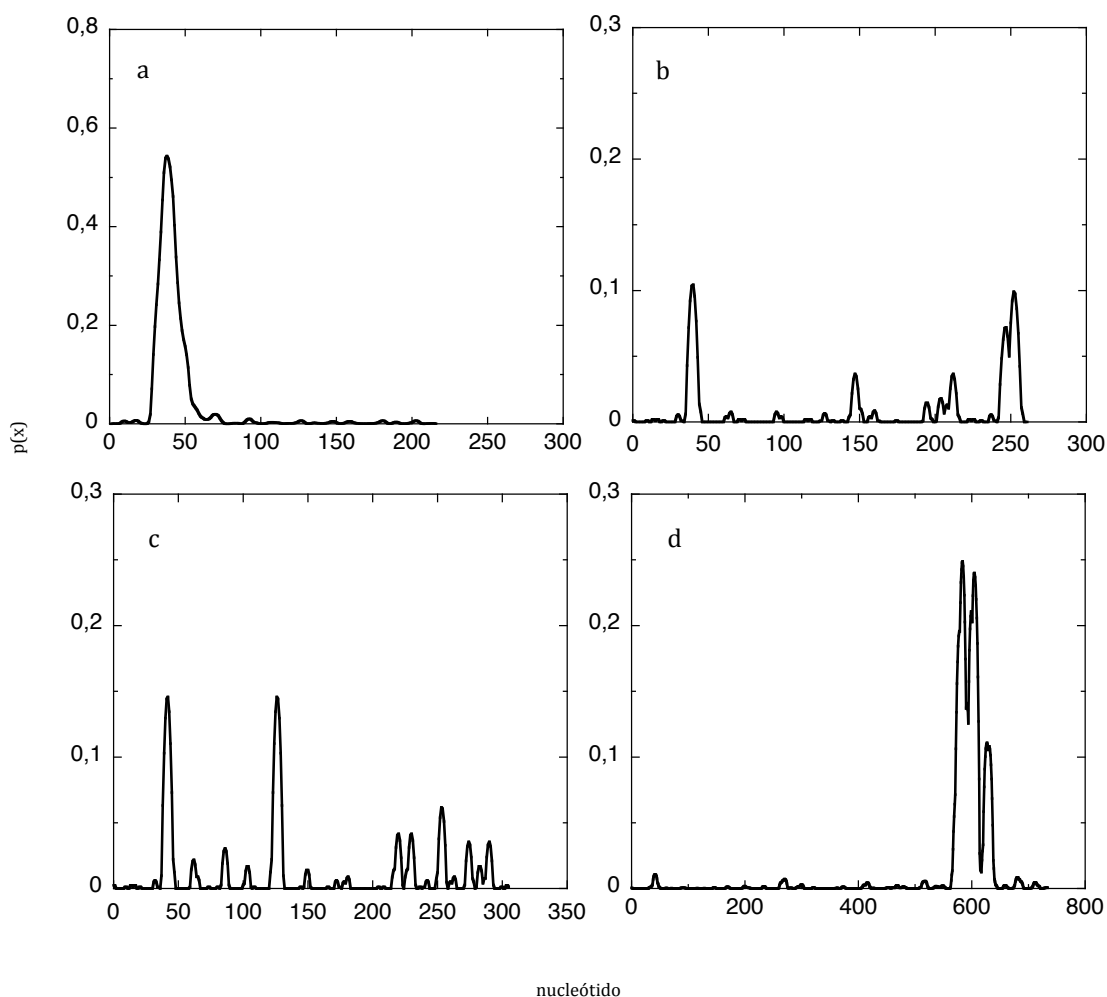


Figura 42. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice ($p(x)$) para la secuencia de los orígenes de replicación de los plásmidos con control de la replicación por iterones: F (*oriS*, a, y *oriV*, b), P1 Δ *incA* (*oriR*, c) y pSC101 (*ori*, d) (Tabla 3).

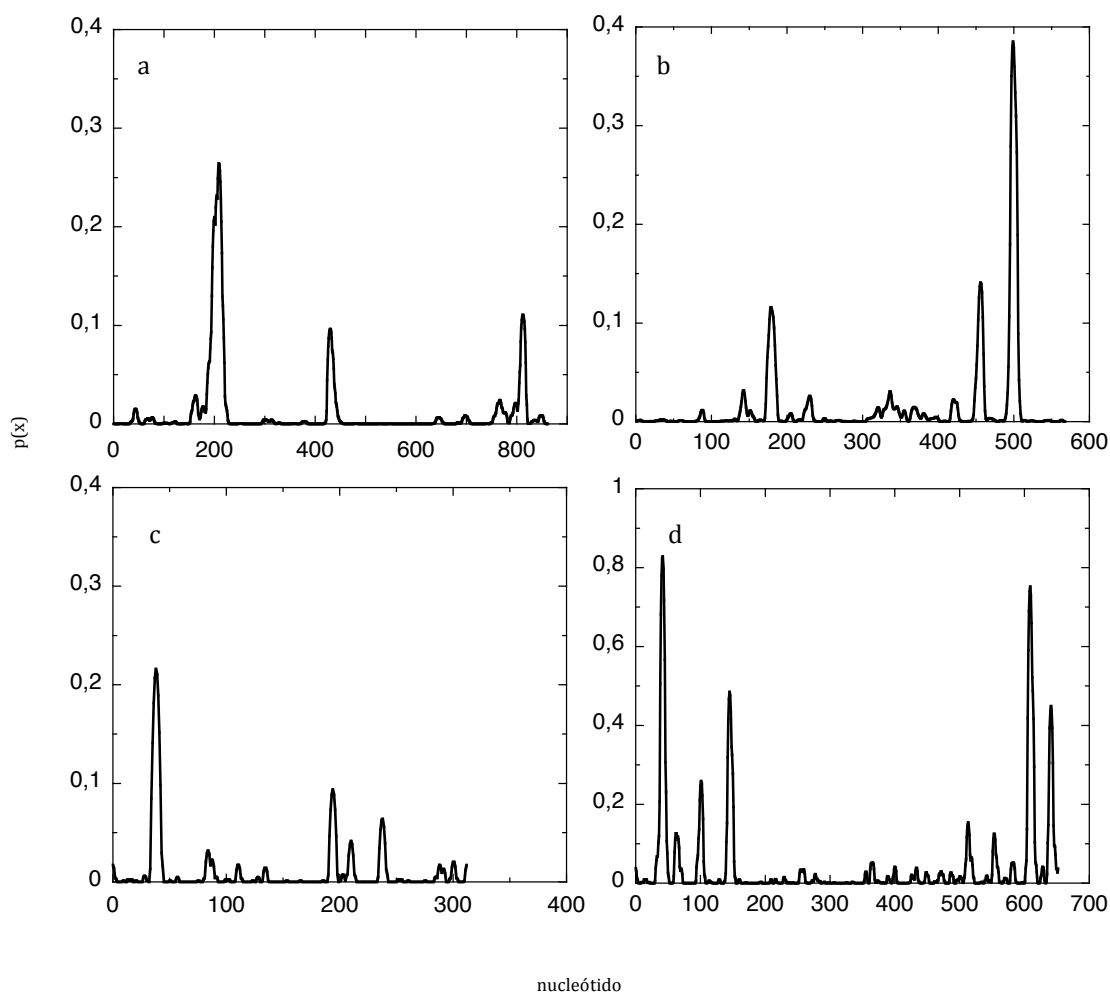


Figura 43. Perfil de probabilidad de desestabilización de la doble hélice ($p(x)$) para la secuencia de los orígenes de replicación de los plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido: R1 (*oriR1*, a), ColE1 (*ori*, b), y los derivados de ColE1 p15A (*ori*, c) y pBR322 (*ori*, d) (Tabla 3).

Se localizaron sitios SIDD en todas las secuencias analizadas. Los orígenes *oriS* de F y *ori* de pSC101 presentaron perfiles con sitios SIDD localizados en secuencias concretas, de manera análoga a los *oriC* de los cromosomas bacterianos; mientras que en el resto de orígenes, los sitios SIDD aparecen más dispersos. Hacer notar que en el caso de las secuencias de los orígenes de pSC101 y R1, las secuencias analizadas deben estar invertidas en relación a los esquemas para estos orígenes presentados en Introducción (Figuras 7 y 8).

2.5. Influencia de RecA en la replicación de plásmidos

Dado que en el apartado 1.5 de Resultados se ha mostrado que la proteína RecA es total o parcialmente requerida para la inducción de HIR en los cromosomas bacterianos (Tabla 18), en este apartado se presenta el estudio del efecto de la proteína RecA bacteriana sobre la replicación y el número de copias de los plásmidos en cultivos sometidos a estrés térmico, por el cambio en la temperatura de incubación de 30 °C a 41 °C, y en cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C y 41 °C.

Las estirpes analizadas se presentan en la Tabla 2 (serie BMC). Se aislaron el minicromosoma *oriC sopABC* y los plásmidos contenidos en las estirpes de la serie ALO de la Tabla 2 (apartado 5.2.1 de Métodos) y se transformaron las estirpes IC2319, *recA13*, y su estirpe parental, IC2320, que se usó como control de fondo genético (Tabla 2). La estirpe *recA13* presenta un fenotipo RecA nulo (Lauder y Kowalczykowski, 1993). Las transformaciones se realizaron mediante el método de cloruro cálcico, excepto en los casos de plásmidos de bajo número de copias que se llevaron a cabo por electroporación (apartado 9 de Métodos).

El análisis de estas estirpes se realizó por espectrofluorimetría (apartado 12.1 de Métodos). Los datos FL/masa se hicieron relativos a la media de la fluorescencia de las muestras procedentes del cultivo creciendo exponencialmente a 30 °C para cada estirpe.

2.5.1. Influencia de RecA en el número de copias por masa con cambio de temperatura

En este apartado se presenta el análisis de la dependencia de la proteína RecA en la replicación plasmídica en condiciones de estrés térmico. Se tomaron muestras a partir de cultivos creciendo exponencialmente a 30 °C y tras someter a una parte del cultivo a un cambio de temperatura a 41 °C al alcanzar un valor de absorbancia entre 0,06 y 0,08, medida a 488 nm.

En la Figura 44 se muestra la variación de FL/masa para el minicromosoma pALO267 (*oriC sopABC*). Se obtuvo un nivel de inducción del 25 % a 41 °C con respecto a 30 °C en la estirpe *recA13*, frente al 34 % de la estirpe parental. Por tanto, la proteína RecA funcional no es estrictamente necesaria para la inducción de la replicación tras estrés térmico en el minicromosoma estudiado.

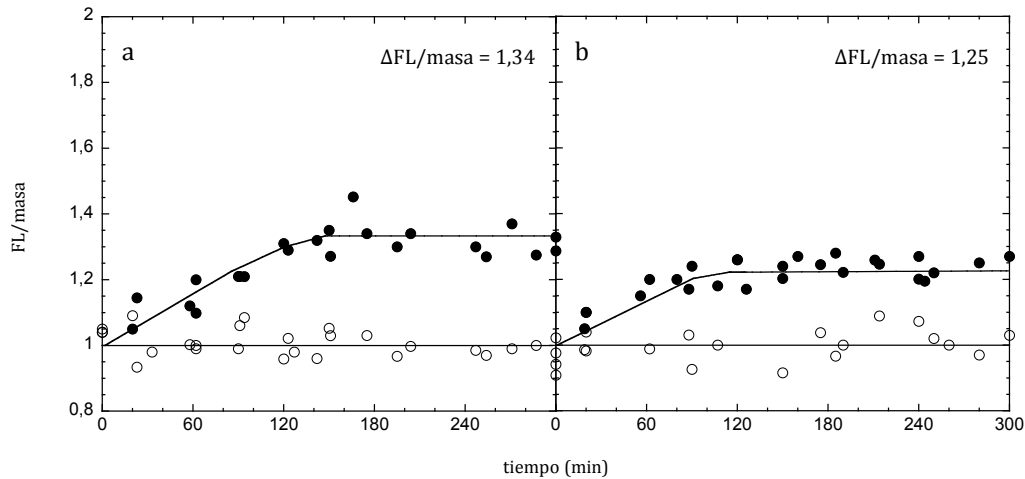


Figura 44. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría en las estirpes BMC17 (*recA+*) y BMC03 (*recA13*), portadoras del minicromosoma pALO267 (*oriC sopABC*; a y b, respectivamente), durante crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia. Se indica el incremento del número de copias de plásmido tras el cambio de temperatura ($\Delta FL/masa$).

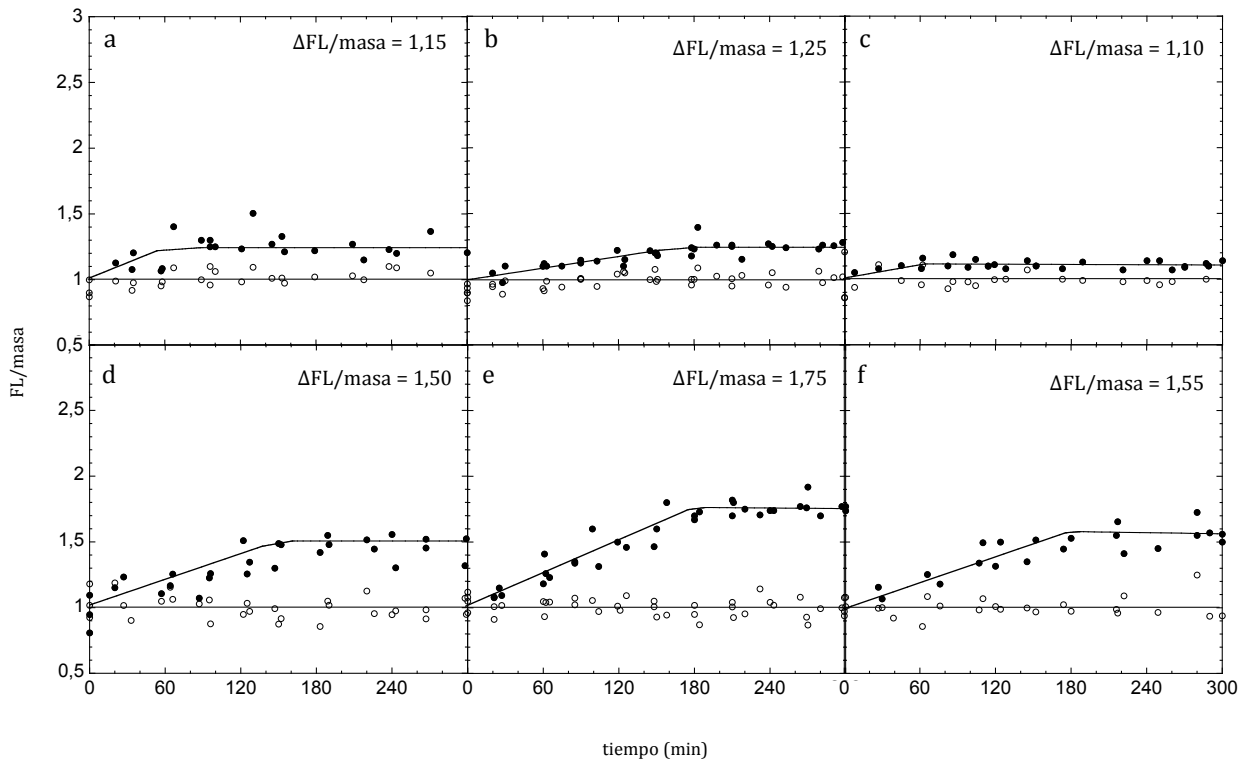


Figura 45. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría durante el crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●) en las estirpes portadoras de plásmidos controlados por iterones: BMC25 (*recA+*) y BMC11 (*recA13*), portadoras de pALO280 (F; a y d, respectivamente); BMC21 (*recA+*) y BMC07 (*recA13*), portadoras de pALO270 (P1 $\Delta incA$; b y e, respectivamente); y BMC27 (*recA+*) y BMC13 (*recA13*), portadoras de pALO284 (pSC101; c y f, respectivamente). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia. Se indica el incremento del número de copias de plásmido tras el cambio de temperatura ($\Delta FL/masa$).

En la Figura 45 se muestra la inducción de la replicación por cambio de temperatura en las estirpes *recA+* y *recA13* portadoras de los plásmidos con control de la replicación por iterones. En los tres plásmidos se observa una mayor inducción de la replicación en ausencia de RecA funcional. Para el plásmido pALO280 (F) se obtiene una inducción del 50 % en *recA13*, frente a un 15 % en la estirpe parental; para pALO270 (P1 $\Delta incA$), un 75 % frente a un 25 %; y para pALO284 (pSC101) las inducciones son del 55 % frente al 10 %, respectivamente. Por tanto, en ausencia de RecA, estos plásmidos inducen tras estrés térmico niveles de replicación de 3 a 5,5 veces superiores a los cuantificados en la estirpe parental.

Los resultados obtenidos en este análisis para los plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido se muestran en la Figura 46. De manera análoga a lo obtenido para los plásmidos controlados por iterones, en todos los plásmidos controlados por RNA antisentido la inducción de la replicación tras el cambio de temperatura fue mayor en la estirpe *recA13* que en la parental. Sin embargo, estos plásmidos presentan una menor diferencia entre la inducción alcanzada en *recA13* respecto a la alcanzada en la estirpe parental: la inducción de pALO261 (R1) aumentó 1,5 veces en *recA13* (un 30 % en *recA13* frente a un 20 % en *recA+*); pALO275 (p15A) aumentó 2 veces (50 % en *recA13* frente a 25 % en *recA+*); y pALO269 (pBR322) aumentó 2,5 veces (100 % en *recA13* frente a 40 % en *recA+*).

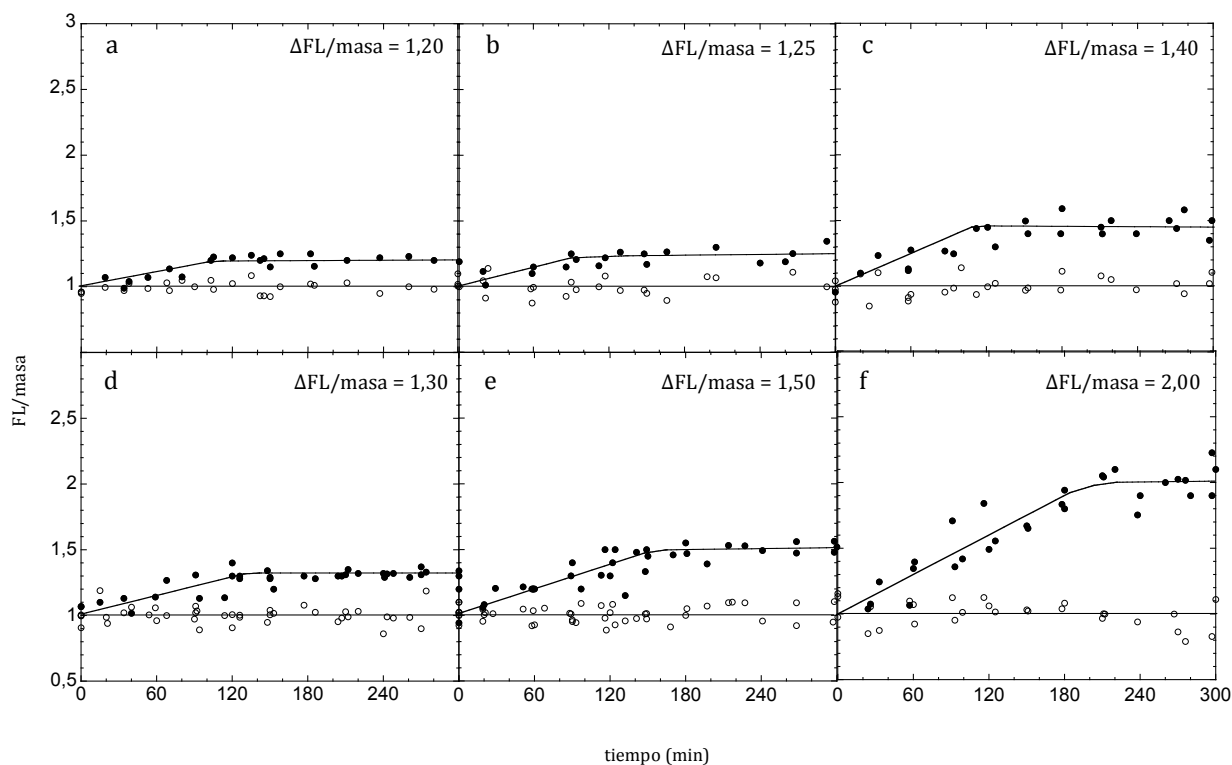


Figura 46. Relación FL/masa relativa obtenida por espectrofluorimetría durante el crecimiento exponencial a 30 °C (○) y tras el cambio de temperatura a 41 °C a tiempo cero (●) en las estirpes portadoras de plásmidos controlados por RNA antisentido: BMC15 (*recA+*) y BMC01 (*recA13*), portadoras de pALO261 (R1; a y d, respectivamente); BMC23 (*recA+*) y BMC09 (*recA13*), portadoras de pALO275 (p15A; b y e, respectivamente); y BMC19 (*recA+*) y BMC05 (*recA13*), portadoras de pALO269 (pBR322; c y f, respectivamente). El valor medio de la relación FL/masa de las muestras tomadas a 30 °C se utilizó como referencia. Se indica el incremento del número de copias de plásmido tras el cambio de temperatura (Δ FL/masa).

Por tanto, la inducción de la replicación por cambio de temperatura parece ser parcialmente dependiente de la función de RecA en el minicromosoma pALO267 (*oriC sopABC*); mientras que en los plásmidos analizados, el nivel de inducción de la replicación aumenta en ausencia de la proteína RecA funcional.

2.5.2. Influencia de RecA en el número de copias por masa en cultivos exponenciales

En el apartado 2.2 de Resultados se determinó que, para la mayoría de los plásmidos estudiados, la inducción de los inicios de replicación que se observó tras el cambio de la temperatura de incubación del cultivo está determinado en mayor medida por la temperatura de crecimiento del cultivo que por el estrés térmico. Considerando los resultados obtenidos en el apartado anterior, se planteó el estudio de la función de RecA en la replicación de los plásmidos analizados durante el crecimiento exponencial a distintas temperaturas.

Para el análisis en estas condiciones de las estirpes de la serie BMC (Tabla 2), a partir de un cultivo nocturno de 24 horas crecido a 30 °C, se hicieron diluciones en tres volúmenes de medio fresco y cada uno se incubó de nuevo durante 24 horas a 30 °C, 37 °C y 41 °C. El tercer día, cada uno de estos cultivos se diluyó nuevamente en medio fresco a la misma temperatura

Tabla 26. Valores medios de fluorescencia corregida por masa (FL/masa) obtenidos por espectrofluorimetría en cultivos de las estirpes indicadas creciendo exponencialmente a 30 °C, 37 °C y 41 °C; y número de copias relativo en las estirpes *recA+* respecto a las *recA13* para cada plásmido y a cada temperatura (*recA+/recA13*; n = número de cultivos analizados; ND = no determinado).

Estirpe portadora	Plásmido	Replicón	FL/masa			<i>recA+/recA13</i>			n
			30 °C	37 °C	41 °C	30 °C	37 °C	41 °C	
BMC17 (<i>recA13</i>)	pALO267	<i>oriC sopABC</i>	38,08	50,66	ND	1,10	0,98	-	3
BMC03 (<i>recA+</i>)			42,12	49,68	55,77				3
BMC11 (<i>recA13</i>)	pALO280	F	71,83	107,01	105,35	1,57	1,44	-	3
BMC25 (<i>recA+</i>)			110,88	154,25	ND				3
BMC07 (<i>recA13</i>)	pALO270	P1 Δ <i>incA</i>	312,05	641,17	814,33	1,83	1,72	-	4
BMC21 (<i>recA+</i>)			571,92	1100,90	ND				4
BMC13 (<i>recA13</i>)	pALO284	pSC101	170,03	307,49	294,55	1,16	1,01	2,10	3
BMC27 (<i>recA+</i>)			198,40	310,80	619,43				3
BMC01 (<i>recA13</i>)	pALO261	R1	99,26	126,01	157,12	1,27	1,31	1,13	5
BMC15 (<i>recA+</i>)			126,28	165,42	176,88				3
BMC09 (<i>recA13</i>)	pALO275	p15A	1237,44	2017,83	1422,63	2,02	0,05	-	6
BMC23 (<i>recA+</i>)			2498,47	107,27	ND				4
BMC05 (<i>recA13</i>)	pALO269	pBR322	1734,07	51,14	76,09	0,90	7,42	6,03	6
BMC19 (<i>recA+</i>)			1558,28	379,72	458,63				6

de incubación previa y cuando alcanzaron una absorbancia entre 0,06 y 0,08, medida a 488 nm, se procedió a la toma de muestras y su análisis por espectrofluorimetría (apartado 12.1.1 de Métodos).

Los cultivos mantuvieron la relación FL/masa constante a lo largo del crecimiento exponencial a las diferentes temperaturas. En la Tabla 26 se presentan los valores FL/masa medios de cada cultivo. A partir de estos datos se obtuvo el número de copias relativo en las estirpes *recA+* respecto a las *recA13*, para cada plásmido y a cada temperatura, dividiendo el valor FL/masa de la estirpe *recA+* entre este valor de *recA13*.

El minicromosoma pALO267 (*oriC sopABC*) presenta el mismo número de copias en la estirpe parental *recA+* que en el mutante *recA13*, tanto a 30 °C (1,10) como a 37 °C (0,98). En el caso de los plásmidos, para la mayoría se obtuvo que el número de copias es más alto en la estirpe parental *recA+*, a cualquier temperatura de crecimiento. Excepcionalmente, el número de copias del plásmido pALO275 (p15A) a 37 °C, se reduce en la estirpe *recA+* con respecto a la estirpe *recA13*. Las diferentes temperaturas de crecimiento no parecen tener efecto en la relación estudiada (FL/masa *recA+* / FL/masa *rec13*), ya que los valores de esta relación se mantienen aproximadamente constantes para cada plásmido, con algunas excepciones (pALO284 (pSC101) a 41 °C, sube la relación; pALO261 (R1) a 41 °C, baja la relación; y pALO269 (pBR322)). En el caso de pALO269 (pBR322) es destacable el aumento relativo de su número de copias en la estirpe parental, respecto a la estirpe *recA13*, a 37 °C (7,42) y a 41 °C (6,03), cuando a 30 °C la relación es próxima a 1 (0,90).

Por tanto, en contraste con los resultados obtenidos en el estudio del cambio de temperatura, en crecimiento exponencial a diferentes temperaturas, la ausencia de la proteína RecA lleva a una bajada en el número de copias de plásmido; el minicromosoma presenta igual número de copias en presencia o ausencia de RecA funcional.

2.6. Determinación del número de copias de plásmido por qPCR

En las últimas décadas la técnica qPCR se ha asentado como un método útil para la cuantificación de la dosis génica, la expresión génica y el número de copias de plásmido (Carapuça *et al.*, 2007; Hildebrand *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2006; Rebrikov y Trofimov, 2006). Con el objetivo de validar las técnicas espectrofluorimetría y citometría de flujo utilizadas en

este trabajo para la determinación del número de copias de plásmido, se hizo uso de la qPCR. Se determinó el número de copias de plásmido mediante la cuantificación de la secuencia del gen *GFPmut2*, presente en todos los plásmidos estudiados, amplificada por la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2* (apartado 13.4 de Métodos; Tabla 3). Se analizaron por qPCR los plásmidos con control de la replicación por iterones pALO280 (F), pALO270 (P1 $\Delta incA$) y pALO284 (pSC101), y los plásmidos con control de la replicación por RNA antisentido pALO261 (R1), pALO275 (p15A) y pALO269 (pBR322) (serie ALO en Tabla 2).

2.6.1. Validación del método: curvas estándar y eficiencia de la reacción

Para asegurar la eficiencia de las reacciones con el par de cebadores empleado para la amplificación de *GFPmut2*, se elaboraron las rectas estándar de calibración, tanto para reacciones con DNA plasmídico aislado y purificado, como para reacciones con muestras de células. La preparación de las muestras de DNA plasmídico y de suspensiones celulares se detalla en el apartado 13.1 de Métodos. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, utilizando el kit para qPCR DyNAmo Flash Sybr Green de Thermo Scientific (apartado 13.2 de Métodos).

Para el análisis de las reacciones de qPCR se estableció un umbral de fluorescencia, mediante el software iCycler de Bio-Rad, para cada grupo de reacciones que conformaran una recta de calibrado. Los umbrales determinados se muestran en las Tablas 27 y 28. Estos umbrales se utilizaron posteriormente para determinar los Ct de las muestras problema.

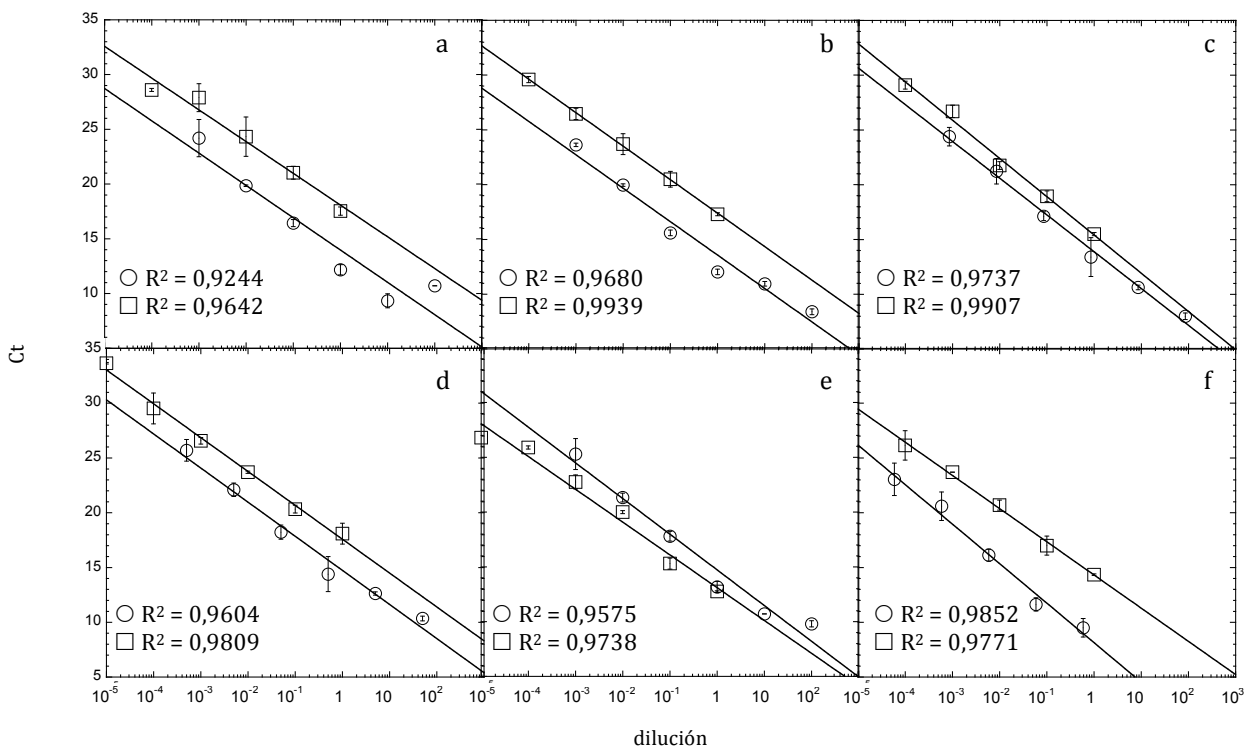


Figura 47. Rectas de calibrado de las reacciones de qPCR obtenidas por regresión lineal de la representación de la media de ciclo umbral obtenido (Ct, *threshold cycle*) frente a la dilución empleada a partir de muestras de DNA plasmídico purificado (○) y de muestras de células (□) para la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2*. (a) pALO280 (F), ALO1465; (b) pALO270 (P1 $\Delta incA$), ALO1459; (c) pALO284 (pSC101), ALO1469; (d) pALO261 (R1), ALO1454; (e) pALO275 (p15A), ALO1460; (f) pALO269 (pBR322), ALO1458. Se muestran las barras de error para los valores de Ct y los coeficientes de correlación lineal R².

Para obtener las rectas estándar de calibrado por regresión lineal, los Ct obtenidos en las reacciones se representaron frente a la dilución empleada (apartado 13.3 de Métodos; Figura 47). La desviación estándar del triplicado de cada muestra siempre presentó valores inferiores al 13 %; el coeficiente de correlación R^2 para cada uno de los plásmidos, en los dos tipos de muestra estudiados, en todos los casos fue próximo a 1.

En la Tabla 27 se presentan para cada plásmido aislado el rango dinámico de detección de DNA conseguido, el umbral fijado por el software iCycler, la pendiente de la recta estándar, y la eficiencia de las reacciones expresada según la ecuación de Rasmussen y en tanto por ciento (Rasmussen, 2001). En todos los casos se obtuvieron eficiencias próximas al 100 %, alcanzando hasta un 15 % de desviación estándar. Las eficiencias obtenidas para las reacciones con suspensiones celulares se recogen en la Tabla 28, junto con el rango de detección en función de la absorbancia del cultivo a 488 nm, el umbral definido por el software iCycler y la pendiente obtenida en la recta de calibración. Las eficiencias se mantienen en todos los casos estudiados alrededor del 100 %, con hasta un 15 % de desviación estándar.

La obtención de eficiencias similares y próximas al 100 % en ambos tipos de reacciones, para todos los plásmidos estudiados, permitió en los análisis posteriores simplificar la preparación de las muestras. Se prescindió del aislamiento, purificación y cuantificación del DNA plasmídico que, a la vez de ser un proceso más laborioso, resulta en la pérdida de material genético, y se procedió al análisis directo de células completas por qPCR.

Tabla 27. Eficiencia de la reacción de qPCR, expresada según la ecuación de Rasmussen (2001) y en tanto por ciento (E y %), para la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2* con muestras de DNA plasmídico purificado de los plásmidos indicados. Se muestra el rango lineal de detección conseguido en cada caso, el umbral fijado por iCycler para optimizar la cuantificación de la fluorescencia y la pendiente de la recta de calibrado.

Plásmido	Replicón	Rango de detección (ng de DNA)	Umbral iCycler	Pendiente de la recta	Eficiencia	
					E^*	%
pALO280	F	$1,00 \cdot 10^{-3}$ – 100	194,0	-3,2777	2,01	101,87
pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	$1,00 \cdot 10^{-3}$ – 100	248,8	-3,0646	2,11	111,98
pALO284	pSC101	$0,85 \cdot 10^{-3}$ – 85	99,7	-3,3463	1,98	98,99
pALO261	R1	$0,50 \cdot 10^{-3}$ – 50	432,8	-3,1275	2,08	108,80
pALO275	p15A	$1,00 \cdot 10^{-3}$ – 100	324,9	-3,2846	2,01	101,58
pALO269	pBR322	$1,18 \cdot 10^{-3}$ – 118	245,1	-3,6067	1,89	89,35

* Eficiencia de la reacción según la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Rasmussen, 2001).

Tabla 28. Eficiencia de la reacción de qPCR, expresada según la ecuación de Rasmussen (2001) y en tanto por ciento (E y %), para la pareja de cebadores *gfp1* y *gfp2* con muestras de células de las estirpes indicadas. Se muestra el rango lineal de detección conseguido en cada caso, el umbral fijado por iCycler para optimizar la cuantificación de la fluorescencia y la pendiente de la recta de calibrado.

Estirpe	Plásmido	Replicón	Rango de detección (masa por A_{488})	Umbral iCycler	Pendiente de la recta	Eficiencia	
						E^*	%
ALO1465	pALO280	F	$0,337 \cdot 10^{-4}$ – 0,337	175,9	-2,9900	2,15	115,99
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	$0,226 \cdot 10^{-4}$ – 0,226	185,8	-3,0913	2,10	110,63
ALO1469	pALO284	pSC101	$0,325 \cdot 10^{-4}$ – 0,325	186,0	-3,4950	1,93	93,91
ALO1454	pALO261	R1	$0,335 \cdot 10^{-5}$ – 0,335	223,6	-3,1080	2,09	109,77
ALO1460	pALO275	p15A	$0,252 \cdot 10^{-5}$ – 0,252	151,5	-3,1466	2,07	107,87
ALO1458	pALO269	pBR322	$0,262 \cdot 10^{-4}$ – 0,262	151,5	-3,0591	2,12	112,27

* Eficiencia de la reacción según la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Rasmussen, 2001).

Tabla 29. Número de copias de plásmido por reacción (pcn/reacción) obtenido por qPCR, y transformación en número de copias por masa (pcn/masa) y por célula (pcn/célula) considerando los valores de A_{488} y cfu/ml en cultivos exponenciales de las estirpes indicadas, creciendo en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente, a 37 °C (\pm desviación típica; n = número de cultivos analizados). Se indica el tamaño de cada plásmido en pares de bases (pb).

Estirpe	Plásmido	Replicón	Tamaño plásmido (pb)	pcn/reacción ^a	pcn/masa ^b	pcn/célula	n
ALO1465	pALO280	F	12784	$1,10 \cdot 10^6$ $\pm 0,38 \cdot 10^6$	$7,75 \cdot 10^6$	0,87	3
ALO1459	pALO270	P1 <i>ΔincA</i>	6579	$10,06 \cdot 10^6$ $\pm 7,66 \cdot 10^6$	$55,31 \cdot 10^6$	5,77	3
ALO1469	pALO284	pSC101	8625	$30,13 \cdot 10^6$ $\pm 15,82 \cdot 10^6$	$152,72 \cdot 10^6$	10,36	3
ALO1454	pALO261	R1	7325	$1,40 \cdot 10^6$ $\pm 0,63 \cdot 10^6$	$9,16 \cdot 10^6$	1,24	2
ALO1460	pALO275	p15A	6570	$143,46 \cdot 10^6$	$717,32 \cdot 10^6$	83,90	1
ALO1458	pALO269	pBR322	10724	$32,07 \cdot 10^6$ $\pm 23,36 \cdot 10^6$	$155,62 \cdot 10^6$	54,27	3

^a Número de copias de plásmido en 1 μ l de suspensión celular, en un volumen de reacción de 20 μ l.

^b Número de copias de plásmido por unidad de masa ($A_{488}=1$) en 1 μ l de cultivo.

2.6.2. Cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR en cultivos exponenciales

Las muestras a analizar se tomaron de cultivos exponenciales de las estirpes portadoras de los plásmidos (serie ALO en Tabla 2), creciendo a 37 °C, en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos al 0,1 % y arabinosa al 0,2 %, y en presencia del antibiótico correspondiente, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 13.1 de Métodos. Las reacciones se prepararon por triplicado, añadiendo en cada caso 1 μ l de la suspensión celular (apartado 13.2 de Métodos). Los Ct se analizaron con el software iCycler. Para las muestras correspondientes a cada plásmido se fijó el mismo umbral de detección de fluorescencia establecido en las muestras utilizadas para la calibración con ese mismo plásmido a partir de DNA aislado y purificado (Tabla 27). Se comprobó que todos los Ct se encontraban dentro de los rangos lineales de detección de las rectas de calibrado. Se calculó la media de los Ct de los triplicados de cada muestra y, para obtener la cantidad de DNA plasmídico presente en la muestra, esa media se extrapoló en la recta patrón trazada a partir de muestras de DNA plasmídico aislado, purificado y cuantificado. Teniendo en cuenta el tamaño de cada plásmido y la cantidad de DNA plasmídico en la reacción, se empleó la expresión propuesta por Whelan y cols. para obtener el número absoluto de copias de plásmido en la reacción (Tabla 29; apartado 13.4 de Métodos).

2.6.3. Transformación de la cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR a copias por masa y copias por célula

Para hacer comparables los resultados obtenidos por qPCR (pcn/reacción) con los obtenidos por espectrofluorimetría (pcn/masa) y citometría de flujo (pcn/célula), los valores del número de copias de plásmido por qPCR se hicieron relativos a la absorbancia del cultivo en el momento de la toma de la muestra (pcn/masa), y al número de células presentes en la reacción (pcn/célula).

Tabla 30. Tiempos de duplicación (t_d) del número de células en las diferentes estirpes, creciendo exponencialmente en medio mínimo M9 con glicerol, suplementado con casaminoácidos y arabinosa, y en presencia del antibiótico correspondiente, a 37 °C; obtenidos mediante el seguimiento del crecimiento en masa (A_{488}), el recuento de células con citómetro de flujo y el recuento de células viables por siembra en placa (% = porcentaje de la diferencia entre crecimiento en masa y recuento de células; n = número de cultivos analizados). Se incluye el número de unidades formadoras de colonias por ml (cfu/ml) obtenido a una absorción de 0,2.

Estirpe	Plásmido	Replicón	A_{488}		Citómetro de flujo			Siembra en placa			cfu/ml ($\cdot 10^7$) $A_{488} = 0,2$
			t_d (τ ; min)	n	t_d (min)	%	n	t_d (min)	%	n	
MC1000	-	-	61,4	4	73,0	18,8	4	57,3	6,7	3	11,02
ALO1465	pALO280	F	68,8	3	149,6	117,4	3	64,1	6,8	3	10,19
ALO1459	pALO270	P1 $\Delta incA$	64,0	3	115,9	79,7	3	63,4	0,8	3	10,70
ALO1469	pALO284	pSC101	62,8	3	81,0	28,9	3	56,6	9,8	3	14,80
ALO1454	pALO261	R1	62,6	3	83,6	33,5	3	51,1	18,3	3	9,23
ALO1460	pALO275	p15A	85,0	3	106,6	25,5	3	78,9	7,1	3	8,55
ALO1458	pALO269	pBR322	151,0	4	137,0	9,2	3	113,9	24,5	3	3,20

Para hacer relativos los valores de la cuantificación obtenidos por qPCR a la masa, se consideró la absorbancia (masa) del cultivo en el tiempo de la toma de muestras para la reacción de qPCR.

Para determinar el número de células en el volumen de la suspensión celular analizada por qPCR, se llevó a cabo el recuento de células por volumen dado mediante el análisis de células viables y haciendo uso de un citómetro de flujo, a lo largo del crecimiento exponencial de cultivos de las estirpes analizadas (apartado 11 de Métodos). El número de células por volumen determinado por ambos métodos se representó, en una gráfica semilogarítmica, frente al tiempo de la toma de las muestras. A partir de las rectas obtenidas se determinó el tiempo de duplicación del número de células, por recuento de viables y por recuento con citómetro. En la Tabla 30 se presentan los tiempos de duplicación obtenidos por ambos métodos de recuento para cada estirpe, junto con el tiempo de duplicación de la masa del cultivo obtenido por la medida de la absorbancia (tiempo de generación). Se indican los porcentajes de diferencia entre los tiempos de duplicación determinados por los métodos de recuento y los determinados por absorbancia. En el análisis de viables, la mayoría de las diferencias se mantienen debajo del 10 %; mientras que en el recuento con citómetro la mayoría de las diferencias está por encima del 20 %. Considerando estas diferencias, se determinó que el método más eficiente para la determinación de células por volumen es el análisis de viables. Considerando el recuento del número de células por viables, los resultados obtenidos de la cuantificación del número de copias de plásmido obtenido por qPCR se hicieron relativos al número de células de la reacción para obtener el parámetro pcn/célula.

En la Tabla 29 se presenta, para cada plásmido, el valor medio absoluto del número de copias de plásmido en la reacción, por unidad de masa y por célula a partir de la determinación del número de copias de plásmido por qPCR.

2.7. Comparación de la cuantificación del número de copias de plásmido por qPCR, espectrofluorimetría y citometría de flujo

Para poder comparar los resultados obtenidos por qPCR (Tabla 29) con los obtenidos por espectrofluorimetría (Tabla 20, columna 37 °C) y citometría de flujo (Tabla 21, columna 37 °C), los valores obtenidos en cada análisis se hicieron relativos al que presenta la estirpe ALO1465, portadora del plásmido pALO280 (F), a 37 °C. El plásmido pALO280 (F) es el que presenta el número de copias más bajo de los analizados y por esto es utilizado como referencia. Los valores relativos así obtenidos se presentan en la Tabla 31. La comparación de los valores obtenidos para el parámetro pcn/masa por qPCR y espectrofluorimetría muestra una

Tabla 31. Número relativo de copias de plásmido por masa (pcn/masa), por célula (pcn/célula) y por *oriC* (pcn/*ori*) obtenidos por qPCR, espectrofluorimetría (EF) y citometría de flujo (CF) para los plásmidos indicados. Para los valores pcn/*ori* obtenidos por qPCR, EF y CF se presenta el porcentaje de diferencia con respecto a los datos de *Southern blot*. El número de copias obtenido para pAL0280 (F) se utilizó como referencia en cada análisis. Se indican los valores de origen por célula (*ori/célula*) y masa por célula (masa/célula) utilizados en la conversión de pcn/masa y pcn/célula a pcn/*ori* (ND = no determinado).

Plásmido	Replicón	pcn/masa		pcn/célula		pcn/ <i>ori</i>		pcn/ <i>ori</i> <i>Southern blot</i> *	pcn/ <i>ori</i>		<i>ori</i> / célula	masa/ célula
		qPCR _m	EF	qPCR _c	CF	qPCR _m	EF		qPCR _m	CF		
pAL0280	F	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,48	7,51
pAL0270	P1 <i>ΔincA</i>	7,13	5,53	6,63	7,42	ND	ND	5,90	ND	ND	ND	ND
pAL0284	pSC101	19,71	3,72	11,88	4,10	17,27 (283,77 %)	3,27 (27,33 %)	4,50	10,52 (133,78 %)	3,63 (19,33 %)	1,68	7,45
pAL0261	R1	1,18	1,62	1,41	2,07	ND	ND	1,76	ND	ND	ND	ND
pAL0275	p15A	92,57	18,13	96,26	40,02	72,15 (365,48 %)	14,13 (8,84 %)	15,50	75,87 (389,48 %)	31,49 (103,16 %)	1,88	7,44
pAL0269	pBR322	20,08	27,58	62,27	92,33	ND	ND	23,60	ND	ND	ND	ND

* Datos de *Southern blot* tomados de Lobner-Olesen, 1999.

coincidencia aceptable para la determinación del número de copia de los plásmidos pALO270 (P1 *ΔincA*), pALO261 (R1) y pALO269 (pBR322); en el caso de los plásmidos pALO284 (pSC101) y pALO275 (p15A), la cuantificación por qPCR es aproximadamente 5 veces superior a la obtenida por espectrofluorimetría. En el caso del parámetro pcn/célula, la comparación de los valores obtenidos por qPCR y citometría de flujo muestran mejor coincidencia para los plásmidos pALO270 (P1 *ΔincA*) y pALO261 (R1); de manera análoga que con el parámetro pcn/masa, los valores pcn/célula para los plásmidos pALO284 (pSC101) y pALO275 (p15A) son superiores más de 2 veces por qPCR; la cuantificación del plásmido pALO269 (pBR322) resultó en este caso superior por citometría de flujo.

Con el propósito de dirimir las diferencias encontradas en la cuantificación del número de copias de los plásmidos pALO284 (pSC101) y pALO275 (p15A) entre las diferentes técnicas, se llevo a cabo la transformación de los valores del parámetro pcn/masa, obtenidos por qPCR y espectrofluorimetría, y los valores del parámetro pcn/célula, obtenidos por qPCR y citometría de flujo, al parámetro pcn/ori (número de copias de plásmido/oriC). Los plásmidos pALO284 (pSC101) y pALO275 (p15A) han sido cuantificados previamente por *Southern blot* en las mismas estirpes usadas en este trabajo y en las condiciones de crecimiento de este análisis, obteniéndose así sus valores relativos a pALO280 (F) en el parámetro pcn/ori (Lobner-Olesen, 1999).

Con el fin de transformar los valores de los parámetros pcn/masa y pcn/célula a pcn/ori, se usaron las siguientes expresiones:

$$\text{pcn/ori} = \frac{\text{pcn/masa} \cdot \text{masa/célula}}{\text{ori/célula}}$$

$$\text{pcn/ori} = \frac{\text{pcn/célula}}{\text{ori/célula}}$$

Para realizar estas transformaciones se obtuvieron las relaciones masa/célula y ori/célula del análisis por citometría de flujo de cultivos de las estirpes portadoras de los plásmidos pALO284 (pSC101) y pALO275 (p15A) y de la estirpe portadora de pALO280 (F), que se usó como referencia. La relación masa/célula se obtuvo del análisis de muestras de cultivos exponenciales con absorbancia entre 0,1 y 0,2, considerando el parámetro dispersión de luz (LS). La relación ori/cell se obtuvo de muestras tratadas con rifampicina 150 μg/ml y cefalexina 50 μg/ml durante 4 horas, con el fin de que las replicaciones en marcha terminaran; de este modo, el número de cromosomas por célula obtenidos representa el valor del número de orígenes de replicación por célula en el momento del inicio del tratamiento inhibitorio. Los datos obtenidos en este análisis se presentan en la Tabla 31.

Considerando los datos obtenidos por citometría para los parámetros masa/célula y cromosomas/célula (ori/célula) y haciendo uso de las expresiones anteriormente descritas, se transformaron los valores de pcn/masa (qPCR y espectrofluorimetría) y pcn/célula (qPCR y citometría de flujo) a pcn/ori. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 31, junto a la cuantificación por *Southern blot* publicada de estos plásmidos (Lobner-Olesen, 1999). Comparando los valores transformados obtenidos en este trabajo con el valor por *Southern blot* para los plásmidos analizados, las cuantificaciones realizadas por espectrofluorimetría son las que menos se desvían de las de *Southern blot*, mientras que las que más se diferencian son las realizadas por qPCR. Estos resultados indican que la metodología más precisa de las utilizadas en este trabajo para la determinación del número de copias de plásmido es la espectrofluorimetría.

DISCUSIÓN

Las células de todos los organismos, y especialmente las de organismos unicelulares, han desarrollado mecanismos que les permiten detectar diferentes cambios ambientales y responder frente a ellos adaptándose a las nuevas condiciones del entorno para sobrevivir. Entre las diferentes respuestas a los cambios ambientales está la respuesta a la temperatura. Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación demostraron que un aumento de diez o más grados centígrados en la temperatura de incubación de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* induce replications extras acíclicas. Esta replicación inducida por estrés térmico se denominó HIR (*heat induced replication*). HIR no depende de la respuesta de choque térmico, se inicia en *oriC* y, a diferencia de la replicación cíclica, no requiere la actividad de la RNA polimerasa ni la síntesis de proteínas *de novo* (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997).

Para el presente trabajo se planteó la ampliación del estudio de HIR a genomas de especies bacterianas modelo alternativas a *E. coli*, y a varios plásmidos de *E. coli* con diferentes mecanismos de control de la replicación. También se planteó profundizar en la caracterización de la replicación inducida por calor en el cromosoma de *E. coli*. El propósito global de este trabajo es el de conocer la generalidad del mecanismo de HIR en el mundo bacteriano y analizar los efectos de las replications inducidas fuera del control cíclico sobre otros procesos y parámetros del ciclo celular, tanto en *E. coli* como en el resto de las especies bacterianas incluidas en este trabajo. Los resultados obtenidos permiten proponer a HIR como una replicación general en el mundo bacteriano que tiene lugar tras una situación de estrés térmico. Sin embargo, en los replicones plasmídicos esta replicación no tiene lugar, siendo el aumento de la replicación observado efecto de la propia temperatura de crecimiento y no del estrés al que se someten los cultivos con el cambio en la temperatura de crecimiento.

1. La replicación inducida por estrés térmico es una respuesta generalizada en los cromosomas bacterianos

El primer objetivo de este trabajo fue analizar si el aumento en la temperatura de crecimiento de cultivos de distintas especies bacterianas producía el mismo efecto observado y descrito para *E. coli*, o si por el contrario HIR es una respuesta específica del cromosoma de *E. coli*. Se ha estudiado la replicación en condiciones de estrés térmico en *Salmonella typhimurium*, enterobacteria Gram-negativa cercana filogenéticamente a *E. coli*; en *Bacillus subtilis*, como organismo modelo de especies Gram-positiva y cuyo hábitat natural es el medio ambiente y no el intestino de animales de sangre caliente; y en *Vibrio cholerae*, que, a diferencia de la mayoría de las bacterias, reparte su genoma en dos cromosomas. El mayor de ellos es similar al de *E. coli* y el menor similar a un plásmido, por tanto presentan diferente control de su replicación en el ciclo celular (Egan *et al.*, 2005). El análisis de la replicación en *Vibrio* respecto a bacterias con un único cromosoma representa mayor complejidad técnica, ya que se deben analizar simultáneamente dos replicones distintos. Se ha observado la aparición de replications inducidas por aumento de la temperatura en todas las estirpes bacterianas estudiadas, aunque a diferente nivel. Con fines comparativos, en este trabajo se han realizado para la estirpe AB1157 de *E. coli* los mismos análisis que en el resto de las bacterias analizadas, aunque estos resultados ya han sido descritos anteriormente.

La replicación inducida por calor ya ha sido descrita y caracterizada en *E. coli* en trabajos anteriores (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2006a; González-Soltero *et al.*, 2006b; González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 1988; Jiménez-Sánchez *et al.*, 1993). Tras un aumento en la temperatura de crecimiento de un cultivo de *E. coli* de 30 °C a 41 °C junto con la inhibición de la replicación cíclica, el incremento de DNA, medido por marcaje radiactivo, alcanza valores mayores que en los

cultivos tratados que se mantienen a 30 °C o 41 °C a lo largo del crecimiento, lo que evidencia la aparición de nuevas replications inducidas por la temperatura y diferentes de la replicación canónica (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). HIR es una replicación resistente a rifampicina, que sigue iniciándose hasta 30 minutos después de la adición del antibiótico (apartado 1.6.1 de Resultados, Figura 33). Este aumento en la síntesis relativa de DNA es originado por la inducción térmica del inicio de la replicación en un porcentaje de los orígenes presentes en el momento del comienzo del tratamiento. Se ha estudiado la aparición de HIR en cultivos de *E. coli* AB1157 en diferentes medios de crecimiento y con diferentes tratamientos para la inhibición de los inicios de la replicación cíclica (Figura 12, Tabla 7). Se ha obtenido una inducción de HIR tras el cambio de 30 °C a 41 °C e inhibición con rifampicina más alta en medio rico (aproximadamente del 30 %) que en medio mínimo (aproximadamente del 25 %). El uso de cloranfenicol como inhibidor de la replicación ha dado lugar a mayores niveles de inducción que los observados al tratar los cultivos con rifampicina. La rifampicina es un antibiótico que interacciona con la RNA polimerasa bacteriana, impidiendo la transcripción y la replicación de manera casi inmediata. El tiempo de retraso en la inhibición de los inicios de replicación por el uso de rifampicina fue determinado en la primera Tesis Doctoral sobre HIR y es prácticamente despreciable (Botello, 1994). El cloranfenicol actúa a nivel del ribosoma y hace que se inhiba la síntesis de proteínas, lo que lleva a la inhibición del inicio de la replicación, puesto que éste requiere la síntesis de proteínas *de novo*. Debido al modo de actuación de ambos antibióticos, se ha descrito que el efecto sobre la replicación es más lento en el caso del cloranfenicol, mientras que la rifampicina actuaría en los primeros minutos del tratamiento (Lark, 1972; Theocharis *et al.*, 1992). Este hecho explicaría que en los cultivos tratados con cloranfenicol se alcancen porcentajes de inducción superiores, al no detenerse la replicación en el momento del comienzo del tratamiento.

Mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia se cuantificó el número medio de cromosomas por célula en los cultivos de *E. coli* AB1157 estudiados (Figuras 21 y 22, Tabla 11). En medio rico el número de cromosomas por célula a 30 °C es superior al obtenido en medio mínimo, justificado por la presencia de más ciclos de replicación solapados cuando la velocidad de crecimiento es mayor. En ambos medios de crecimiento se detecta un discreto aumento en el DNA por célula tras la inducción de HIR, que también se observa en el histograma presentado en la Figura 20, d, aunque no representa el porcentaje de inducción calculado mediante el análisis de la acumulación de DNA. En el caso del tratamiento con rifampicina en medio mínimo M9, el número medio de orígenes por cromosoma presentes a 30 °C es de 4,92. Tras el cambio a 41 °C se ha calculado una inducción del 24,97 %, es decir, subiría a 6,14 orígenes por cromosoma de media. En el supuesto de que en las células del cultivo a 30 °C hubiera un solo cromosoma por célula, estos datos podrían compararse con el número de cromosomas por célula obtenidos mediante citometría de flujo, 4,29 a 30 °C y 4,89 tras el cambio a 41 °C. El porcentaje de inducción obtenido por citometría de flujo en este supuesto es del 14 %, inferior al calculado por el incremento en la acumulación de DNA. Esta subestimación del número de cromosomas por célula obtenido por citometría de flujo únicamente podría explicarse por la aparición de divisiones celulares que escapen a la inhibición impuesta por la cefalexina. El método habitual de condensación de los nucleoides para su visualización por microscopía es el tratamiento con cloranfenicol, aunque también puede provocar coalescencia de los nucleoides atribuida a la pérdida de uniones entre la envoltura celular y el DNA al inhibirse la síntesis de proteínas (Chai *et al.*, 2014; van Helvoort *et al.*, 1996). La rifampicina, empleada en las muestras analizadas por microscopía, provoca que los nucleoides muestren tendencia a disgregarse y adquieran una forma alargada que abarque todo el eje longitudinal celular (Zimmerman y Murphy, 2001). La calidad de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para los cultivos de *E. coli* AB1157 con los medios técnicos disponibles no permitió el recuento de nucleoides por célula en todos los casos

planteados, aunque sí permite apreciar la variación del tamaño celular debida al medio de crecimiento y a la temperatura.

En *S. typhimurium* la replicación cromosómica procede de una manera muy similar a como transcurre en *E. coli*, por lo que cabe esperar que los requerimientos de la replicación de sus cromosomas sean muy parecidos (Chan y Lark, 1969). Se ha estudiado la replicación del cromosoma de *S. typhimurium* LT2 en condiciones de cambio de temperatura junto con la adición de rifampicina o cloranfenicol a distinta concentración (Figura 14, Tabla 8). En la mayoría de los casos se ha observado la aparición de la replicación termoinducida descrita para *E. coli*. Esta replicación en *S. typhimurium* siempre da lugar a porcentajes de inducción de la replicación superiores a los descritos para el cromosoma de *E. coli*, y que también guardan una relación con la riqueza del medio de cultivo: a mayor cantidad de nutrientes, un mayor porcentaje de los orígenes presentes en la célula son inducidos. Del mismo modo que en *E. coli*, el uso de cloranfenicol como inhibidor de la replicación al mismo tiempo que se aumenta la temperatura da lugar a un mayor nivel de inducción de la replicación, posiblemente debido al retraso en la inhibición del inicio de la replicación por este antibiótico.

Del estudio por citometría de flujo de la inducción de HIR en crecimiento en medio mínimo y medio rico en *S. typhimurium* LT2 se obtuvo que el número de cromosomas por célula fue mayor para los cultivos creciendo en medio rico, de aproximadamente 4 cromosomas por célula determinado por citometría de flujo, mientras que en medio mínimo se alcanza una media entre 2 y 3 cromosomas por célula (Figuras 23, 25, Tabla 12). El mayor solapamiento de rondas de replicación en los cultivos creciendo en medio rico a mayor velocidad, determinado por n , explica esta observación. En relación con los cultivos a 30 °C, el número de cromosomas por célula contabilizado fue en todos los casos superior tras el cambio de temperatura (Figuras 23, 26 y 24).

El estudio de la replicación en condiciones de aumento de temperatura en la Gram-positiva *B. subtilis* también muestra aparición de nuevas replications tras el estrés (Figura 16, Tabla 9). Para la estirpe BG219 de *B. subtilis*, cuando el antibiótico empleado para la inhibición de la replicación es la rifampicina se obtienen incrementos en la síntesis de DNA más bajos que cuando se usa cloranfenicol, lo que lleva a pensar que la rifampicina es mejor inhibidor para detener los inicios de la replicación. Se obtienen en todos los casos niveles de inducción superiores a los obtenidos en *E. coli* AB1157, llegando incluso a rondar el 100 % de los orígenes presentes tras el estrés térmico cuando la inhibición es con cloranfenicol. Al comparar estos resultados con el estudio de la replicación por citometría de flujo, se comprueba que en el caso de *B. subtilis* sólo se observan cromosomas cuya replicación está completa en el caso de inhibición por cloranfenicol (Figuras 27 y 28). En el caso del uso de rifampicina, la citometría revela picos menos definidos correspondientes a cromosomas que no han terminado de replicarse, explicables por el hecho de que este antibiótico inhibiría en *B. subtilis* la elongación de la replicación del DNA además del inicio. Se ha descrito anteriormente el efecto bactericida de la rifampicina sobre la transcripción tanto en células vegetativas como en esporas de *B. subtilis*, en las primeras por afectar a la replicación del DNA y en las segundas por requerir una elevada síntesis de proteínas para su mantenimiento (Coote *et al.*, 1973; Séror *et al.*, 1994). La toxicidad de la rifampicina impediría el progreso de la síntesis de DNA y la obtención de cromosomas completamente replicados. Por este motivo, el número de orígenes por cromosoma calculado con el tratamiento con rifampicina presentado en la Tabla 13 estaría subestimando el valor real. A pesar de que la replicación termoinducida en *B. subtilis* generó una inducción cercana al 100 % tanto en medio rico como en medio mínimo, esta inducción no se ve reflejada en el dato de número medio de cromosomas por célula obtenido por citometría de flujo y no se observa en los histogramas. Además, se obtiene una mayor cantidad de

cromosomas por célula en medio mínimo que en los cultivos en medio rico. Por microscopía se observó que las células de *B. subtilis* permanecieron formando largas cadenas en casi todos los casos registrados, siendo estas cadenas más largas y con células de mayor grosor en el caso de inhibición con cloranfenicol en medio mínimo (Figuras 27 y 28). La tendencia de las células hijas de *B. subtilis* a permanecer conectadas en cadenas celulares durante un tiempo variable tras la formación del septo de división ha sido descrita anteriormente como una de las diferencias más evidentes entre el ciclo celular de *B. subtilis* con respecto al de *E. coli* (Paulton, 1971; Séror *et al.*, 1994; Sharpe *et al.*, 1978). La longitud de las cadenas celulares depende de la velocidad de crecimiento, llegando a acumularse hasta dieciséis células en una misma cadena en los medios más enriquecidos, que se separan en un tiempo variable en función del medio de crecimiento dando lugar a células individuales. Esta tendencia también ha sido descrita para *E. coli* y *S. typhimurium*, aunque el máximo de células por cadena es solamente de dos (Paulton, 1971). La formación de cadenas celulares en *B. subtilis* podría ser la explicación de que se haya obtenido por citometría de flujo un número de cromosomas por célula mayor en el caso de crecimiento en medio mínimo que en medio rico. En esta situación, la determinación del contenido cromosómico de *B. subtilis* por citometría de flujo sobreestimaría el número de cromosomas por célula presentes en el cultivo.

La última especie bacteriana en la que se ha estudiado la replicación termoinducida es la Gram-negativa *V. cholerae*, cuyo DNA está repartido en dos cromosomas con diferente estructura y control de la replicación (Diugou *et al.*, 2006). Para la estirpe ALO2495 de *V. cholerae* se observó la aparición de replications extra inducidas por el cambio en la temperatura de crecimiento en la mayoría de las situaciones analizadas, aunque con degradación del DNA acumulado en varias de las condiciones (Figura 18 y Tabla 10). El mejor perfil de acumulación de DNA sin degradación en el tratamiento con rifampicina o cloranfenicol se obtuvo con medio mínimo AB, aunque este medio no resultó el óptimo para el análisis por citometría de flujo (Figura 29). A pesar de que los dos cromosomas de *V. cholerae* son sensibles a rifampicina, pues ambos necesitan síntesis *de novo* para iniciar su replicación, la rifampicina tarda más tiempo en inhibir la replicación del cromosoma II que la del cromosoma I (Rasmussen *et al.*, 2007). Posiblemente debido a la diferente sensibilidad a la rifampicina de ambos cromosomas, se lograron mejores resoluciones en los histogramas con distribuciones de genomas completos por célula por citometría de flujo en los casos en los que se empleó cloranfenicol como inhibidor de la replicación (Figuras 29 y 30). En los histogramas presentados en estas figuras fue posible observar el aumento del número de células con mayor número de cromosomas tras el aumento de temperatura (Figuras 29 o, y 30 a y f).

El incremento en la síntesis de DNA que se registra tras el aumento de temperatura en cultivos con inhibición del inicio de la replicación, en *E. coli* va acompañado de un aumento en la cantidad de DNA con respecto a la masa en cultivos no tratados y sometidos al aumento de temperatura (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). El análisis de la relación DNA/masa en *E. coli* AB1157 revela que este aumento, que se mantiene durante las siguientes generaciones, no es debido meramente a la temperatura elevada de crecimiento. Los cultivos en crecimiento exponencial tanto a 30 °C como a 41 °C mantienen un valor constante de la relación DNA/masa a lo largo del crecimiento, característico de cultivos equilibrados, y similar entre ambos (Figura 13; González-Soltero *et al.*, 2008). En *S. typhimurium* y *V. cholerae* se obtuvo la misma respuesta para la relación DNA/masa observada en *E. coli* tras el cambio de temperatura, llegando a estabilizarse en un nivel similar y manteniéndose en ese valor a lo largo del crecimiento (Figuras 15 y 17, respectivamente). La relación DNA/masa en *B. subtilis* tras el cambio de temperatura, a diferencia del resto de las bacterias estudiadas, se mantuvo constante a lo largo del tiempo en un valor muy parecido al registrado a 30 °C (Figura 17). Este resultado podría indicar que la temperatura afecta de diferente forma a las bacterias Gram-

positiva que a las Gram-negativa. La principal diferencia entre ambos tipos de bacterias es la composición de su pared celular, y se conoce que la conformación de las proteínas de la membrana de *B. subtilis* y también la composición en ácidos grasos pueden verse modificados por variaciones en la temperatura (Bravo *et al.*, 2005; Neale y Chapman, 1970; Schumann, 2003). Estas variaciones en las características de la membrana celular debidas a la temperatura podrían tener relación con la interacción del cromosoma con la membrana durante la replicación del DNA, lo que podría explicar el diferente comportamiento observado en los cambios de temperatura. Tanto en *B. subtilis* como en el resto de las especies estudiadas, la relación DNA/masa en crecimiento exponencial tanto a 30 °C como a 41 °C se mantiene constante durante las generaciones analizadas, y en *S. typhimurium* y *V. cholerae* en valores inferiores a la relación obtenida tras el cambio de temperatura.

Desde la determinación de las secuencias completas del genoma de muchas especies, la atención de los investigadores se ha centrado en la comprensión de la replicación del DNA. Dado que la replicación es la tarea más importante que tiene lugar en una célula y que el control de este proceso se ejerce en la etapa de inicio de la replicación, los eventos que tienen lugar en el origen de replicación cobran importancia para todo el ciclo celular. La región del origen de replicación en procariontes, bien sea de plásmidos, fagos o cromosomas, presenta elementos estructurales muy conservados (Gao, 2014). Las características estructurales derivadas de las posiciones y las secuencias de los orígenes de replicación son fundamentales para la organización cromosómica, y explican el hecho de que sean estas regiones y no otras las que funcionen como origen de replicación (Gao, 2015; Song *et al.*, 2015). En los últimos años se han desarrollado múltiples herramientas computacionales para la predicción e identificación de los orígenes de replicación en base a la distribución de secuencias en torno a *oriC* diferente al resto del genoma (Sernova y Gelfand, 2008; revisado en Roggenkamp, 2007; Parikh *et al.*, 2015). Haciendo uso de la base de datos DoriC se consultó la predicción de los orígenes de replicación en los cinco cromosomas de las cuatro especies estudiadas en este trabajo mediante la representación de la curva Z (apartado 15.1 de Métodos; Gao y Zhang, 2007; Gao *et al.*, 2013). Para todos los cromosomas estudiados se predice una única región de origen de la replicación, cuya localización se tomó de referencia para analizar la probabilidad de apertura de la doble hélice en las regiones del origen mediante el análisis de sitios SIDD. En todas las secuencias del origen de replicación estudiadas se han localizado sitios con alta probabilidad de desestabilización por estrés, debido al alto contenido en pares AT (Figura 31). La probabilidad de apertura en el origen de *E. coli* y *S. typhimurium* presenta bastante similitud en la zona que corresponde a la región de los trecémeros, situada a la izquierda de *oriC*. Esta similitud señala que la secuencia de la región del origen de replicación puede utilizarse como marcador filogenético entre enterobacterias (revisado en Roggenkamp, 2007). En el cromosoma I de *V. cholerae*, la zona de la secuencia del origen con mayor probabilidad de apertura probablemente corresponda también a la región de los trecémeros. En los orígenes de *B. subtilis* y el cromosoma II de *V. cholerae* no hay trecémeros, pero sí secuencias ricas en AT, situadas en *B. subtilis* a ambos extremos de *oriC* y en *V. cholerae* en el extremo de la izquierda. Estas regiones corresponden a los sitios SIDD revelados en este análisis. La distribución de los sitios SIDD puede orientar no sólo de la relación evolutiva entre distintas bacterias, sino del patrón de apertura de la región del origen previa al ensamblaje del replisoma en cada especie. Los resultados obtenidos mediante la predicción de sitios SIDD señalan los lugares en los que sería más probable la apertura de la doble hélice en situación de estrés térmico, como en el caso de HIR, y apoyan la hipótesis ya formulada para *E. coli* de que la desestabilización térmica del origen de replicación es necesaria para la apertura de la secuencia del origen en el inicio de HIR.

Se ha establecido *oriC* como el único lugar cromosómico para el inicio de la replicación HIR en *E. coli*, y dentro de *oriC* es esencial la secuencia del trecémero L, rico en pares AT, donde

tiene lugar la desestabilización de la doble hélice de DNA inducida por la temperatura. Probablemente suceda del mismo modo en el resto de las especies, aunque harían falta investigaciones más profundas para descartar que el inicio de la replicación termoinducida tuviera lugar en otras secuencias del cromosoma.

La técnica de qPCR se puede emplear para el estudio de la replicación como complemento al análisis de la acumulación de DNA. El estudio de la inducción de HIR a través de la acumulación de DNA presenta limitaciones para el cálculo del número de orígenes por cromosoma presentes en el cultivo en el momento de la inhibición de la replicación en el caso de genomas repartidos como ocurre en *V. cholerae*. En este trabajo se complementó el estudio de HIR haciendo uso de la técnica de qPCR para identificar en qué proporción participa cada uno de los cromosomas de *V. cholerae* al incremento en la síntesis de DNA registrado. Así mismo se determinó la relación orígenes por término en los cromosomas de *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis*, y los dos cromosomas de *V. cholerae* por separado, en diferentes momentos tras la inducción de HIR (apartado 13.3 de Métodos; Tabla 17). En la estirpe AB1157 de *E. coli* se obtuvo mayor relación ori/ter tras el cambio de temperatura en medio rico que en medio mínimo, coherente con el nivel de inducción obtenido del análisis de la acumulación de DNA (Tabla 7). Cabría esperar que en las muestras tomadas tras 180 minutos del tratamiento se alcanzara una relación de 41 °C con respecto a 30 °C de 1, y sin embargo siempre se obtienen relaciones mayores. Podría ser que, al ser HIR una replicación más lenta que la exponencial, en el momento de la toma de la muestra no hubiera transcurrido el tiempo necesario para que la ronda de replicación finalice (Botello, 1994; Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). En todos los casos y cromosomas estudiados, la relación origen/término tras 180 minutos del aumento de temperatura de 30 °C a 41 °C fue inferior al dato obtenido tras 30 minutos. Los resultados obtenidos en el apartado 1.6.1 de Resultados señalan el momento en el que se alcanza la máxima inducción de HIR aproximadamente 30 minutos después del cambio de temperatura (Figura 33). La relación ori/ter a 41 °C con respecto a 30 °C obtenida en minuto 30 es siempre superior a la que se obtiene a tiempos posteriores, cuando los cromosomas comienzan a completar las replications en marcha. Este dato apoya la aparición de HIR observada por acumulación de DNA en todas las especies. La única excepción fue el cromosoma II de *V. cholerae*, donde no se obtuvo inducción de la replicación con el aumento de temperatura en ninguno de los supuestos analizados. Desde el inicio de la descripción del genoma de *V. cholerae*, el cromosoma II siempre ha sido comparado y descrito como una molécula similar a un plásmido, al ser de menor tamaño que el cromosoma I y por la similitud de sus características estructurales y de control de la replicación con muchos plásmidos (Heidelberg *et al.*, 2000). En el apartado 2.2 de Resultados se plantea que los plásmidos estudiados en este trabajo no presentan HIR. Es posible que la secuencia *oriC* del cromosoma II, posiblemente procedente de un plásmido, no haya conseguido que desaparezcan los elementos que impiden la aparición de la replicación termoinducida en plásmidos, o bien el desarrollo de los sistemas necesarios para la aparición de HIR. Alternativamente, la ausencia de HIR en el cromosoma II de *V. cholerae* puede ser debida a la coordinación de su replicación con el cromosoma I; ambos finalizan la replicación conjuntamente, por lo que el inicio de la replicación del cromosoma II sucede a tiempos posteriores que en el cromosoma I en el ciclo celular (Rasmussen *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este análisis de la relación origen/término, llevan a proponer a *oriC* como el lugar de inicio de HIR en los cromosomas que inducen la replicación por estrés térmico.

La proteína RecA está implicada en diversas funciones del metabolismo del material genético. Es la principal recombinasa implicada en recombinación homóloga y reparación del DNA y también actúa como sensor de daño en el DNA para la activación de la respuesta SOS (revisado en Cox, 2003). RecA interviene también en la estabilización y reparación de las

horquillas de replicación detenidas. Se ha descrito en *E. coli* que para que HIR tenga lugar se requiere la funcionalidad de RecA, en concreto la actividad asociada al mantenimiento de estructuras de replicación (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997; González-Soltero *et al.*, 2008b). Se presume que las estructuras de replicación de HIR serían más inestables que las de la replicación cíclica, y por este motivo necesitarían la funcionalidad de RecA. El grado de conservación de RecA entre especies bacterianas es tan elevado que es habitual su uso en estudios filogenéticos (Eisen, 1995). Para determinar si la función de RecA en HIR es compartida por los cromosomas bacterianos analizados, se ha estudiado la replicación termoinducida en mutantes *recA* nulos de las diferentes especies. Al contrario que lo ya descrito en *E. coli*, en todas las especies tiene lugar HIR a pesar de la ausencia de la proteína RecA funcional, aunque el porcentaje de inducción es siempre menor que en la estirpe silvestre. En especies como *S. typhimurium* o *B. subtilis*, HIR no presenta una estricta dependencia de RecA, a diferencia de en *E. coli*, sino que la inducción térmica de la replicación se reduce a valores que corresponden aproximadamente con la mitad de la inducción silvestre (Tabla 18). En *V. cholerae* los resultados obtenidos no son concluyentes al ser muy variables, desde no presentar inducción en medio mínimo AB con cloranfenicol como inhibidor de la replicación, hasta no observarse ningún efecto en ausencia de RecA, como en medio mínimo con rifampicina. La diferencia en el requerimiento de RecA entre *S. typhimurium* o *B. subtilis* y la que presenta *E. coli* discrepa con la alta homología que presentan las proteínas RecA de todas las especies estudiadas (Eisen, 1995; Galitski y Roth, 1997; Goldberg y Mekalanos, 1986). Esta diferencia podría justificarse si la proteína RecA no presentara exactamente las mismas funciones en todas las bacterias, a pesar de la elevada homología de esta proteína en el mundo bacteriano. En este sentido, se ha descrito que la proteína RecA de *E. coli* parece ser la única que posee actividad motora, acoplado el movimiento del DNA en el intercambio de cadenas durante la recombinación con la hidrólisis de ATP (Lusetti y Cox, 2002). Una segunda opción para explicar la menor dependencia de RecA para HIR en las especies diferentes a *E. coli* estaría basada en la complejidad del sistema de recombinación, donde la redundancia haría que en ausencia de una proteína RecA funcional exista otro mecanismo que supla su función y permita el inicio de la replicación inducida por calor. Una situación similar se ha descrito en *E. coli*, donde el inicio de HIR es posible en ausencia de RecA sólo cuando la actividad exonucleasa de RecBCD también está ausente (González-Soltero, 2007; González-Soltero *et al.*, 2008).

Esta diferencia funcional de HIR acerca del requerimiento de la proteína RecA lleva a plantear que la replicación inducida por estrés térmico sea funcionalmente diferente en otras especies con respecto a *E. coli*. Trabajos posteriores deberán ampliar la caracterización funcional de la dependencia de RecA y otras proteínas para HIR en las nuevas especies.

1.1. Ampliación de la caracterización de HIR en *E. coli*

Anteriormente a este trabajo se había descrito que la replicación HIR era transitoria, teniendo lugar únicamente durante un corto periodo de tiempo tras el estrés térmico (Botello y Jiménez-Sánchez, 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tiempo en el que dejan de activarse nuevos inicios de HIR está entre 25 y 30 minutos tras el aumento en la temperatura del cultivo (Figura 33). Este resultado confirma que la inducción de HIR es transitoria. HIR se indujo paulatinamente durante los primeros 30 minutos tras el aumento de temperatura, en presencia de rifampicina, mostrando así su independencia de la actividad de la RNA polimerasa, requerida para el inicio de la replicación cíclica.

Mediante el estudio de la evolución de las relaciones DNA/célula y masa/célula por citometría de flujo de un cultivo de *E. coli* tras el cambio de 30 °C a 41 °C es posible interpretar el efecto que tiene el aumento de la temperatura de crecimiento sobre estos parámetros

celulares (Figuras 34 y 35). Los parámetros DNA/célula y masa/célula mostraron un aumento de estas relaciones de manera inmediata y prolongada tras el cambio a 41 °C. La cantidad de DNA por célula tras el cambio a 41 °C aumentó con mayor velocidad y hasta un nivel relativo más alto que la masa por célula, lo que llevaría al aumento DNA/masa descrito anteriormente (Figura 13). El aumento de la masa celular tras un aumento en la temperatura de crecimiento ha sido descrito anteriormente en *E. coli* (Taschner *et al.*, 1987). Estos resultados muestran que la inducción de la replicación y la elongación celular tienen lugar en los primeros 20-25 minutos tras el cambio de temperatura. Después del minuto 25, los parámetros DNA/célula y masa/célula disminuyen, indicando la aparición de divisiones celulares extras. La bajada de estas relaciones, DNA/célula y masa/célula de forma similar, en el caso del análisis DNA/masa lleva al mantenimiento en valores constantes. Las divisiones celulares extras podrían venir determinadas por el aumento del nivel de replicación y la coordinación entre replicación y división, o, al igual que HIR, estar inducidas por el estrés térmico. De nuevo, con estos resultados se observa la inducción de la replicación, en este caso en ausencia de tratamiento, durante unos 25 minutos tras el aumento de temperatura.

2. El estrés térmico induce la replicación de minicromosomas y plásmidos como adaptación a la nueva temperatura de crecimiento

El segundo objetivo general de este trabajo fue determinar si HIR es una replicación específica del cromosoma o puede darse en otro tipo de replicones. Se ha estudiado la replicación termoinducida en diferentes condiciones en minicromosomas y plásmidos de *E. coli* por cuantificación de la proteína de fluorescencia verde GFP*mut2* clonada bajo el control del promotor pBAD y la proteína AraC (Cronan, 2006; Guzmán *et al.*, 1995). La proteína reguladora AraC funciona como activador de la transcripción de pBAD en presencia de L-arabinosa, mientras que en ausencia de este azúcar la expresión del promotor es muy reducida (revisado en Schleif, 2000). Trabajos anteriores han determinado que la medida de fluorescencia de GFP*mut2* es un método eficaz para la determinación de la dosis génica en plásmidos (González-Soltero, 2007; Lobner-Olesen, 1999).

El estudio de la replicación termoinducida en minicromosomas y plásmidos a través de la expresión de GFP*mut2* presenta algunas limitaciones con respecto al estudio de HIR en el cromosoma. A diferencia de la replicación cíclica, HIR es resistente a rifampicina, y la manera de distinguir entre ambas replicaciones es la adición del antibiótico en el momento del aumento en la temperatura de crecimiento. En los plásmidos no es posible efectuar un tratamiento con rifampicina, pues se inhibiría la síntesis de proteínas, entre ellas de GFP*mut2*, y en esa situación no podría determinarse el número de copias de plásmido mediante fluorescencia. Una posibilidad para estudiar la inducción de HIR en los orígenes plasmídicos sería integrarlos en el cromosoma de *E. coli* en ausencia de *oriC*. Mediante esta aproximación se ha visto que HIR no es un fenómeno exclusivo de *oriC* y que puede tener lugar a partir del origen de replicación del plásmido R1, *oriR1*, cuando el plásmido está integrado en el cromosoma. Sin embargo, la integración del plásmido F en el cromosoma no da lugar a la inducción de HIR (González-Soltero, 2007). Si cada replicón presenta una respuesta al estrés térmico, es posible que los plásmidos dispongan de mecanismos propios basados en diferencias estructurales o funcionales, que justifiquen la disponibilidad de los orígenes plasmídicos integrados en el cromosoma para la inducción de las replicaciones inducidas por el estrés térmico.

Se estudió la replicación de minicromosomas y plásmidos mediante determinación de su número de copias por medida de la fluorescencia de GFP*mut2*, mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo, en condiciones de estrés térmico por aumento de la temperatura de crecimiento de 30 °C a 41 °C (Figuras 36, 38 y 39 y Tabla 19). En todos los minicromosomas y plásmidos se detectó el aumento del número de copias en mayor o menor medida tras el

cambio de temperatura mediante las dos técnicas empleadas (Figuras 36, 38 y 39). En todas las estirpes la tendencia de la fluorescencia por célula o por masa es mantenerse constante a 30 °C, mientras que la fluorescencia recogida tras el cambio de temperatura aumenta progresivamente con una cinética de acumulación hasta alcanzar el valor en el que se estabiliza. Para la estirpe con el plásmido pALO269 (pBR322), el aumento de la fluorescencia por célula tiende a aumentar siguiendo un patrón exponencial, estabilizándose al cabo de varias horas. Esta observación únicamente se aprecia en la fluorescencia por célula de este cultivo y no en el resto de los plásmidos, y llevó a pensar en la posibilidad de que el aumento en la fluorescencia obtenido no se debiera al estrés térmico sino a una adaptación a la temperatura de crecimiento. Se determinaron los parámetros de fluorescencia por célula y fluorescencia por masa en cultivos en crecimiento exponencial a diferentes temperaturas, y la relación de la fluorescencia obtenida a 41 °C con respecto a 30 °C superó en todos los casos a la inducida por el cambio de temperatura (Tabla 22). El único caso donde el incremento de la fluorescencia obtenido en crecimiento exponencial no superó el alcanzado tras estrés térmico fue en las células con pALO269 (pBR322). Es probable que el aumento en la fluorescencia inducido por el cambio de temperatura no represente una replicación termoinducida, sino que se deba al control más laxo de la replicación en plásmidos.

El tamaño celular medio de las estirpes portadoras de los plásmidos analizados no mostró variación tras el aumento de la temperatura en relación con el tamaño a 30 °C en la mayoría de los casos (Tabla 19). Se detecta que el tamaño de la estirpe con el plásmido R1 es, a 30 °C, superior a los tamaños del resto de los plásmidos, y con el cambio de temperatura las células que lo contienen aumentan su tamaño. Otros casos en los que el tamaño celular aumenta con el cambio de temperatura son la estirpe portadora de pBR322, la que muestra mayor aumento de tamaño, y la estirpe parental sin plásmido, cuyo tamaño aumenta aunque en menor medida que las anteriores. Los tamaños de las células en crecimiento exponencial a diferentes temperaturas, aunque en la mayoría de las estirpes estudiadas se mostraron invariables, en ciertos casos también presentaron un aumento relacionado con la temperatura de crecimiento (Tabla 23). Las estirpes portadoras de los plásmidos pALO280 (F), pALO284 (pSC101) y los tres con control por RNA antisentido pALO261 (R1), pALO275 (p15A) y pALO269 (pBR322) vieron su tamaño incrementado cuando crecieron a 41 °C. Incluso la estirpe con el plásmido pALO269 (pBR322) aumentó su tamaño celular en el crecimiento a 37 °C con respecto al de 30 °C (Tablas 23 y 30). Estos aumentos en el tamaño celular podrían explicar las diferencias obtenidas entre el incremento de la fluorescencia obtenido por célula o por masa en estas estirpes, bien sea por crecimiento exponencial a 41 °C o tras el aumento de temperatura, con respecto a la de 30 °C. El parámetro FL/masa en estas estirpes con respecto a 30 °C aumenta en menor medida que FL/célula, debido a que el aumento en el tamaño de las células hace que la relación FL/masa no sea tan alta como cabría esperar. En los casos de pALO275 (p15A) y pALO269 (pBR322), ambos derivados de ColE1 y con un elevado número de copias, podría ser que la gran carga plasmídica pueda ejercer algún efecto sobre el tamaño de las células que los contienen. En células con elevado número de plásmidos se ha descrito que la carga metabólica que supone el mantenimiento de los plásmidos pueden reflejar alteraciones en la fisiología y el metabolismo de la célula hospedadora, dando lugar incluso a respuestas de estrés que podrían llevar a la reducción del número de copias del plásmido o incluso reducir la velocidad de crecimiento del cultivo o el tamaño de las células hospedadoras (Silva *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006).

2.1. El número de copias depende directamente de la velocidad de crecimiento de un cultivo determinada por la temperatura

En el ciclo celular bacteriano hay parámetros relevantes que dependen de la velocidad de crecimiento de un cultivo, como el tamaño celular, el número de copias de un gen, o el nivel

de expresión génica (Bremer y Dennis, 1996; Klumpp *et al.*, 2009; Schaechter *et al.*, 1958). En plásmidos, el número de copias puede depender de la velocidad de crecimiento por la influencia que ésta tiene sobre el control de la replicación (Klumpp, 2011). Para estudiar la influencia de la velocidad de crecimiento en el establecimiento del número de copias de plásmido, se modificó la velocidad de crecimiento de los cultivos fijando diferentes temperaturas de crecimiento y por otra parte modificando la composición del medio de cultivo. Se observó una correlación lineal directa entre el número de copias por masa y por célula, de los minicromosomas y los plásmidos, y la velocidad de crecimiento determinada por la temperatura del cultivo (Figura 40). Cuanto mayor fue velocidad de crecimiento, se obtuvo un mayor número de copias para la mayoría de los plásmidos. El único plásmido que no mostró dependencia lineal de la velocidad de crecimiento fue el pALO269 (pBR322). El coeficiente de correlación del número de copias por masa del pALO269 (pBR322) con la velocidad de crecimiento mostró un valor de 0,10; aunque el número de copias por célula se ajustó más ($R = 0,76$). El número de copias por célula aumenta cuando la temperatura de crecimiento es de 37 °C y disminuye cuando la temperatura se eleva hasta 41 °C. Parece haber un control celular para limitar el número máximo de copias de plásmido que la célula puede albergar.

El segundo método para variar la velocidad de crecimiento fue la modificación del medio de cultivo (Figura 41). En los tres casos estudiados, los valores de copias por masa y duplicaciones por hora muestran una relación lineal inversa con un ajuste en la correlación de alrededor del 0,9. Al contrario que la tendencia del mismo parámetro en relación a la velocidad de crecimiento dependiente de la temperatura, cuanto mayor es la velocidad de crecimiento inducida por el medio de cultivo, menor es el número de copias. La mayoría de los trabajos publicados sobre la dependencia del número de copias de plásmido en función de la velocidad de crecimiento emplean diferentes medios de cultivo para modificar dicha velocidad. En estas condiciones, el parámetro copias por célula aumenta con la velocidad de crecimiento, mientras que las copias por masa disminuyen (Klumpp, 2009; Lin-Chao y Bremer, 1986). La dependencia del número de copias de un plásmido de la velocidad de crecimiento es un hecho conocido, y se utiliza en las estrategias para la maximización del número de copias de plásmido en células de *E. coli* para la producción eficiente de proteínas recombinantes (Martínez-García *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012).

2.2. La influencia de RecA en la replicación de minicromosoma y plásmidos depende de las condiciones de crecimiento

Como se ha comentado anteriormente, RecA está implicada en varias funciones relacionadas con el mantenimiento y el procesamiento del DNA. En plásmidos, se conoce que la mayoría de la recombinación es dependiente de RecA. En situación de daño en una molécula de plásmido, la actividad RecA promueve el emparejamiento homólogo de moléculas plasmídicas y cataliza el intercambio de cadenas para el restablecimiento de la secuencia (Bi y Liu, 1994; Luisi y Deluca, 1989). Se estudió el efecto de la ausencia de la proteína RecA sobre la variación del número de copias por masa de minicromosoma y plásmidos en el mutante nulo *recA13*. Si la función de RecA fuera esencial para la replicación de los plásmidos en condiciones de estrés térmico, se esperaría que la fluorescencia de GFP*mut2* no aumentara tras el cambio de temperatura de 30 °C a 41 °C. En el minicromosoma estudiado, la ausencia de RecA reduce el incremento en la fluorescencia por masa con respecto a la estirpe parental (Figura 44). La replicación del minicromosoma se asemeja a la del cromosoma, donde la actividad de RecA es necesaria para HIR, y parece que para la replicación termoinducida en el minicromosoma sería necesaria parcialmente la actividad RecA. En los plásmidos, la ausencia de proteína RecA funcional llevó a una mayor inducción del número de copias por estrés térmico con respecto a sus estirpes parentales (Figuras 45 y 46). Se observó un incremento del número de copias por masa en todos los plásmidos estudiados, y en todos los casos en un porcentaje superior en las

estirpes *recA13* que en las estirpes control, aunque en diferente proporción. Estos resultados sorprenden en el sentido de que lo esperable sería que la función de RecA fuera necesaria para la replicación y reparación de plásmidos, o al menos no supusiera un impedimento para la inducción de la replicación por estrés térmico. Sin embargo, este no sería un hecho aislado; hay evidencias de otros procesos relacionados con el mantenimiento del DNA plasmídico que transcurren en ausencia de RecA. En estudios de reparación de DNA, ha sido descrita la independencia de la función de RecA para la recuperación de plásmidos dañados al ser introducidos en células competentes, a diferencia de la dependencia de RecA para la reparación de los plásmidos endógenos (Jeiranian *et al.*, 2012). Otra posible explicación sería que la actividad de RecA no sea esencial para la replicación en plásmidos, como varios estudios han sugerido, a favor de otras proteínas con función redundante que suplan la función ausente (Berardini *et al.*, 1997; Roberts y Strike, 1986; Strike y Roberts, 1982). Si esta fuese la explicación, quizá sería la activación de alguna ruta silenciada por RecA activa, la que favoreciera el número de copias de plásmido en el mutante *recA13*.

En condiciones de crecimiento exponencial a diferentes temperaturas, la influencia de RecA sobre la replicación de plásmidos contrasta con la que presentó tras el cambio de temperatura (Tabla 26). Para la mayoría de los plásmidos hay más replicación en presencia de RecA. La replicación del minicromosoma en crecimiento exponencial no muestra dependencia de RecA funcional. El efecto positivo de RecA sobre la replicación de los plásmidos en crecimiento exponencial podría explicarse por la existencia de algún efecto regulador que ejerciera la proteína RecA, directa o indirectamente, sobre algún proceso implicado en la replicación plasmídica. Aunque la presencia de RecA en crecimiento exponencial facilita la replicación; parece ser que en condiciones de estrés térmico sea más favorable la ausencia de RecA activa.

2.3. Los orígenes de replicación de plásmidos presentan sitios SIDD

Los orígenes de replicación de los plásmidos con control por iterones estudiados en este trabajo tienen características similares a las de *oriC*. Todos presentan secuencias ricas en AT en las que tiene lugar la apertura de la doble hélice, y el porcentaje en adenina y timina varía desde aproximadamente el 60 % para el plásmido P1, hasta el 84 % en pSC101, e incluso el 90 % en el plásmido F. Se cree que el número y la longitud de las secuencias de la región rica en AT de cada plásmido podrían jugar un papel en el inicio de la replicación (revisado en Rajewska *et al.*, 2012). Se ha obtenido el perfil de desestabilización de la doble hélice por presencia de sitios SIDD para la secuencia del origen de replicación de los plásmidos con control por iterones utilizados en este trabajo (Figura 42). Todos los perfiles obtenidos muestran lugares con alta probabilidad de desestabilización, que seguramente se correspondan con las secuencias ricas en AT presentes en todos los orígenes. Aunque estos plásmidos no presentan inducción de HIR, estos sitios serán los más susceptibles a abrirse en la doble hélice para el inicio de la replicación de los plásmidos.

Se obtuvieron los perfiles de inestabilidad de los orígenes de replicación de los plásmidos con control por RNA antisentido (Figura 43). En estas representaciones, los lugares de mayor probabilidad de apertura aparecen dispersos por la región del origen de los plásmidos, al contrario que en los orígenes cromosómicos. En los orígenes de replicación de los plásmidos con control por RNA antisentido no es común la presencia de regiones ricas en AT (Rajewska *et al.*, 2012). El plásmido R1 sí presenta tres regiones de 9 pb ricas en AT a la derecha de su origen de replicación, donde presumiblemente se abriría la doble hélice para el inicio de la replicación (Figura 8). En los plásmidos derivados de ColE1 la apertura de la doble hélice tiene lugar por la transcripción del pre-cebador RNA II, y no por la probabilidad de apertura de ciertos puntos del origen, lo que explica los perfiles tan diferentes. Las diferencias obtenidas

entre los perfiles de p15A y pBR322, ambos derivados de ColE1, podrían ser debidas a las diferencias en la secuencia de sus orígenes y también con respecto a ColE1 (Bird, 1981; Selzer *et al.*, 1983). Se han encontrado diferencias en la secuencia del RNA I en los orígenes de los tres plásmidos, que dan lugar a variaciones en los tres lazos que conforman las estructuras I, II y III de la molécula. El RNA I tiene un papel importante como inhibidor de la replicación, pues su interacción con el pre-cebador RNA II es lo que regula el inicio de la replicación. Las diferencias en los sitios de interacción del RNA I con el RNA II de p15A y pBR322 podrían ser las responsables del límite al aumento del número de copias de pBR322 tras aumento de temperatura a 41 °C descrita anteriormente y no observada para p15A.

2.4. La espectrofluorimetría, un método eficiente para la determinación del número de copias de plásmido

Debido a su impacto en las comunidades microbianas y su potencial natural para actuar como vectores de clonación, la investigación en torno a los plásmidos es intensa en base a perspectivas clínicas, biotecnológicas y de investigación fundamental (revisado en del Solar *et al.*, 1998). El uso de plásmidos en la producción eficiente de proteínas se basa en la elección de sistemas de expresión génica apropiados, disponer de un plásmido de alto número de copias y la optimización de las condiciones de crecimiento. Tan importante como la mejora de la producción plasmídica es disponer de una técnica para determinar el número de copias de plásmido con eficiencia, precisión y sencillez. En este trabajo se han utilizado tres técnicas para el cálculo de los parámetros pcn/masa, pcn/célula y pcn/volumen (Tabla 31).

A pesar de la precisión que caracteriza la detección de secuencias específicas amplificadas por qPCR, esta metodología presenta un porcentaje de desviación alto debido probablemente a la gran cantidad de procesos que implica el uso de esta técnica (Tabla 29). Desde la toma de muestras hasta la obtención del número de copias por masa, por célula o por ori, hay multitud de pasos en los que cualquier variación mínima puede resultar en una gran desviación en los resultados finales. Entre las técnicas basadas en la detección de fluorescencia de la proteína GFP $mut2$, los valores absolutos medios de fluorescencia por masa obtenidos para cada plásmido mediante espectrofluorimetría presentaron una desviación estándar algo superior en porcentaje a la calculada para los valores medios de fluorescencia por célula procedentes de citometría de flujo (Tablas 20 y 21). Esta observación pone de manifiesto que la técnica de citometría de flujo da valores medios más precisos para la cuantificación del número de copias de plásmido en base a la fluorescencia de GFP $mut2$.

A partir de los datos de pcn/volumen procedentes de qPCR, y tras su transformación a pcn/masa y pcn/célula, pcn/masa de espectrofluorimetría y pcn/célula de citometría de flujo, se calculó el parámetro pcn/ori, directamente comparable con las estimaciones por *Southern blot* (Tabla 31). En esta comparación, la espectrofluorimetría es la técnica que más precisión presenta en la obtención del número relativo de copias de plásmido. La espectrofluorimetría es un método más sencillo que la citometría de flujo y que la qPCR, tanto por la toma de muestras y su procesamiento, como por el manejo de los equipos de medida; además es el método menos costoso y más rápido. Se propone, por tanto, la espectrofluorimetría como la técnica más conveniente para la determinación del número de copias de plásmido, con respecto a la citometría de flujo y a la qPCR.

La espectrofluorimetría presentaría dos limitaciones. En primer lugar, el uso de esta técnica para la determinación del número de copias de plásmido requiere disponer del gen de alguna proteína fluorescente clonado en el plásmido de interés. El otro requisito es la necesidad de disponer de un espectrofluorímetro en el que realizar la medida. Las aplicaciones de la espectrofluorimetría en la determinación del número de copias de plásmido podría tener gran importancia para la monitorización a bajo coste de plásmidos usados en la producción

biotecnológica para la producción de proteínas valiosas, como vacunas o productos terapéuticos y para otras aplicaciones de ingeniería metabólica.

CONCLUSIONES / CONCLUDING REMARKS

1. El aumento de la temperatura de incubación a un cultivo de *S. typhimurium*, *B. subtilis* o *V. cholerae* induce replications cromosómicas extra en presencia de rifampicina. Esta replicación ha sido descrita previamente en *E. coli* y denominada HIR (*Heat Induced Replication*). En *V. cholerae*, el cromosoma II no induce HIR.
1. A temperature shift-up induces extra rounds of chromosome replication in the presence of rifampicin in S. typhimurium, B. subtilis and V. cholerae. This replication has been previously described in E. coli and it has been termed HIR (Heat Induced Replication). Chromosome II in V. cholerae does not induce HIR.
2. HIR inicia en *oriC* o en zonas próximas en *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae* (*oriC*).
2. HIR initiates in oriC or its close proximity in S. typhimurium, B. subtilis and V. cholerae (oriC).
3. En el origen de replicación de los cromosomas de *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *V. cholerae* se han localizado sitios SIDD (*Stress Induced Duplex Destabilization*) que podrían justificar los inicios de la replicación termoinducida.
3. Replication origins in B. subtilis, S. typhimurium and V. cholerae chromosomes present SIDD sites (Stress-Induced Duplex Destabilization), that could account for HIR initiation.
4. HIR es parcialmente dependiente de la actividad RecA en *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *V. cholerae*.
4. HIR is partially dependent on RecA activity in S. typhimurium, B. subtilis and V. cholerae.
5. Para inhibir el inicio de la replicación en *B. subtilis* es mejor usar cloranfenicol que rifampicina, ya que la rifampicina también inhibe la elongación de la replicación.
5. In B. subtilis, chloramphenicol must be used instead of rifampicin to inhibit initiation of replication, since rifampicin also blocks replication elongation.
6. El aumento de la temperatura de incubación a un cultivo exponencial de *B. subtilis* no lleva al aumento de la relación DNA/masa.
6. DNA/mass ratio does not increase after a temperature shift-up in exponentially growing B. subtilis cultures.
7. En *E. coli*, HIR se induce durante los primeros 30 minutos tras el aumento de temperatura.
7. In E. coli, HIR initiation takes place during the first 30 minutes after a temperature shift-up.

8. El aumento de temperatura a cultivos exponenciales de *E. coli*, inicialmente induce la replicación y a tiempos posteriores la división celular.
8. *A temperature shift-up in exponentially growing E. coli cultures, first induces chromosome replication, and time later cell division is induced.*
9. El estrés térmico induce la replicación de minicromosomas y plásmidos como adaptación a la nueva temperatura de crecimiento, en función de la velocidad de crecimiento. Esta respuesta no debe ser considerada análoga a HIR.
9. *Heat stress induces minichromosome and plasmid replication in response to the new growing temperature, depending on growth rate. This response must not be considered similar to HIR.*
10. El número de copias de minicromosoma y plásmido, tanto por masa como por célula, aumenta al aumentar la temperatura de crecimiento, en función de la velocidad de crecimiento.
10. *Minichromosome and plasmid copy number, both per mass and per cell, increases as long as the growing temperature rises, according to growth rate.*
11. En crecimiento exponencial a 41 °C, el tamaño de las células de *E. coli* portadoras de plásmidos con control por RNA antisentido aumenta con respecto a 30 °C.
11. *In exponential growth at 41 °C, the size of E. coli cells carrying plasmids controlled by antisense RNA increases compared to cells growing at 30 °C.*
12. En minicromosomas, la inducción de la replicación por aumento de temperatura es parcialmente dependiente de la función de RecA; mientras que en crecimiento exponencial, la replicación del minicromosoma no depende de RecA.
12. *In minichromosomes, induction of replication by temperature shift-up is partially dependent on RecA function; while in exponential growth, minichromosome replication does not depend on RecA.*
13. En plásmidos, la inducción de la replicación por aumento de temperatura es superior en ausencia de la actividad de RecA; mientras que en crecimiento exponencial, la presencia de RecA funcional favorece la replicación.
13. *In plasmids, induction of replication by temperature shift-up is higher in the absence of RecA activity; while in exponential growth, a functional RecA protein favours replication.*
14. Para la determinación del número de copias de plásmido, la espectrofluorimetría es un método más preciso y rápido, y menos costoso, que la citometría de flujo y la qPCR.
14. *For plasmid copy number determination, spectrofluorometry is a more accurate and faster, and less costly method than flow cytometry and qPCR.*

AGRADECIMIENTOS

Desde antes de terminar mi Licenciatura en Biología, mis profesores me advirtieron que elaborar una Tesis Doctoral no era una tarea fácil. Uno puede tener todo el interés y la perseverancia que se requiere, pero siempre hay elementos en contra que pueden conseguir desanimar a cualquiera. Afortunadamente he estado acompañada por muchas personas e instituciones que me han aportado la seguridad y el apoyo material y humano que he necesitado para llegar hasta este punto.

Mi primer agradecimiento es para mis directoras de tesis, la Dra. Rocío González-Soltero y la Dra. Emilia Botello, y para el Prof. Dr. Alfonso Jiménez-Sánchez, quien me acogió en su laboratorio y me dio la oportunidad de iniciarme en la investigación. Gracias por guiar mis primeros pasos, por vuestro trabajo y vuestra dedicación, vuestra ayuda y vuestros consejos.

Al Ministerio de Ciencia y Educación le agradezco la concesión de la beca de Formación del Profesorado Universitario AP2007-02341 que me ha permitido desarrollar el trabajo presentado. También agradezco la financiación del proyecto BFU2007-0063942/BMC por parte del Ministerio de Educación y Ciencia y las ayudas a grupos GRU09130 y GR10058 por parte de la Junta de Extremadura.

En esta Tesis se ha trabajado con distintas estirpes y plásmidos, algunos de los cuales fueron cedidos amablemente por varios investigadores, citados en el apartado 1 de Materiales. A todos ellos, gracias.

Durante el desarrollo del trabajo de mi Tesis he tenido la ocasión de disfrutar de dos estancias. La primera, una estancia breve en la Universidad de Jaén, fue sufragada en parte por la concesión de una bolsa de viaje concedida por la Sociedad Española de Genética. La segunda, en la Universidad de Copenhague, fue cubierta por una beca para estancias breves concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. A ambas instituciones, gracias por la inversión realizada para mi formación en dichos centros. Del mismo modo, agradezco a los grupos de investigación de los Drs. Antonio Caruz, en la Universidad de Jaén, y Anders Løbner-Olesen, en la Universidad de Copenhague, que tan amablemente me acogieron en sus respectivos laboratorios y pusieron a mi disposición todo lo posible para que pudiera llevar a cabo mi trabajo.

En la Universidad de Extremadura, me cabe agradecer a todos los miembros que he conocido en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, sobretodo a los pertenecientes al Área de Genética, donde he desarrollado este trabajo. Del Área de Bioquímica y Biología Molecular agradezco al Dr. Carlos Gutiérrez permitirme utilizar el espectrofluorímetro y a su grupo de investigación por enseñarme a manejarlo; al Dr. Pedro Fernández y a sus 'mariachis' por dejarme trabajar con el luminómetro, el citómetro y el termociclador cuando lo he necesitado y sin importarles mis horarios; a la Dra. Ana Mata y su grupo por los materiales que me han prestado. Del Área de Microbiología, en el Departamento de Ciencias Biomédicas, agradezco al Dr. Germán Larriba y a todo su grupo que me permitieran utilizar la centrífuga y el espectrofotómetro de luz UV y también el préstamo de reactivos.

A Oliver Kenyon, director ejecutivo de Apogee Flow Systems, le agradezco enormemente que cada vez que he renovado el sistema operativo de mi portátil me haya hecho llegar la versión compatible correspondiente del software de análisis de citometría de flujo y su correspondiente licencia, sin preguntas y sin demora.

A mis amigos, que siempre hayan estado dispuestos a escucharme.

El último agradecimiento es el más importante en estas páginas y es para mi familia. A mis padres, que me han inculcado el gusto por la cultura y la educación, y me han apoyado en mi carrera académica. A mis hermanos, el pilar más importante en mi vida, les agradezco su paciencia. A ellos les debo todo.

¡Gracias a todos! Espero que estéis satisfechos y que lo disfrutéis como yo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerlund T, Nordström K, Bernander R (1995). Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:6791–6797.
- Alexandrov AI, Cozzarelli NR, Holmes VF, Khodursky AB, Peter BJ, Postow L, Rybenkov V, Vologodskii AV (1999). Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* 106:131–140.
- Armengod ME (1982). recF-dependent recombination as a SOS function. *Biochimie* 64:629–632.
- Arini A, Tuscan M, Churchward G (1992). Replication origin mutations affecting binding of pSC101 plasmid-encoded Rep initiator protein. *J Bacteriol* 174:456–463.
- Arène F, Tomoyasu T, Bukau B (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 55:3–9.
- Asai T, Sommer S, Bailone A, Kogoma T (1993). Homologous recombination-dependent initiation of DNA replication from DNA damage-inducible origins in *Escherichia coli*. *EMBO J* 12:3287–3295.
- Asai T, Bates DB, Boye E, Kogoma T (1998). Are minichromosomes valid model systems for DNA replication control? Lessons learned from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 29:671–675.
- Atlung T, Lobner-Olesen A, Hansen FG (1987). Overproduction of DnaA protein stimulates initiation of chromosome and minichromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 206:51–59.
- Bachmann BJ, Low KB, Taylor AL (1976). Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 40:116–167.
- Baek JH, Chattoraj DK (2014). Chromosome I controls chromosome II replication in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 10:e1004184.
- Balbás P, Soberón X, Merino E, Zurita M, Lomeli H, Valle F, Flores N, Bolívar F (1986). Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. *Gene* 50:3–40.
- Balbás P, Soberón X, Bolívar F, Rodríguez RL (1988). CHAPTER 1 - The Plasmid, pBR322. In: Denhardt RLRT, ed. *Vectors*. Butterworth Publishers. Stoneham, MA.
- Balbás P, Bolívar F (2004). Back to basics: pBR322 and protein expression systems in *E. coli*. In: Balbás y Lorence, eds. *Methods in Molecular Biology, vol 267: Recombinant gene expression – reviews and protocols*. Humana Press, Inc. Totowa, NJ.
- Bates D (2008). The bacterial replisome: back on track? *Mol Microbiol* 69:1341–1348.
- Beachman IR, Barth PT, Pritchard RH (1968). Constitutivity of thymidine phosphorylase in deoxyriboaldolase negative strains: dependence of thimine requirement and concentration. *Bioph Biochem Abstract* 166:589-592.
- Berardini M, Mackay W, Loechler EL (1997). Evidence for a recombination-independent pathway for the repair of DNA interstrand cross-links based on a site-specific study with nitrogen mustard. *Biochemistry* 36:3506–3513.

- Bernander R, Krabbe M, Nordström K (1992). Mapping of the in vivo start site for leading strand DNA synthesis in plasmid R1. *EMBO J* 11:4481–4487.
- Bi C, Benham JC (2004). WebSIDD: server for predicting stress-induced duplex destabilized (SIDD) sites in superhelical DNA. *Bioinformatics*. 20:1477-1479.
- Bi X, Liu LF (1994). *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J Mol Biol* 235:414–423.
- Bird RE, Louarn JM, Martuscelli J, Caro L (1972). Origin and sequence of chromosome replication in *Escherichia coli*. *JMB* 70:549-566.
- Bird RE (1981). Homology between *Escherichia coli* plasmids ColE1 and p15A. *J Bacteriol* 145:1305–1309.
- Birnboim HC (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-255.
- Blomberg P, Nordström K, Wagner EG (1992). Replication control of plasmid R1: RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J* 11:2675–2683.
- Boye E, Lobner-Olesen A, Skarstad K (2000). Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* 1:479–483.
- Botello E (1994). Inducción térmica del inicio de la replicación cromosómica en *Escherichia coli*. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. ISBN 84-7723-725-5.
- Botello E, Jiménez-Sánchez A (1997). A temperature shift-up induces initiation of replication at *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 26:133-144.
- Botello E, Nordström K (1998). Effects of chromosome underreplication on cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:6364–6374.
- Bouet J-Y, Lane D (2009). Molecular basis of the supercoil deficit induced by the mini-F plasmid partition complex. *J Biol Chem* 28:165–173.
- Bramhill D, Kornberg A (1998). Duplex opening by DnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* 52:743-755.
- Brantl S (2002a). Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 1575:15–25.
- Brantl S (2002b). Antisense RNAs in plasmids: control of replication and maintenance. *Plasmid* 48:165-173.
- Bravo A, Serrano-Heras G, Salas M (2005). Compartmentalization of prokaryotic DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* 29:25–47.
- Bremer H, Churchward G (1977). Deoxyribonucleic acid synthesis after inhibition of initiation of rounds of replication in *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* 130:692–697.

- Bremer H, Dennis PP (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In: Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli and Salmonella*. Washington DC: ASM Press. pp 1553-1569.
- Browning DF, Grainger DC, Busby SJ (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* 13:773–780.
- Budman DR, Pardee AB (1967). Thymidine and thymine incorporation into nucleic acid: inhibition and repression by uridine of thymidine phosphorylase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 94:1546-1550.
- Campbell, A (1957). Synchronization of cell division. *Bacteriol Rev* 21:263-272.
- Camps M (2010). Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Pat DNA Gene Seq* 4:58–73.
- Carapuça E, Azzoni AR, Prazeres DMF, Monteiro GA, Mergulhão FJM (2007). Time-course determination of plasmid content in eukaryotic and prokaryotic cells using Real-Time PCR. *Mol Biotechnol* 37:120-126.
- Cesareni G, Helmer-Citterich M, Castagnoli L (1991). Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet* 7:230–235.
- Chai Q, Singh B, Peisker K, Metzendorf N, Ge X, Dasgupta S, Sanyal S (2014). Organization of ribosomes and nucleoids in *Escherichia coli* cells during growth and in quiescence. *J Biol Chem* jbc.M114.557348.
- Chan H, Lark KG (1969). Chromosome replication in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 97:848–860.
- Chang AC, Cohen SN (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134:1141–1156.
- Charbon G, Lobner-Olesen A (2011). A role for the weak DnaA binding sites in bacterial replication origins. *Mol Microbiol*. 82:272–274.
- Charbon G, Bjørn L, Mendoza-Chamizo B, Frimodt-Møller J, Lobner-Olesen A (2015). Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 42:13228–13241.
- Chattoraj DK (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol* 37:467–76.
- Chiang CS, Xu YC, Bremer H (1991). Role of DnaA protein during replication of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 225:435–442.
- Chien A-C, Hill NS, Levin PA (2012). Cell size control in bacteria. *Curr Biol* 22:R340–349.
- Cho E, Ogasawara N, Ishikawa S (2008). The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet Syst* 83:111–125.
- Chodavarapu S, Felczak MM, Yaniv JR, Kaguni JM (2008a). *Escherichia coli* DnaA interacts with HU in initiation at the *E. coli* replication origin. *Mol Microbiol* 67:781–792.

- Chodavarapu S, Gómez R, Vicente M, Kaguni JM (2008b). *Escherichia coli* Dps interacts with DnaA protein to impede initiation: a model of adaptive mutation. *Mol Microbiol* 67:1331–1346.
- Churchward G, Estiva E, Bremer H (1981). Growth rate-dependent control of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 145:1232-1238.
- Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry-US* 32:1212-1218.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2110-2114.
- Conley DL, Cohen SN (1995). Isolation and characterization of plasmid mutations that enable partitioning of pSC101 replicons lacking the partition (*par*) locus. *J Bacteriol* 177:1086–1089.
- Cook WR, de Boer PA, Rothfield LI (1989). Differentiation of the bacterial cell division site. *Int Rev Cytol* 118:1–31.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
- Coote JG, Wood DA, Mandelstam J (1973). Lethal effect of rifampicin in *Bacillus subtilis* as a complicating factor in the assessment of the lifetime of messenger ribonucleic acid. *Biochem J* 134:263–270.
- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404:37–41.
- Cox MM (2003). The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* 57:551–577.
- Cozzarelli NR, Kelly RB, Kornberg A (1968). A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15. *Proc Natl Acad Sci USA* 60:992–999
- Cozzarelli NR (1980a). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207:953–960.
- Cozzarelli NR (1980b). DNA topoisomerases. *Cell* 22:327–328.
- Cronan JE (2006). A family of arabinose-inducible *Escherichia coli* expression vectors having pBR322 copy control. *Plasmid* 55:152–157.
- de la Cueva-Méndez G, Pimentel B (2007). Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1. *EMBO Rep* 8:458–464.
- de la Cueva-Méndez G, Labib K (2008). New insights into the chromosome cycle. Conference on the Replication & Segregation of Chromosomes. *EMBO Rep* 9:1177–1181.
- Dartigalongue C, Missiakas D, Raina S (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *J Biol Chem* 276:20866–20875.

- DasGupta S, Mukhopadhyay G, Papp PP, Lewis MS, Chattoraj DK (1993). Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. *J Mol Biol* 232:23–34.
- Dasgupta S, Lobner-Olesen A (2004). Host controlled plasmid replication: *Escherichia coli* minichromosomes. Review. *Plasmid* 52:151-168.
- Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48:385–407.
- Donachie WD (1968). Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* 219:1077-1079.
- Donachie WD, Blakely GW (2003). Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 6:146–150.
- Donachie WD, Robinson AC (1987). Cell division: parameter values and the process. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, ed. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM Press. pp 1578-1593.
- Donczew R, Zakrzewska-Czerwińska J, Zawilak-Pawlik A (2014). Beyond DnaA: the role of DNA topology and DNA methylation in bacterial replication initiation. *J Mol Biol* 426:2269–2282.
- Donnelly CE, Walker GC (1989). *groE* mutants of *Escherichia coli* are defective in umiDC-dependent UV mutagenesis. *J Bacteriol* 171:6117-6125.
- Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD (2010). Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophys J* 99:3010–3019.
- Duigou S, Knudsen KG, Skovgaard O, Egan ES, Lobner-Olesen A, Waldor MK (2006). Independent control of replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes by DnaA and RctB. *J Bacteriol* 188:6419-6424.
- Egan ES, Waldor MK (2003). Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell* 114:521–530.
- Egan ES, Lobner-Olesen A, Waldor MK (2004). Synchronous replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Curr Biol* 14:501-502.
- Egan ES, Fogel MA, Waldor MK (2005). Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol Microbiol* 56:1129-1138.
- Eichenlaub R, Figurski D, Helinski DR (1977). Bidirectional replication from a unique origin in a mini-F plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1138–1141.
- Eisen J (1995). The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol* 41:1105-1123.
- Feinbaum R (1998). Vectors derived from plasmids. Introduction to plasmid biology. In: Wiley & Sons, Inc., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. 41:1.5.1–1.5.17.

- Filutowicz M, Dellis S, Levchenko I, Urh M, Wu F, York D (1994). Regulation of replication of an iteron-containing DNA molecule. In: Waldo E. Cohn and Kivie Moldave, ed. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press. 239–723.
- Firshein W, Kim P (1997). Plasmid replication and partition in *Escherichia coli*: is the cell membrane the key? *Mol Microbiol* 23:1–10.
- Fishov I, Zaritsky A, Grover NB (1995). On microbial states of growth. *Mol Microbiol* 15:789–794.
- Flåtten I, Fossum-Raunehaug S, Taipale R, Martinsen S, Skarstad K (2015). The DnaA protein is not the limiting factor for initiation of replication in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 11:e1005276.
- Fu H, Yuan J, Gao H (2015). Microbial oxidative stress response: novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Arch Biochem Biophys* 584:28–35.
- Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A (1984). The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other sites. *Cell* 38:889-900.
- Funnell BE (1988). Participation of *Escherichia coli* integration host factor in the P1 plasmid partition system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6657–6661.
- Galitski T, Roth JR (1997). Pathways for homologous recombination between chromosomal direct repeats in *Salmonella Typhimurium*. *Genetics* 146:751–767.
- Gao F, Zhang C-T (2007). DoriC: a database of *oriC* regions in bacterial genomes. *Bioinformatics* 23:1866-1867.
- Gao F, Luo H, Zhang C-T (2013). DoriC 5.0: an updated database of *oriC* regions in both bacterial and archaeal genomes. *Nucleic Acids Res* 41:90–93.
- Gao F (2014). Recent advances in the identification of replication origins based on the Z-curve method. *Curr Genomics* 15:104–112.
- Gao F (2015). Bacteria may have multiple replication origins. *Front Microbiol* 6:324.
- Garzón A, Canoand DA, Casadesús J (1995). Role of Erf recombinase in P22-mediated plasmid transduction. *Genetics* 140:427-434.
- Gerdes K, Møller-Jensen J, Bugge Jensen R (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* 37:455–466.
- Gerdes K, Wagner GH (2007). RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* 10:117-124.
- Gerding MA, Chao MC, Davis BM, Waldor MK (2015). Molecular dissection of the essential features of the origin of replication of the second *Vibrio cholerae* chromosome. *MBio* 6:e00973.
- Gille H, Messer W (1991). Localized DNA melting and structural perturbations in the origin of replication, *oriC*, of *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J* 10:1579-1584.

- Giraldo R, Fernández-Tresguerres ME (2004). Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* 52:69–83.
- Giuliodori AM, Gualerzi CO, Soto S, Vila J, Tavío MM (2007). Review on bacterial stress topics. *Ann N Y Acad Sci* 1113:95–104.
- Goldberg I, Mekalanos JJ (1986). Cloning of the *Vibrio cholerae* *recA* gene and construction of a *Vibrio cholerae* *recA* mutant. *J Bacteriol* 165:715–722.
- González-Soltero R, Jiménez-Sánchez A, Botello E (2006a). Induction of chromosome replication as a heat stress response in *Escherichia coli*. En: Mendez-Vilas A, ed. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp 122-126. DOI 10.1002/9783527611904.ch114
- González-Soltero R, Botello E, Jiménez-Sánchez A (2006b). Initiation of heat-induced replication requires DnaA and the L-13mer of *oriC*. *J Bacteriol* 188:8294-8298.
- González-Soltero R (2007). Replicación inducida por estrés térmico en cromosoma y plásmidos de *Escherichia coli*. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. ISBN 978-84-7723-764-8.
- González-Soltero R, Jiménez-Sánchez A, Botello E (2008). Functional requirements for heat induced genome amplification in *Escherichia coli*. *Process Biochem*. 43:1162-1170.
- Goranov AI, Breier AM, Merrikh H, Grossman AD (2009). YabA of *Bacillus subtilis* controls DnaA-mediated replication initiation but not the transcriptional response to replication stress. *Mol Microbiol* 74:454–466.
- Grossman AD, Straus DB, Walter WA, Gross CA (1987). Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1:179–184.
- Guijo MI, Patte J, del Mar Campos M, Louarn JM, Rebollo JE (2001). Localized remodeling of the *Escherichia coli* chromosome: the patchwork of segments refractory and tolerant to inversion near the replication terminus. *Genetics* 57:1413–1423.
- Guzmán EC, Jiménez-Sánchez A, Orr E, Pritchard RH (1988). Heat stress in the presence of low RNA polymerase activity increases chromosome copy number of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 212:203–206.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol* 177:4121–4130.
- Guzmán EC, Caballero JL, Jiménez-Sánchez A (2002). Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43:487–495.
- Hajduk IV, Rodrigues CDA, Harry EJ (2015). Connecting the dots of the bacterial cell cycle: coordinating chromosome replication and segregation with cell division. *Semin Cell Dev Biol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2015.11.012>

- Hansen FG, Atlung T, Braun RE, Wright A, Hughes P, Kohiyama M (1991). Initiator (DnaA) protein concentration as a function of growth rate in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173:5194-5199.
- Haugland RP (1992). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 5th ed. Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.
- Hayes F (2003). The function and organization of plasmids. In: Nicola Casali & Andrew Preston, eds. *Methods in Molecular Biology, vol. 235: E. coli plasmid vectors - methods and applications*. Humana Press, Inc. Totowa, NJ.
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Quin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–483.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994). Wavelength mutations and postranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12501-12504.
- Helmstetter CE, Thornton M, Zhou P, Bogan JA, Leonard AC, Grimwade JE (1997). Replication and segregation of a miniF plasmid during the division cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:1393–1399.
- Hengge-Aronis R (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:373–395.
- Herman A, Wegrzyn A, Wegrzyn G (1994). Regulation of replication of plasmid pBR322 in amino acid-starved *Escherichia coli* strains. *Mol Gen Genet* 243:374–378.
- Hildenbrand C, Stock T, Lange C, Rother M, Soppa J (2011). Genome Copy Numbers and Gene Conversion in Methanogenic Archaea. *J Bacteriol* 193:734-743.
- Hill NS, Kadoya R, Chatteraj DK, Levin PA (2012). Cell size and the initiation of DNA replication in bacteria. *PLoS Genet* 8:e1002549.
- Hinchliffe E, Kuempel PL, Masters M (1983). *Escherichia coli* minichromosomes containing the pSC101 partitioning locus are not stably inherited. *Plasmid* 9:286–297.
- Hiraga S (1992). Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 61:283–306.
- Ho P-Y, Amir A (2015). Simultaneous regulation of cell size and chromosome replication in bacteria. *Front Microbiol* 6:662.
- Hohlfeld R, Vielmetter W (1973). Bidirectional growth of the *E. coli* chromosome. *Nature* 242:130-132.
- Martínez-García E, Benedetti Im Hueso A, de Lorenzo V (2015). Mining environmental plasmids for synthetic biology parts and devices. *Microbiol Spectrum* 3(1):PLAS-0033-2014
- Ikeda H, Inuzuka M, Tomizawa JI (1969). P1-like plasmid in *Escherichia coli* 15. *J Mol Biol* 50:457–470.

- Ishiai M, Wada C, Kawasaki Y, Yura T (1994). Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid: functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3839–3843.
- Ishida T, Akimitsu N, Kashioka T, Hatano M, Kubota T, Ogata Y, Sekimizu K, Katayama T (2004). DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the timely initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *J Biol Chem* 279:45546–45555.
- Ishikawa S, Ogura Y, Yoshimura M, Okumura H, Cho E, Kawai Y, Kurokawa K, Oshima T, Ogasawara N (2007). Distribution of stable DnaA-binding sites on the *Bacillus subtilis* genome detected using a modified ChIP-chip method. *DNA Res* 14:155–168.
- Jaffé-Brachet A, D'Ari R (1977). Maintenance of bacteriophage P1 plasmid. *J Virol* 23:476–482.
- Janion C (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* 4:338–344.
- Jeiranian HA, Courcelle CT, Courcelle J (2012). Inefficient replication reduces RecA-mediated repair of UV-damaged plasmids introduced into competent *Escherichia coli*. *Plasmid* 68:113–124.
- Jensen MR, Lobner-Olesen A, Rasmussen KV (1990). *Escherichia coli* minichromosomes: random segregation and absence of copy number control. *J Mol Biol* 215:257–265.
- Jensen KF (1993). The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have a *tph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J Bacteriol* 175:3401–3407.
- Jiménez-Sánchez A, Guzmán, EC (1988). Direct procedure for determination of the number of replication forks and the reinitiation fraction in bacteria. *CABIOS* 4:432–433.
- Jiménez-Sánchez A, Guzmán EC, Botello EC (1993). An approach to the control of initiation of chromosome replication in *E. coli*. *Curr Top Mol Genet* 1:33–48.
- Jonas K (2014). To divide or not to divide: control of the bacterial cell cycle by environmental cues. *Curr Opin Microbiol* 18:54–60.
- Kadoya R, Chattoraj DK (2012). Insensitivity of chromosome I and the cell cycle to blockage of replication and segregation of *Vibrio cholerae* chromosome II. *MBio* 3:1–9.
- Kaguni JM (2011). Replication initiation at the *Escherichia coli* chromosomal origin. *Curr Opin Chem Biol* 15:606–613.
- Kaguni JM (2013). DNA Replication: Initiation in Bacteria. In: Lane WJLD, editor. Encyclopedia of Biological Chemistry [Internet]. Waltham: Academic Press; p. 121–125.
- Kahn ML, Figurski D, Ito L, Helinski DR (1979). Essential regions for replication of a stringent and a relaxed plasmid in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43:99–103.
- Katayama T, Ozaki S, Keyamura K, Fujimitsu K (2010). Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nat Rev Microbiol* 8:163–170.

- Kaur G, Vora MP, Czerwonka CA, Rozgaja TA, Grimwade JE, Leonard AC (2014). Building the bacterial orisome: high-affinity DnaA recognition plays a role in setting the conformation of *oriC* DNA. *Mol Microbiol* 91:1148–1163.
- Kawakami H, Katayama T (2010). DnaA, ORC, and Cdc6: similarity beyond the domains of life and diversity. *Biochem Cell Biol* 88:49–62.
- Kawasaki Y, Matsunaga F, Kano Y, Yura T, Wada C (1996). The localized melting of mini-F origin by the combined action of the mini-F initiator protein (RepE) and HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 253:42–49.
- Klumpp S, Zhang Z, Hwa T (2009). Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* 139:1366–1375.
- Klumpp S (2011). Growth-rate dependence reveals design principles of plasmid copy number control. *PLoS ONE* 6:e20403. doi:10.1371/journal.pone.0020403.
- Kogoma T (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:212–238.
- Koppes LHC, von Meyenburg K (1987). Nonrandom minichromosome replication in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169:430–433.
- Khodursky AB (2007). Evolution, adaptation, and supercoiling. *J Bacteriol* 189:5789–5791.
- Khodursky A, Guzmán EC, Hanawalt PC (2015). Thymineless death lives on: new insights into a classic phenomenon. *Annu Rev Microbiol* 69:247–263.
- Koch B, Ma X, Lobner-Olesen A (2010). Replication of *Vibrio cholerae* chromosome I in *Escherichia coli*: dependence on dam methylation. *J Bacteriol* 192:3903–3914.
- Kornberg A, Baker TA (1992). DNA replication, 2nd Edition. WH Freeman and Company, New York, NY.
- Kowalczykowski SC (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25:156–165.
- Krause M, 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.
- Kretschmer FJ, Chang AC, Cohen SN (1975). Indirect selection of bacterial plasmids lacking identifiable phenotypic properties. *J Bacteriol* 124:225–231.
- Kreuzer KN (2013). DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012674.
- Kües U, Stahl U (1989). Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 53:491–516.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borris R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Cordani JJ, Connerton IF, Cummings

- NJ, Daniel RA, Denziot F, Devine KM, Düsterhöft A, Ehrlich SD, Emerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Hènaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo MF, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee SM, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauël C, Médigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moestl D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park SH, Parro V, Pohl TM, Portelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, Pujic P, Purnelle B, Rapoport G, Rey M, Reynolds S, Rieger M, Rivolta C, Rocha E, Roche B, Rose M, Sadaie Y, Sato T, Scanlan E, Schleich S, Schroeter R, Scoffone F, Sekiguchi J, Sekowska A, Séror SJ, Serror P, Shin BS, Soldo B, Sorokin A, Tacconi E, Takagi T, Takahashi H, Takemaru K, Takeuchi M, Tamakoshi A, Tanaka T, Terpstra P, Togoni A, Tosato V, Uchiyama S, Vandebol M, Vannier F, Vassarotti A, Viari A, Wambutt R, Wedler H, Weitzenegger T, Winters P, Wipat A, Yamamoto H, Yamane K, Yasumoto K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa HF, Zumstein E, Yoshikawa H, Danchin A (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249-256.
- Laban A, Cohen A (1981). Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 184:200-207.
- Lakowick JR (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press.
- Lark KG (1972). Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in *Escherichia coli* 15T. *J Mol Biol* 64:47-60.
- Lauder SD, Kowalczykowski SC (1993). Negative co-dominant inhibition of RecA protein function. Biochemical properties of the RecA1, RecA13 and RecA56 proteins and the effect of RecA56 protein on the activities of the wild-type RecA protein function in vitro. *J Mol Biol* 234:72-86.
- Lee CL, Ow DSW, Oh SKW (2006). Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods* 65:258-267.
- Lemaux PG, Herendeen SL, Bloch PL, Neidhardt FC (1978). Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* 13:427-434.
- Leonard AC, Helmstetter CE (1986). Cell cycle-specific replication of *Escherichia coli* minichromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5101-5105.
- Leonard AC, Helmstetter CE (1988). Replication patterns of multiple plasmids coexisting in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:1380-1383.
- Leonard AC, Méchali M (2013). DNA replication origins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a010116.
- Leonard AC, Grimwade JE (2011). Regulation of DnaA assembly and activity: taking directions from the genome. *Annu Rev Microbiol* 65:19-35.
- Leonard AC, Grimwade JE (2015). The orisome: structure and function. *Front Microbiol* 6:545.
- Lewin B (1993). *Genes* 2ª edición, volumen 1. Reverte.

- Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR (1998). Generation of established green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273:34970-34975.
- Lilly J, Camps M (2015). Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectr* 3:PLAS – 0029–2014.
- Lin-Chao S, Bremer H (1986). Effect of the bacterial growth rate on replication control of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 203:143-139.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Lobner-Olesen A, Atlung T, Rasmussen KV (1987). Stability and replication control of *Escherichia coli* minichromosomes. *J Bacteriol* 169:2835–2842.
- Lobner-Olesen A, Skarstad K, Hansen FG, von Meyenburg K, Boye E (1989). The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell* 57:881-889.
- Lobner-Olesen A (1999). Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells: implications for replication control. *EMBO J* 18:1712-1721.
- Louarn J, Funderburgh M, Bird RE (1974). More precise mapping of the replication origin in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 120:1-5.
- Lovett MA, Helinski DR (1976). Method for the isolation of the replication region of a bacterial replicon: construction of a mini-F plasmid. *J Bacteriol* 127:982–987.
- Luisi-DeLuca C, Lovett ST, Kolodner RD (1989). Genetic and physical analysis of plasmid recombination in *recB recC sbcB* and *recB recC sbcA* *Escherichia coli* K-12 mutants. *Genetics* 122:268-279.
- Lusetti SL, Cox MM (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem* 71:71–100.
- Mackiewicz P, Zakrzewska-Czerwinska J, Zawilak A, Dudek MR, Cebart S (2004). Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region. *Nucleic Acids Res* 32:3781-3791. doi: 10.1093/nar/gkh699.
- Magnan D, Bates D (2015). Regulation of DNA replication initiation by chromosome structure. *J Bacteriol* 197:3370–3377.
- Mandel M, Higa A (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162.
- Manen D, Caro L (1991). The replication of plasmid pSC101. *Mol Microbiol* 5:233–237.
- Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaultot D (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63:186–193.
- Marijuán PC, Navarro J, del Moral R (2015). How the living is in the world: an inquiry into the informational choreographies of life. *Prog Biophys Mol Biol* doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.07.002

- Marr AG, Harvey RJ, Trentini WC (1966). Growth and division of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 91:2388–2389.
- Marsh RC, Worcel A (1977). A DNA fragment containing the origin of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2720-2724.
- Meile J-C, Wu LJ, Ehrlich SD, Errington J, Noirot P (2006). Systematic localisation of proteins fused to the green fluorescent protein in *Bacillus subtilis*: identification of new proteins at the DNA replication factory. *Proteomics* 6:2135–2146.
- Mendoza-Chamizo B, González-Soltero R, Botello E (2012). Plasmid copy number quantification by spectrofluorometry. En: Mendez-Vilas A, ed. *Microbes in applied research: current advances and challenges*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore. pp 432-436. DOI 10.1142/9789814405041_0087
- Messer W (1972). Initiation of deoxyribonucleic acid replication in *Escherichia coli* B-r: chronology of events and transcriptional control of initiation. *J Bacteriol* 112:7–12.
- Messer W, Weigel C (1996). Initiation of chromosome replication. In: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM Press. pp 1579-1601.
- 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 (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 25:173–178.
- Michel B, Baharoglu Z, Lestini R (2007). Genetics of recombination in the model bacterium *Escherichia coli*. In: Aguilera A, Rothstein R, eds. *Molecular Genetics of Recombination*. Springer, Berlin, Germany. Pp. 1–26.
- Miller JH (1992). *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. J H Miller (ed), Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Mira A, Ochman H (2002). Gene location and bacterial sequence divergence. *Mol Biol Evol* 19:1350–1358.
- Miyada CG, Stoltzfus L, Wilcox G (1984). Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4120–4124.
- Miyakawa Y, Komano T, Maruyama Y (1980) Cell-cycle-specific inhibition by chloramphenicol of septum formation and cell division in synchronized cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 141:502–507.
- Molin S, Stougaard P, Light J, Nordström M, Nordström K (1981). Isolation and characterization of new copy mutants of plasmid R1, and identification of a polypeptide involved in copy number control. *Mol Gen Genet* 181:123–130.
- Morigen, Lobner-Olesen A, Skarstad K (2003). Titration of the *Escherichia coli* DnaA protein to excess *datA* sites causes destabilization of replication forks, delayed replication initiation and delayed cell division. *Mol Microbiol* 50:349–362.

- Morigen, Molina F, Skarstad K (2005). Deletion of the *datA* site does not affect once-per-cell-cycle timing but Induces rifampin-resistant replication. *J Bacteriol* 187:3913–3920.
- Moriya S, Firshein W, Yoshikawa H, Ogasawara N (1994). Replication of a *Bacillus subtilis* *oriC* plasmid *in vitro*. *Mol Microbiol* 12:469–478.
- Moriya S, Imai Y, Hassan AK, Ogasawara N (1999). Regulation of initiation of *Bacillus subtilis* chromosome replication. *Plasmid* 41:17–29.
- Moriya S, Kawai Y, Kaji S, Smith A, Harry EJ, Errington J (2009). Effects of *oriC* relocation on control of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, Engl)* 155:3070–3082.
- Morita MT, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (2000). Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5860–5865.
- Mühlig A, Behr J, Scherer S, Müller-Herbst S (2014). Stress response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to acidified nitrite. *Appl Environ Microbiol* 80:6373–6382.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:225-350.
- Myers CR, Myers JM (1997). Replication of plasmids with the p15A origin in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Lett Appl Microbiol* 24:221–225.
- Neale EK, Chapman GB (1970). Effect of low temperature on the growth and fine structure of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 104:518–528.
- Neidhardt FC, VanBogelen RA (1987). Heat shock response. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE, ed. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM Press. pp 1334-1345.
- Nielsen HJ, Youngren B, Hansen FG, Austin S (2007). Dynamics of *Escherichia coli* chromosome segregation during multifork replication. *J Bacteriol* 189:8660–8666.
- Nielsen O, Lobner-Olesen A (2008). Once in a lifetime: strategies for preventing re-replication in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO* 9:151-156.
- Niki H, Hiraga S (1999). Subcellular localization of plasmids containing the *oriC* region of the *Escherichia coli* chromosome, with or without the *sopABC* partitioning system. *Mol Microbiol* 34:498-503.
- Nordström K (2006). Plasmid R1 - replication and its control. *Plasmid* 55:1–26.
- Norris V, den Blaauwen T, Doi RH, Harshey RM, Janniere L, Jiménez-Sánchez A, Jin DJ, Levin PA, Mileykovskaya E, Minsky A, Misevic G, Ripoll C, Saier M, Skarstad K, Thellier M (2007). Toward a hyperstructure taxonomy. *Annu Rev Microbiol* 61:309–329.
- Ogura Y, Imai Y, Ogasawara N, Moriya S (2001). Autoregulation of the *dnaA-dnaN* operon and effects of DnaA protein levels on replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:3833-3841.

- Oh YT, Park Y, Yoon MY, Bari W, Go J, Min KB, Raskin DM, Lee KM, Yoon SS (2014). Cholera toxin production during anaerobic trimethylamine N-oxide respiration is mediated by stringent response in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 289:13232–13242.
- Ohmori H, Murakami Y, Nagata T (1987). Nucleotide sequences required for a ColE1-type plasmid to replicate in *Escherichia coli* cells with or without RNase H. *J Mol Biol* 198:223–234.
- Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T (2005). Vibrios commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* 187:752–757.
- O'Donovan GA (1978). Thymidine metabolism in bacteria and how or how not to label DNA. In: Molineux I, Kohiyama M, eds. *DNA synthesis: Present and Future*. Plenum Publishing Corporation. pp 219-253.
- Parikh H, Singh A, Krishnamachari A, Shah K (2015). Computational prediction of origin of replication in bacterial genomes using correlated entropy measure (CEM). *BioSystems* 128:19–25.
- Pal SK, Chattoraj DK (1988). P1 plasmid replication: initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. *J Bacteriol* 170:3554–3560.
- Park K, Mukhopadhyay S, Chattoraj DK (1998). Requirements for and regulation of origin opening of plasmid P1. *J Biol Chem* 273:24906–24911.
- Paulsson J, Chattoraj DK (2006). Origin inactivation in bacterial DNA replication control. *Mol Microbiol* 61:9-15.
- Paulton RJL (1971) Nuclear and cell division in filamentous bacteria. *Nature* 231:271–274.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.
- Pfaffl MW (2006). In: T Dorak, ed. *Real-time PCR*. International University Line, Abingdon, UK. pp 63-82.
- Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ (1993). CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3750-3754.
- Pérez-Arellano I, Zúñiga M, Pérez-Martínez G (2001). Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* 46:106–116.
- Pillet F, Sanchez A, Lane D, Anton Leberre V, Bouet J-Y (2011). Centromere binding specificity in assembly of the F plasmid partition complex. *Nucleic Acids Res* 39:7477–7486.
- Polaczek P, Kwan K, Campbell JL (1998). Unwinding of the *Escherichia coli* origin of replication (*oriC*) can occur in the absence of initiation proteins but is stabilized by DnaA and histone-like proteins IHF or HU. *Plasmid* 39:77–83.
- Pomerantz RT, O'Donnell M (2007). Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol* 15:156–164.

- Prasher DD, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormie MJ (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Pritchard RH (1974). On the growth and from of a bacterial cell. (Review Lecture). Royal Society of London Biological Sciences 267:3303-3333.
- Rahn-Lee L, Gorbatyuk B, Skovgaard O, Losick R (2009). The conserved sporulation protein YneE inhibits DNA replication in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 191:3736–3769.
- Rajewska M, Wegrzyn K, Konieczny I (2012). AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev* 36:408-434.
- Rasmussen R (2001). In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Quantification on the Light Cycler*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Pp 1-28.
- Rasmussen T, Jensen RB, Skovgaard O (2007). The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J* 26:3124–3131.
- Rebrikov DV, Trofimov DY (2006). Real-Time PCR: a review of approaches to data analysis. *Appl Biochem Micro+* 42-5:455-463.
- Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D (2008). *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol* 16:238–245.
- Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ (2012). Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet* 46:121–143.
- Rimsky S, Travers A (2011) Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr Opin Microbiol* 14:136–141.
- Riola J, Guarino E, Guzmán EC, Jiménez-Sánchez A (2007). Differences in the degree of inhibition of NDP reductase by chemical inactivation and by the thermosensitive mutation *nrdA101* in *Escherichia coli* suggest an effect on chromosome segregation. *Cell Mol Biol Lett* 12:70–81.
- Roberts RJ, Strike P (1986). Repair in *E. coli* of transforming plasmid DNA damaged by psoralen plus near-ultraviolet irradiation. *Mutat Res* 165:81–88.
- Robledo EA, Martin HA, Pedraza-Reyes M (2012). Mfd and transcriptional derepression cause genetic diversity in *Bacillus subtilis*. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:1246–1254.
- Roggkamp A (2007). Phylogenetic analysis of enteric species of the family Enterobacteriaceae using the *oriC*-locus. *Syst Appl Microbiol* 30:180–188.
- Rovinskiy N, Agbleke AA, Chesnokova O, Pang Z, Higgins NP (2012). Rates of gyrase supercoiling and transcription elongation control supercoil density in a bacterial chromosome. *PLoS Genet* 8:e1002845.
- Rozen S, Skaletsky H (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. pp 365-386.

- Ruiz-Echevarría MJ, Giménez-Gallego G, Sabariego-Jareño R, Díaz-Orejas R (1995). Kid, a small protein of the parD stability system of plasmid R1, is an inhibitor of DNA replication acting at the initiation of DNA synthesis. *J Mol Biol* 247:568–577.
- Russell DW, Zinder ND (1987). Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell* 50:1071–1079.
- Saha A, Haralalka S, Bhadra RK (2004). A naturally occurring point mutation in the 13-mer R repeat affects the oriC function of the large chromosome of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype. *Arch Microbiol* 182:421–427.
- Saint-Dic D, Kehrl J, Frushour B, Kahng LS (2008). Excess SeqA leads to replication arrest and cell division defect in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 190:5870-5878
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Nolan C, ed. Cold Spring Harbor.
- Sanchez H, Carrasco B, Ayora S, Alonso JC (2007). Homologous recombination in low dC + dG Gram-positive bacteria. In: Aguilera A, Rothstein R, eds. *Molecular Genetics of Recombination*. Springer, Berlin, Germany. Pp. 27–52.
- Sathiamoorthy S, Shin JA (2012). Boundaries of the origin of replication: creation of a pET-28a-derived vector with p15A copy control allowing compatible coexistence with pET vectors. *PLoS ONE* 7:e47259.
- Schaechter M, Maaløe O, Kjølgaard NO (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* 19:592-606.
- Schimke RT, Sherwood SW, Hill AB, Johnston RN (1986). Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: potential consequences and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2157–2161
- Schleif R (2000). Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends Genet* 16:559–565.
- Scholefield G, Whiting R, Errington J, Murray H (2011). Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol* 79:1089–1100.
- Schumacher MA, Funnell BE (2005). Structures of ParB bound to DNA reveal mechanism of partition complex formation. *Nature* 438:516–519.
- Schumacher MA, Mansoor A, Funnell BE (2007). Structure of a four-way bridged ParB-DNA complex provides insight into P1 segrosome assembly. *J Biol Chem* 282:10456–10464.
- Schumann W (2003). The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* 8:207–217.
- Selzer G, Som T, Itoht T, Tomizawa J-I (1983). The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of resealed plasmids. *Cell* 32:119-129.

- Seitz H, Welzeck M, Messer W (2001). A hybrid bacterial replication origin. *EMBO Rep* 2:1003–1006.
- Sernova NV, Gelfand MS (2008). Identification of replication origins in prokaryotic genomes. *Brief Bioinformatics* 9:376–91.
- Séror SJ, Casarégola S, Vannier F, Zouari N, Dahl M, Boye E (1994). A mutant cysteinyl-tRNA synthetase affecting timing of chromosomal replication initiation in *B. subtilis* and conferring resistance to a protein kinase C inhibitor. *EMBO J* 13:2472–2480.
- Seufert W, Messer W (1987). Start sites for bidirectional in vitro DNA replication inside the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *EMBO J* 6:2469–2472.
- Sakakibara Y (1996). Rifampin-induced initiation of chromosome replication in *dnaR*-deficient *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 178:1242–1247.
- Shapiro HM (2003). *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Wiley-Liss.
- Sharpe ME, Hauser PM, Sharpe RG, Errington J (1998). *Bacillus subtilis* cell cycle as studied by fluorescence microscopy: constancy of cell length at initiation of DNA replication and evidence for active nucleoid partitioning. *J Bacteriol* 180:547–555.
- Silva F, Passarinha L, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC (2009). Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *J Microbiol Biotechnol* 19:1408–1414.
- Silva F, Queiroz JA, Domingues FC (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 30:691–708.
- Skarstad K, Katayama T (2013). Regulating DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4):a012922.
- Skarstad K, Lobner-Olesen A, Atlung T, von Meyenburg K, Boye E (1989). Initiation of DNA replication in *Escherichia coli* after overproduction of the DnaA protein. *Mol Gen Genet* 218:50–56.
- Skarstad K, Boye E, Steen HB (1986). Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J* 5:1711–1717.
- Slavcev RA, Funnell BE (2005). Identification and characterization of a novel allele of *Escherichia coli dnaB* helicase that compromises the stability of plasmid P1. *J Bacteriol* 187:1227–1237.
- del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:434–464.
- del Solar G, Espinosa M (2000). Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* 37:492–500.
- Song C, Zhang S, Huang H (2015). Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front Microbiol* 6:1049.
- Srivastava P, Chatteraj DK (2007). Selective chromosome amplification in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 66:1016–1028.

- Stenzel TT, Patel P, Bastia D (1987). The integration host factor of *Escherichia coli* binds to bent DNA at the origin of replication of the plasmid pSC101. *Cell* 49:709–717.
- Stougaard P, Molin S, Nordström K (1981). RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6008–6012.
- Strike P, Roberts RJ (1982). Resident enhanced repair: novel repair process action on plasmid DNA transformed into *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 150:385–388.
- Sueoka N, Yoshikawa H (1965). The chromosome of *Bacillus subtilis*. I. Theory of marker frequency analysis. *Genetics* 52:747–757.
- Summers D (1998). Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol Microbiol* 29:1137–1145.
- Sutcliffe JG (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res* 5:2721–2728.
- Sutcliffe JG (1979). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43:77–90.
- Taddei F, Vulić M, Radman M, Matic I (1997). Genetic variability and adaptation to stress. *EXS* 83:271–290.
- Tao H, Bausch C, Richmond C, Blattner FR, Conway T (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* 181:6425–6440.
- Taschner PE, Huls PG, Pas E, Woldringh CL (1987). Division behavior and shape changes in isogenic *ftsZ*, *ftsQ*, *ftsA*, *pbpB*, and *ftsE* cell division mutants of *Escherichia coli* during temperature shift experiments. *J Bacteriol* 170:1533–1540.
- Thanbichler M, Shapiro L (2006). Chromosome organization and segregation in bacteria. *J Struct Biol* 156:292–303.
- Theocharis DA, Synetos D, Kalpaxis DL, Drainas D, Coutsogeorgopoulos C (1992). Kinetics of inhibition of peptide bond formation on bacterial ribosomes. *Arch Biochem Biophys* 292:266–272.
- Thompson FL, Iida T, Swings J (2004) Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 403-431.
- Thornton B, Basu C (2011). Real-Time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Edu* 39-2:145-154.
- Tolun A, Helinski DR (1981). Direct repeats of the F plasmid *incC* region express F incompatibility. *Cell* 24:687–694.
- Tomizawa J, Itoh T (1981). Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6096–1600.
- Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1421–1425.
- Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB (1998). The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *PNAS* 95:14464–14469.

- Trun NJ, Gottesman S (1990). On the bacterial cell cycle: *Escherichia coli* mutants with altered ploidy. *Genes Dev* 4:2036–2047.
- Val M-E, Soler-Bistué A, Bland MJ, Mazel D (2014). Management of multipartite genomes: the *Vibrio cholerae* model. *Curr Opin Microbiol* 22:120–126.
- Valdez-Cruz NA, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA (2011). Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioeng Bugs* 2:105–110.
- van Helvoort JM, Kool J, Woldringh CL (1996). Chloramphenicol causes fusion of separated nucleoids in *Escherichia coli* K-12 cells and filaments. *J Bacteriol* 178:4289–4293.
- Venkova-Canova T, Srivastava P, Chatteraj DK (2006). Transcriptional inactivation of a regulatory site for replication of *Vibrio cholerae* chromosome II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12051–12056.
- von Meyenburg K, Hansen FG, Nielsen LD, Riise E (1978). Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages lambda *asn*. *Mol Gen Genet* 160:287–295.
- von Meyenburg K, Hansen FG, Riise E, Bergmans HE, Meijer M, Messer W (1979). Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: genetic mapping and minichromosome replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 1:121–128.
- Wagner EGH, Altuvia S, Romby P (2002). Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. In: Dunlap JC, Wu c, Eds. *Advances in Genetics*. Academic Press, London, pp. 361–398.
- Wang H, Noordewier M, Benham CJ (2004). Stress-induced DNA duplex destabilization (SIDD) in the *E. coli* genome: SIDD sites are closely associated with promoters. *Genome Res* 14:1575–1584.
- Wang Z, Xiang L, Shao J, Wegrzyn A, Wegrzyn G (2006). Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism. *Microb Cell Fact* 5:34.
- Wegrzyn G (1999). Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid* 41:1–16.
- Whelan JA, Russel NB, Whelan MA (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J Immunol Meth.* 278:261–269.
- Wickner SH (1978). DNA replication proteins of *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 47:1163–1191.
- Wickner SH (1990). Three *Escherichia coli* heat shock proteins are required for P1 plasmid DNA replication: formation of an active complex between *E. coli* DnaJ protein and the P1 initiator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2690–2694.
- Wickner S, Hoskins J, McKenney K (1991). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7903–7907.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4576–4579.

- Wolanski M, Donczew R, Zawilak-Pawlik A, Zakrzewska-Czerwinska J (2015). *oriC*-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication. *Front Microbiol* 5:735.
- Wold S, Skarstad K, Steen HB, Stokke T, Boye E (1994). The initiation mass for DNA replication in *Escherichia coli* K-12 is dependent on growth rate. *EMBO J* 13:2097-2102.
- Yasbin RE, Fields PI, Andersen BJ (1980). Properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives freed on their natural prophages. *Gene* 12:155-159.
- Zeng J, Zhang L, Li Y, Wang Y, Wang M, Duan X, He Z-G (2010). Over-producing soluble protein complex and validating protein-protein interaction through a new bacterial co-expression system. *Protein Expr Purif* 69:47–53.
- Zhang R, Zhang C-T (2014). A brief review: The Z-curve theory and its application in genome analysis. *Curr Genomics* 15:78–94.
- Zhu L, Li Y, Cai Z (2015). Development of a stress-induced mutagenesis module for autonomous adaptive evolution of *Escherichia coli* to improve its stress tolerance. *Biotechnol Biofuels* 8:93.
- Zimmerman SB, Murphy LD (2001). Release of compact nucleoids with characteristic shapes from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5041–5049.
- Zyskind JW, Smith DW (1980). Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium* origin of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2460–2464.
- Zyskind JW, Cleary JM, Brusilow WS, Harding NE, Smith DW (1983). Chromosomal replication origin from the marine bacterium *Vibrio harveyi* functions in *Escherichia coli*: *oriC* consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1164–1168.

