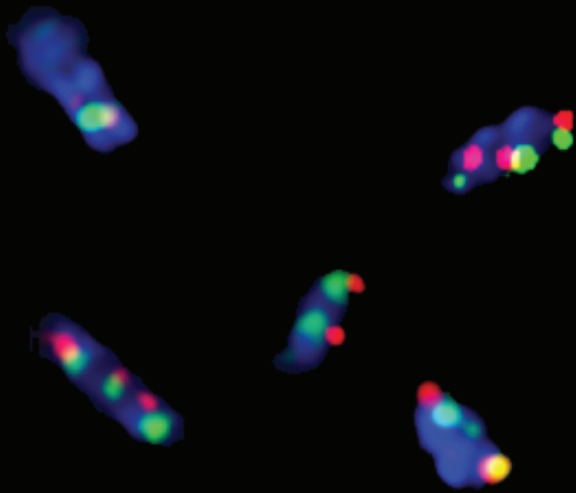




Universidad de Extremadura
Facultad de Ciencias

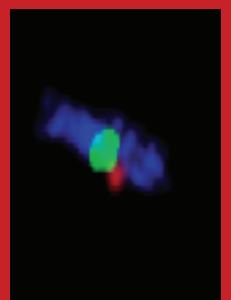
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular y Genética

Localización y
organización
de la maquinaria
de replicación y
de síntesis de
nucleótidos en
Escherichia coli



Tesis Doctoral

M^a Antonia Sánchez Romero



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

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



UNIVERSIDAD DE
EXTREMADURA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Genética

*Localización y organización de la
maquinaria de replicación y de síntesis
de nucleótidos en Escherichia coli*

TESIS DOCTORAL

presentada por

María Antonia Sánchez Romero

para optar al título de
Doctor en Biología con Mención Doctor Europeo por la
Universidad de Extremadura
Badajoz, 2008

Alfonso Jiménez Sánchez, Catedrático de Genética
y
Felipe Molina Rodríguez, Profesor Contratado-Doctor de la
Universidad de Extremadura

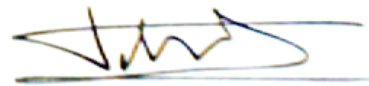
CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado “Localización y organización de la maquinaria de replicación y de síntesis de nucleótidos en *Escherichia coli*”, ha sido realizado por el Lcda. D^a María Antonia Sánchez Romero, bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura, y que, salvo mejor criterio del tribunal que ha de juzgarlo, reúne todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con Mención Doctor Europeo.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Badajoz a 24 de noviembre de 2008.



Fdo.: Prof. Dr. *Alfonso Jiménez Sánchez*
Director de la Tesis



Fdo.: Dr. *Felipe Molina Rodríguez*
Co-Director de la Tesis

A mis padres
por su apoyo en cualquiera de mis retos

A Encarna y a Alfonso
por su ayuda incondicional

*“La motivación es lo que te hace empezar.
El hábito es lo que te hace continuar”*

Jim Ryum

*“La casualidad nos da casi siempre lo que nunca se nos
hubiera ocurrido pedir”*

Alphonse de Lamartine



ÍNDICE

Índice de contenidos



Introducción	13
1. El ciclo celular bacteriano.....	13
2. La replicación en <i>E.coli</i>	16
2.1 Iniciación	16
2.1.1. oriC	16
2.1.2. Mecanismos de iniciación.....	18
2.1.3. Regulación del inicio de la replicación cromosómica	19
a) Secuestro del origen: unión de SeqA al DNA hemimetilado	19
b) Regulación de la actividad y expresión de la proteína DnaA.....	20
2.2 Elongación	21
2.3 Terminación.....	24
2.4 Segregación de los cromosomas	25
3. Movimiento del replisoma durante la replicación del DNA	28
4. Nucleósido-difosfato reductasa	30
4.1. Estructura y clases.....	31
4.2. Actividad y control alostérico	32
4.3. Regulación de la actividad de la RNR.....	33
4.4. Regulación de la expresión génica de la RNR.....	34
5. Hiperestructura de replicación.....	35
Materiales	41
1. Estirpes bacterianas	41
2. Fagos.....	42
3. Plásmidos	43
3.1. pKD46	43
3.2. pSUB11.....	43



3.3. pSU314	44
3.4. pCP20	45
3.5. pPS2	45
4. Productos químicos	46
4.1. Antibióticos	46
4.2. Productos radiactivos	46
4.3. Soluciones y tampones.....	46
4.3.1 Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico.....	46
4.3.2 Electroforesis de DNA	47
4.3.3 Electroforesis de proteínas.....	47
4.3.4 Western blot	47
4.3.5 Medida de la síntesis de DNA in vivo	48
4.3.6 Manipulación in vivo de bacterias y fagos	48
4.3.7 Citometría de flujo.....	48
4.3.8 Microscopía óptica e inmunofluorescencia.....	49
4.3.9 Inmunoprecipitación de cromatina- chip de DNA (ChIp-chip).....	49
5. Medios de crecimiento	50
5.1. Medios de crecimiento para bacterias.....	50
5.2. Medios de crecimiento para el fago P1.....	50
6. Enzimas.....	51
7. Anticuerpos	51
8. Oligonucleótidos.....	52
Métodos	53
1. Crecimiento de estirpes	53
1.1. Cambios en las condiciones de crecimiento	53
2. Conservación de las estirpes bacterianas	54
3. Aislamiento de DNA.....	54
3.1. Aislamiento de DNA cromosómico	54
3.2. Aislamiento de DNA plasmídico	55
4. Purificación y concentración de DNA	55
4.1. Purificación de DNA mediante extracciones con fenol/cloroformo.....	55

4.2. Concentración de DNA mediante precipitación	55
4.3. Obtención de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	56
5. Electroforesis de DNA	56
6. Medida de la concentración de DNA mediante densimetría de geles.....	57
7. Western blot	57
7.1. Obtención de extractos celulares.....	58
7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	58
7.3. Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa	59
7.4. Inmunodetección de las proteínas	59
8. Electroporación.....	60
9. Método de transformación de DNA de doble cadena mediante el sistema λ-Red.....	61
9.1. Amplificación del epítipo a partir de los plásmidos específicos.....	61
9.2. Transformación de CMT927 con el fragmento adecuado e inducción del sistema λ-Red para su inserción en el cromosoma bacteriano	64
9.3. Comprobación de la inserción del fragmento en el cromosoma bacteriano.....	65
9.4. Análisis de inmunodetección.	65
10. Transducción.....	66
10.1. Multiplicación de fagos	66
10.2. Transducción	67
10.3. Comprobación de los transductantes	67
11. Medida de la cantidad de DNA sintetizado	67
11.1. Marcaje del DNA in vivo	67
11.2. Medida de la síntesis de DNA.....	68
11.2.1. Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial.....	69
11.2.1. Medida de la síntesis de DNA tras la inhibición de los inicios de replicación.....	69
12. Citometría de flujo.....	69
12.1. Tratamiento de las muestras.	70
12.2. Análisis del ciclo celular.	70
13. Microscopía óptica de contraste de fase y fluorescencia	72

13.1. Instrumentación.....	72
13.2. Fijado de las muestras	73
13.3. Tinción de las células fijadas con los diferentes anticuerpos.	73
13.4. Inmunotinción con el anticuerpo SeqA.	74
13.5. Preparación de las muestras para su visualización.	74
14. Inmunoprecipitación de cromatina- chip de DNA (ChIp-chip).....	75
14.1. Introducción.	76
14.2. Condiciones de cultivo.....	76
14.3. Inmunoprecipitación de la cromatina	76
14.3.1. Obtención de la cromatina.	76
14.3.2. Inmuprecipitación y lavados de la muestra.	77
14.3.3. Elución de la muestra por calor	77
14.3.4. Ruptura de las uniones generadas (decrosslinking).....	77
14.4. Marcaje del DNA e hibridación a los microarrays.....	77

Resultados..... 83

Capítulo 1: Localización y organización de las horquillas de replicación

1.1. La proteína SeqA se localiza en posiciones discretas dentro de la célula y la formación de focos SeqA depende de la replicación cromosómica.....	83
1.2. ChIP-on-chip de cultivos sincronizados permite detectar las horquillas de replicación activas.....	87
1.3. Las horquillas de replicación presentan una organización dinámica.....	89
1.3.1. La organización de las horquillas de replicación es dependiente del ciclo celular.....	89
1.3.2. Análisis de la fracción de los nucleoides ocupada por focos de SeqA.....	90
1.3.3. El número de focos de replicación por célula sugiere una organización dinámica de los replisomas.....	92
1.3.4. Cohesión de las horquillas de replicación.....	93
1.4. Organización de las horquillas de replicación en un mutante en la nucleósido-difosfato reductasa	96

Capítulo 2: Localización y organización de la maquinaria de replicación: subunidad τ de la DNA polimerasa III y helicasa DnaB

2.1. Localización y organización de la subunidad τ de la DNA polimerasa III.....	101
---	-----

2.2. Localización y organización de la helicasa DnaB..... 107

2.3. Comparación de las proteínas DnaX y DnaB con la proteína SeqA 111

Capítulo 3. Localización y organización de la ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) de *E. coli*

3.1. RNR está localizada en focos discretos que dependen de la replicación cromosómica..... 119

3.2. Análisis comparativo con las proteínas DnaB, DnaX y SeqA 125

3.3. Distribución espacial de las proteínas DnaX, DnaB y SeqA con respecto a NrdB 129

3.4. Determinación de la interacción a nivel molecular de la RNR al DNA cromosómico..... 132

Discusión..... 135

Localización y organización de las horquillas de replicación..... 136

Localización y organización de la maquinaria de replicación..... 138

La maquinaria de replicación y los focos SeqA: idea del preensamblaje..... 141

NrdB se localiza en focos discretos, en igual número que los de proteínas del replisoma y a distancias muy cercanas de ellas 142

Conclusiones..... 149

Agradecimientos 155

Bibliografía..... 159

Índice de figuras y tablas



INTRODUCCIÓN

1. EL CICLO CELULAR BACTERIANO

El ciclo celular bacteriano engloba todos los procesos que una bacteria debe realizar desde su nacimiento hasta la división celular. Entre las fases más importantes están la replicación y segregación del cromosoma y la formación del septo para la división celular. El funcionamiento adecuado de estos procesos requiere la localización precisa de las maquinarias necesarias implicadas y la regulación coordinada, tanto espacial como temporal, para asegurar la generación de una descendencia viable.

En contraste con el ciclo celular eucariótico, donde puntos de control estrictos aseguran que la iniciación de un paso dependa de la finalización de un paso anterior y que una etapa no comience mientras no haya concluido la anterior (Elledge, 1996), el ciclo celular bacteriano, dependiendo de las condiciones de crecimiento, puede solapar dos o más rondas de replicación consecutivas (Cooper y Helmstetter, 1968). A pesar de esta diferencia en organización, ambos tipos de células deben asegurar que el genoma entero sea replicado una, y sólo una vez, en cada ciclo celular.

El ciclo celular bacteriano comprende tres periodos bien diferenciados: *B*, *C* y *D* (Cooper y Helmstetter, 1968) (Fig. 1).



FIGURA 1. El ciclo celular bacteriano.

El periodo *B* transcurre desde el nacimiento de la célula hasta el inicio de la replicación y se corresponde con la fase *G1* en eucariotes. El periodo *C* es el tiempo dedicado a la duplicación del material genético y es el equivalente de la fase *S* en organismos eucarióticos. El periodo *D* es el comprendido entre el final de la replicación y la división celular y equivale al periodo *G2* en los

organismos eucarióticos. (Donachie *et al.*, 1979; Norris *et al.*, 1994; Norris, 1995; Weinberger y Helmstetter, 1979). En ambos tipos de ciclo, la fase de mayor variabilidad es la que comprende el tiempo transcurrido desde el nacimiento de la célula al inicio de la replicación. Esta fase desaparece totalmente en células que crecen rápidamente y puede abarcar el ciclo completo en células quiescentes.

Cuando una población bacteriana crece en un medio no limitante, su crecimiento es continuo y exponencial. A lo largo de todo el crecimiento exponencial los valores medios de los parámetros celulares no cambian (masa por célula y DNA, RNA y proteínas por célula o por masa). A esto se denomina un crecimiento equilibrado. Cuando las bacterias crecen en diferentes medios de cultivo más o menos ricos en nutrientes, se adaptan a estos medios con velocidades de crecimiento mayores o menores, desde tres generaciones por hora hasta una generación cada muchas horas. A diferentes velocidades de crecimiento la composición de las células varía en términos de DNA, RNA, proteínas o masa celular, independientemente del tipo de medio utilizado para conseguir cada velocidad de crecimiento. El estado fisiológico celular depende de la velocidad de crecimiento y no de la composición del medio de cultivo. Las células que crecen lentamente son más pequeñas y tienen menos DNA y RNA y menos nucleoides por célula que las que crecen rápidamente (Bremer, 1996).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el RNA, con las proteínas y con los otros componentes celulares, el DNA no es sintetizado exponencialmente desde el nacimiento hasta la división de la célula. La replicación cromosómica transcurre linealmente a velocidad constante durante el periodo *C* (Bogan y Helmstetter, 1996; Haber, 1999).

La diferencia más notoria entre el ciclo celular bacteriano y el de organismos eucarióticos reside en que el tiempo requerido para completar la replicación del cromosoma bacteriano, *C*, puede ser superior al del ciclo celular o tiempo de generación, τ , mientras que en organismos eucarióticos el tiempo de replicación es siempre inferior a la duración total del ciclo. Cuando el tiempo requerido para completar la replicación y división supera al transcurrido desde el nacimiento hasta la división de la célula, es decir, cuando $C + D > \tau$, las replications que finalizan en un ciclo comienzan en el anterior o en dos precedentes. En estas condiciones se da un solapamiento de rondas de replicación y comienza una ronda antes de que finalice la que estaba en curso, pero siempre ha de darse una iniciación y una terminación por ciclo aunque no se correspondan la una con la otra (Fig. 2).

Si se produjera más de una iniciación por ciclo celular se daría más de una terminación por ciclo y la cantidad de DNA por célula aumentaría hasta que el cultivo dejara de ser viable (Bird *et al.*, 1972; Cooper y Helmstetter, 1968; Donachie, 1992, 1993). De este modo durante el crecimiento celular equilibrado, independientemente de la

velocidad y solapamiento de rondas de replicación, el tiempo transcurrido entre dos inicios consecutivos o tiempo de interiniciación (I), ha de ser igual al tiempo de generación τ . De este modo, el control de la replicación debe actuar sobre el inicio de la replicación, siendo independientes las velocidades de replicación y de crecimiento celular. Como la frecuencia de inicio determina la tasa de síntesis de DNA en el cultivo, su valor se debe mantener constante para asegurar un crecimiento equilibrado. De lo expuesto se concluye que el número de ciclos de replicación por cromosoma, n , depende exclusivamente de la relación entre el tiempo de replicación y el de generación:

$$n = C / \tau$$

Este parámetro determina a su vez la relación entre el número de puntos de replicación por cromosoma, $2(2^n - 1)$. La capacidad de modular n facilita que a una temperatura determinada el periodo C mantenga valores constantes en un amplio intervalo de velocidades de crecimiento.

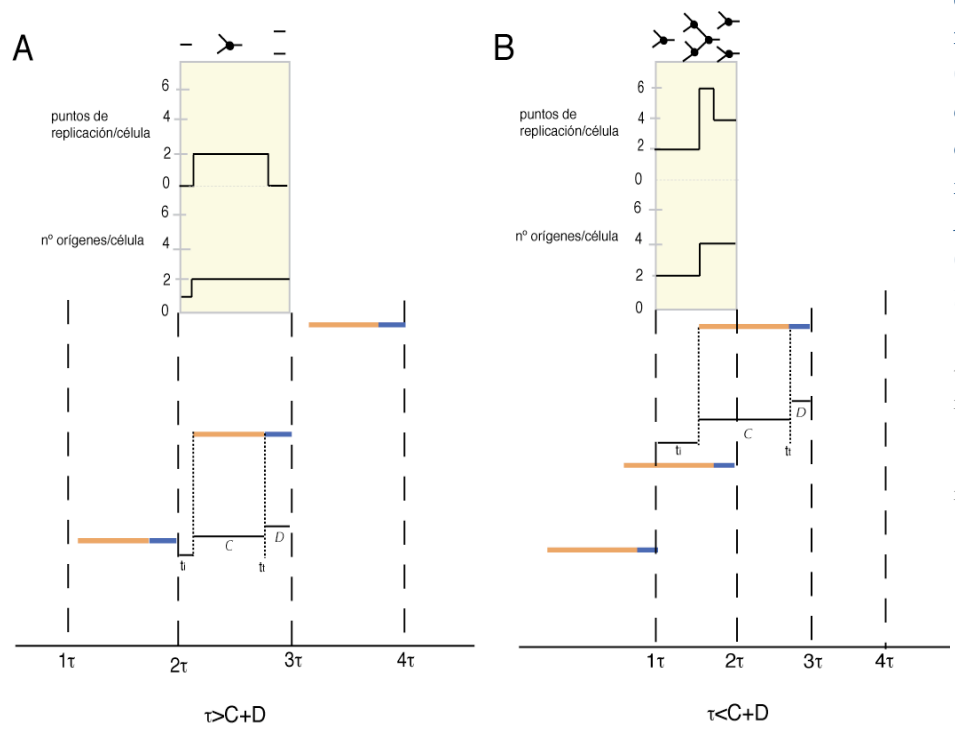


FIGURA 2. Puntos de replicación y número de orígenes por célula en función de la edad celular (parte superior). Fases del ciclo celular en cultivos creciendo lentamente y rápidamente (parte inferior, A y B respectivamente) (modificado Jiménez-Sánchez, 1998).

2. LA REPLICACIÓN EN *E. coli*

El cromosoma de *E. coli*, constituido por DNA de doble cadena con un tamaño de 4,6 Mpb, inicia su replicación a partir de un origen único denominado *oriC*, localizado en el minuto 84,57 del mapa genético. Desde *oriC*, la replicación procede de forma bidireccional hasta el término, *ter*, localizado aproximadamente en el lugar diametralmente opuesto del cromosoma (Bird *et al.*, 1972; Yasuda y Hirota, 1977).

El cromosoma bacteriano debe ser replicado una sola vez por ciclo celular (Boye *et al.*, 2000) y todos los elementos requeridos para completar el proceso de replicación tienen que estar disponibles en el inicio. Una vez que la replicación se inicia, no se requiere ni síntesis de RNA ni de proteínas y el cromosoma es replicado en su totalidad en ausencia de síntesis de cualquiera de estas dos macromoléculas. Esto significa que todas las proteínas necesarias para el proceso completo tienen que estar presentes en el inicio. Se estima que se necesitan al menos 23 proteínas para el inicio y más de 25 para la elongación, cada una con diferente número de copias (Baker y Wickner, 1992; Marians, 1992; McHenry, 2003). Si además incluimos las enzimas encargadas de la síntesis de los precursores, entonces hay que añadir de diez a quince proteínas más que deben funcionar de forma coordinada y corregulada.

Las diferencias estructurales y funcionales observadas a lo largo de la replicación han determinado que su estudio se divida en tres etapas: iniciación, elongación y terminación.

2.1. Iniciación

2.1.1 *oriC*

El origen de replicación, *oriC*, es una secuencia de 260 pb (Meijer *et al.*, 1979; Messer *et al.*, 1979; Sugimoto *et al.*, 1979). De izquierda a derecha, *oriC* contiene una secuencia de 12 pb rica en A+T, tres secuencias de 13 pb ricas en A+T denominadas trecémeros L, M y R que constituyen tres repeticiones directas, cada una de las

cuales comienza por un sitio GATC, reconocido por la metilasa Dam y la proteína SeqA, y cinco secuencias de unión de la proteína DnaA (R1, R5, R2, R3 y R4) con la secuencia consenso 5'-TTA/TTNCACA (Fig. 3). Además, a lo largo de su secuencia, *oriC* presenta otros nueve sitios GATC y tres secuencias de 6 pb de unión a DnaA-ATP (Messer, 2002; Schaper y Messer, 1995). Recientemente se han descrito otros sitios de unión de la proteína DnaA que difieren en su secuencia consenso de las secuencias R y que se han denominado sitios I (McGarry *et al.*, 2004). Los sitios I unen DnaA-ATP con mayor afinidad que DnaA-ADP y se ha propuesto que juegan un papel fundamental en el establecimiento de los niveles de DnaA-ATP apropiados para que el proceso de apertura de *oriC* tenga lugar (Leonard y Grimwade, 2005; Rice *et al.*, 1996). Dentro de *oriC* hay otras secuencias que unen proteínas que contribuyen de forma importante al inicio de la replicación cromosómica. Así, en la mitad izquierda se localiza una secuencia reconocida por la proteína IHF, mientras que en la zona derecha existe una secuencia diana para la proteína Fis (Fig. 3).

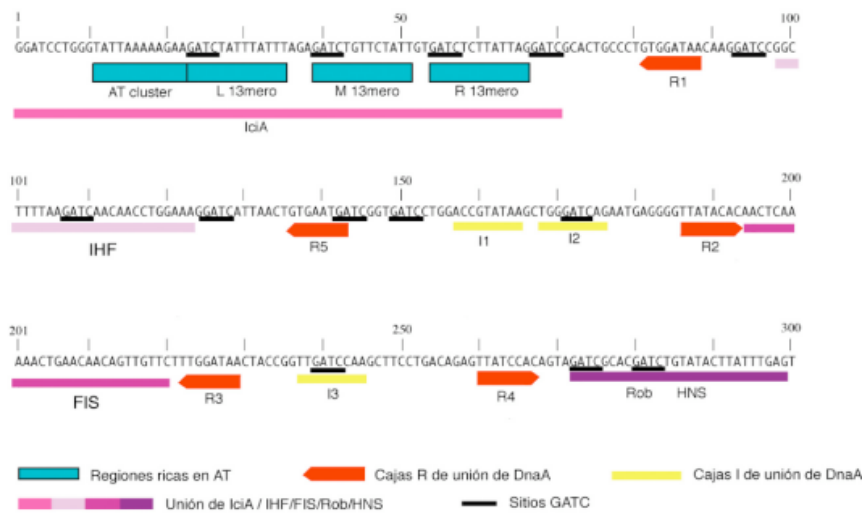


FIGURA 3. Secuencia de *oriC*.

Se muestran las regiones más características (modificado de Jiménez-Sánchez, 1998).

La unión de IHF a *oriC* ocasiona un incremento en la curvatura del DNA, favoreciendo la iniciación (Rice *et al.*, 1996). La metilación de las secuencias GATC mejora la unión de IHF y, por tanto, ayuda a la iniciación (Polaczek, 1998; Polaczek *et al.*, 1998). Fis actúa contrarrestando la acción de IHF. Extractos de Fis inhiben *in vitro* la apertura de *oriC* por DnaA, siendo esta acción suprimida por la adición de IHF (Hiasa y Mariani, 1994; Hwang *et al.*, 1990). En la secuencia mínima de *oriC* se ha localizado entre las secuencias R3 y R4 un sitio de unión de la girasa (Lothar *et al.*, 1984) y se han purificado proteínas de membrana que se unen específicamente a zonas dentro de *oriC*, tanto a DNA de cadena sencilla como doble (Polaczek, 1998; Weigel y Seitz, 2002). Que el inicio de la replicación tenga lugar

específicamente en *oriC* está garantizado por la acción de varias proteínas auxiliares, entre las que se incluyen la RNasa HI, la topoisomerasa I y la proteína HU (Bahloul *et al.*, 2001; Mizushima *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1984). Se ha descrito también la existencia de sitios de unión de las proteínas IciA, H-NS, ROB y Cnu/Hha (Fig. 3) (Kim *et al.*, 2005b; Lu *et al.*, 1994; Skarstad y Boye, 1993).

2.1.2. Mecanismos de iniciación

La interacción de la proteína DnaA con *oriC* define el comienzo del inicio de la replicación. Cuando la proteína DnaA está localizada en *oriC* forma homo-oligómeros que dan lugar a un gran complejo nucleoproteico visible al microscopio electrónico (Funnell *et al.*, 1987). Este ensamblaje de la proteína DnaA facilita la apertura de la doble hélice en la región de *oriC* rica en AT, y da lugar a cadenas sencillas de DNA que son necesarias para que se cargue la helicasa y tenga lugar el posterior ensamblaje de la maquinaria de replicación (Bramhill y Kornberg, 1988).

Durante la mayor parte del ciclo celular la proteína DnaA permanece unida a los tres sitios de más alta afinidad (R1, R2 y R4) y sólo interacciona con los sitios R de menor afinidad (R3 y R5) y con los sitios I, que son específicas para el DnaA-ATP, cuando comienza la iniciación (Cassler *et al.*, 1995; McGarry *et al.*, 2004). La interacción de DnaA con la secuencia R3 a concentraciones saturantes, parece ser la señal que establece el inicio de la replicación (Cassler *et al.*, 1995; Keyamura *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2002) produciéndose la transición del complejo inicial (complejos núcleo-proteicos DnaA-DNA en *oriC*) al complejo abierto (Kaguni, 1997; Langer *et al.*, 1996; Skarstad y Boye, 1994). El resultado es la desnaturalización de la zona rica en A+T comenzando en el trecémero derecho, 13mero-R, y procediendo hacia la izquierda (Krause y Messer, 1999; Messer, 2002). De forma consecutiva, la proteína DnaA recluta a la helicasa DnaB hexamérica asociada con la DnaC unida a ATP, como un complejo B₆C₆, y la une a la región de cadena sencilla del complejo abierto. La proteína DnaC carga a la DnaB helicasa en el complejo abierto para promover la apertura de la doble hélice y formar el complejo pre-replicativo (Fig. 4). Durante este proceso, el ATP es hidrolizado y la proteína DnaC es liberada. En *E.coli*, no parece existir ningún control en el estado de complejo pre-replicativo y la transición de la replicación procede inmediatamente tras cargarse las holoenzimas DNA polimerasas III (McInerney *et al.*, 2007). Cuando los dNTP están presentes, la replicación puede comenzar (Herrick y Sclavi, 2007).

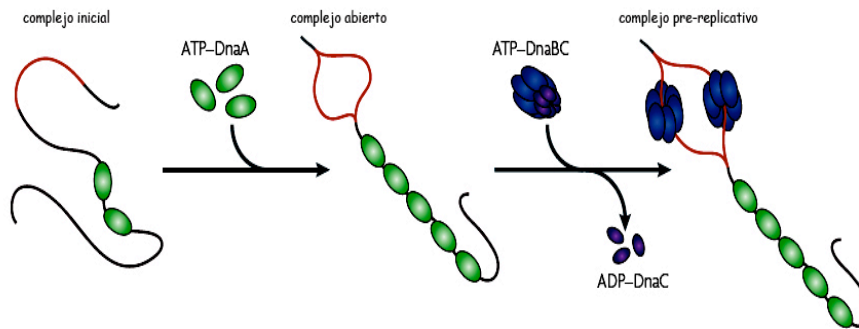


FIGURA 4. Remodelación de *oriC* mediado por la proteína DnaA (modificado de Mott y Berger, 2007).

La proteína DnaA (verde) se une a *oriC* en diversos sitios de unión de alta afinidad a lo largo del ciclo celular. En el momento de la iniciación, moléculas adicionales de ATP-DnaA se unen al origen, donde oligomerizan en grandes complejos nucleoproteicos y facilitan la apertura de la doble hélice. Una vez el DNA está desenrollado, la helicasa DnaB (azul) se carga, mediada por la proteína DnaC (púrpura), cargadora de la helicasa.

2.1.3. Regulación del inicio de la replicación cromosómica

No se conoce qué determina que la replicación se inicie en el momento adecuado, y simultáneamente en todos los orígenes de las células con solapamiento de rondas de replicación, pero sí se conocen los mecanismos que controlan que no haya inicios fuera del control del ciclo celular.

Los mecanismos implicados en el secuestro del origen aseguran que los nuevos orígenes de replicación no estén temporalmente disponibles para nuevas rondas de replicación, mientras que los mecanismos que influyen en el ajuste, autorregulación e inactivación de la proteína DnaA limitan la disponibilidad y la actividad de la proteína iniciadora de la replicación cromosómica.

a) Secuestro del origen: unión de SeqA al DNA hemimetilado

Los 11 sitios GATC de los orígenes recién replicados están metilados únicamente en una cadena y a estos orígenes hemimetilados se une la proteína SeqA que tiene alta afinidad por los sitios GATC hemimetilados. Esta unión ayuda a secuestrar los nuevos orígenes replicados y a prevenir los reinicios (Lu *et al.*, 1994). Es destacable que diversos sitios GATC en *oriC* coinciden con sitios de unión débil de la proteína DnaA. De esta forma, la unión de SeqA produce un bloqueo directo de la unión de la proteína DnaA al DNA, previniendo la formación del complejo inicial (Campbell y Kleckner, 1990; von Freiesleben *et al.*, 2000).

El secuestro del origen no sólo sirve para prevenir los reinicios inmediatos, sino que además los prepara para la nueva ronda de iniciación. Durante este tiempo, la proteína DnaA está solamente disponible unida a los sitios de alta afinidad R1, R2 y R4 (Nievera *et al.*, 2006).

Posteriormente, la enzima Dam metiltransferasa se encarga de la metilación de las secuencias GATC permitiendo nuevos inicios.

b) Regulación de la actividad y expresión de la proteína DnaA

La actividad de la proteína DnaA es inactivada durante el periodo de replicación por un proceso conocido como RIDA (Inactivación Reguladora de la proteína DnaA) por el que la proteína activa DnaA unida al ATP es convertida a la forma inactiva unida a ADP por hidrólisis del ATP (Katayama *et al.*, 1998). La actividad RIDA implica a dos proteínas: la proteína Hda relacionada con DnaA (Kato y Katayama, 2001) y la β -clamp de la holoenzima DNA pol III (codificada por el gen *dnaN*) (Katayama *et al.*, 1998). Estas proteínas forman un complejo incluso cuando β no está cargada en el DNA (Kawakami *et al.*, 2006). Sin embargo, solamente cuando β está cargada la proteína Hda puede estimular la actividad ATPasa del DnaA y promover su conversión a la forma inactiva Dna-ADP (Su'etsugu *et al.*, 2004). Al final del proceso de iniciación, la hidrólisis de DnaA-ATP por RIDA se acelera porque se forman las nuevas horquillas de replicación y más subunidades β se cargan en el DNA (Fig. 5).

E. coli no parece regular la actividad de DnaA mediante la degradación de la proteína, sin embargo, además del RIDA existe un segundo mecanismo para la reducción de la actividad DnaA durante el periodo posterior a la iniciación. Este método utiliza el mecanismo “de secuestro” para reducir la expresión del gen *dnaA*. Durante la replicación, la región del promotor del gen *dnaA*, que es rica en sitios GATC, es hemimetilada y secuestrada durante el mismo periodo que el origen de replicación. El secuestro del promotor del gen *dnaA* bloquea su transcripción (Campbell y Kleckner, 1990). Como el gen *dnaA* está cercano al origen, su secuestro coincide con el secuestro de *oriC*, así se evita la síntesis de nuevas proteínas DnaA durante el periodo de secuestro del origen.

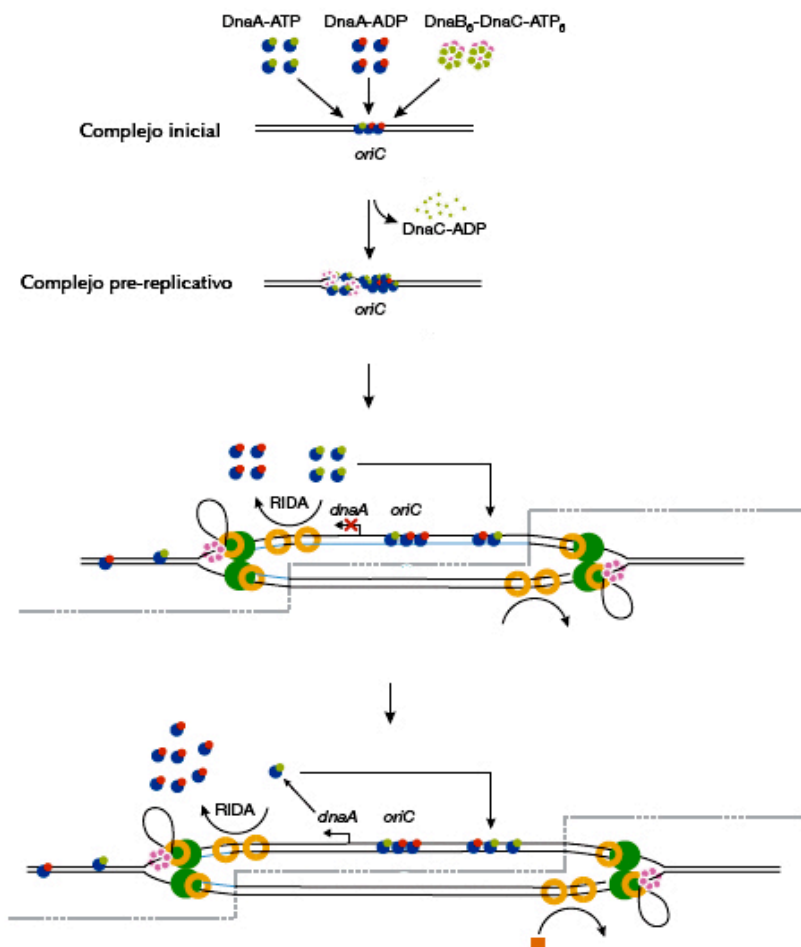


FIGURA 5. Mecanismo de iniciación de la replicación y la prevención de la re-replicación en *E. coli* (modificado de Nielsen & Lobner-Olesen).

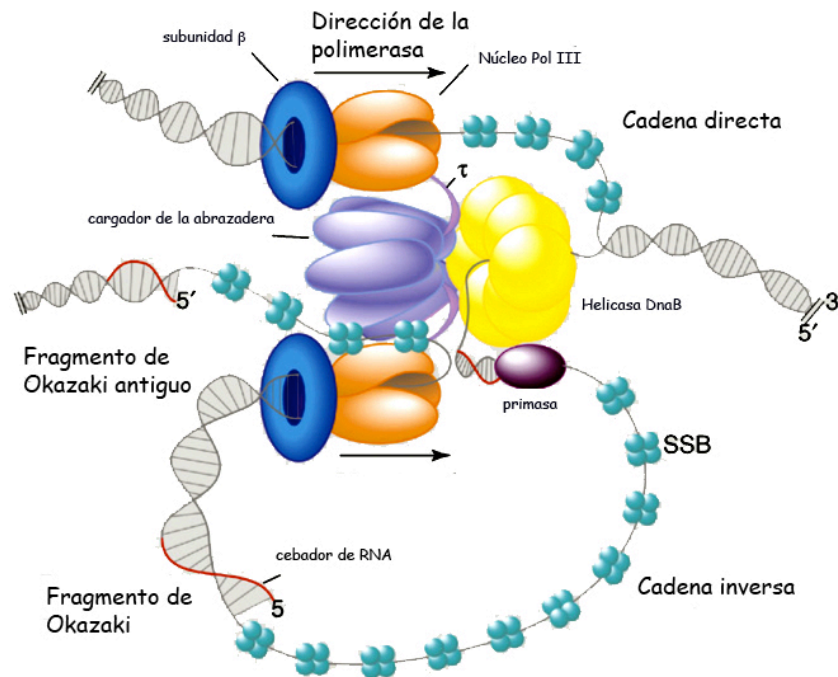
Los símbolos para las distintas proteínas de la replicación están indicados en la figura, excepto la DNA polimerasa (verde) y la cargadora de la β -clamp (amarillo). Las siglas RIDA corresponden al Proceso de Inactivación Reguladora de la proteína DnaA.

2.2. Elongación

Una vez formado el punto de replicación, la progresión de la horquilla de replicación requiere la acción coordinada de cuatro actividades básicas: DnaB helicasa, SSB, DNA primasa y DNA polimerasa III. La DnaB helicasa tiene su actividad de apertura de la doble hélice delante de la DNA polimerasa III con la que interacciona físicamente a través de la subunidad τ , lo que incrementa su velocidad de acción en más de diez veces (Kim *et al.*, 1996). La proteína SSB es necesaria para mantener uncatenarias las cadenas de DNA recién abiertas (Krause y Messer, 1999), lugar donde actuarán las proteínas replicativas. Una vez preparada la estructura del DNA, la DNA polimerasa III replica cada una de las cadenas complementarias. Ésta forma un complejo proteico compuesto por diez péptidos que se asocian en tres complejos fundamentales: el núcleo Pol III, la abrazadera deslizante β y el complejo γ , cargador de la abrazadera (Fig. 6) (Johnson y O'Donnell, 2005; Kelman y O'Donnell, 1995; McHenry, 1988, 2003).

FIGURA 6. Organización del replisoma de *E.coli* (modificado de Pomerantz y O'Donnell, 2007).

El replisoma de *E.coli* usa dos núcleos de la enzima DNA polimerasa III (naranja) para copiar las cadenas directas e inversas. La subunidad β -clamp (azul oscuro) le confiere la procesividad al núcleo de la DNA polimerasa III. El cargador de la proteína (púrpura claro) usa la energía de la hidrólisis del ATP para unir la subunidad β -clamp al DNA y permite la unión de la helicasa DnaB (amarillo) a las cadenas directas e inversas. La helicasa DnaB desenrolla el DNA y estimula la actividad de la primasa. La primasa (púrpura oscuro) sintetiza los primers de RNA. Las proteínas SSB (turquesa) previene la formación de la estructura secundaria en las cadenas sencillas de DNA.



El núcleo Pol III está compuesto por tres subunidades distintas: α , ϵ y θ (McHenry y Crow, 1979; McHenry, 2003; Studwell-Vaughan y O'Donnell, 1993). La subunidad α , codificada por el gen *dnaE*, es la que tiene la actividad DNA polimerasa $5' \rightarrow 3'$ (Maki *et al.*, 1985); la subunidad ϵ , codificada por *dnaQ*, tiene actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y corrige los errores cometidos durante la polimerización. La subunidad θ , codificada por *holE*, no tiene una función bien conocida salvo una ligera estimulación de la subunidad ϵ (Studwell y O'Donnell, 1990). Además, la delección del gen *holE* no tiene graves consecuencias para la célula (Slater *et al.*, 1994).

La subunidad β es necesaria para que el núcleo de la polimerasa sea una replicasa eficiente y procesiva. Esta subunidad es codificada por *dnaN* y forma una abrazadera en forma de anillo que une el núcleo α al DNA (Kong *et al.*, 1992; LaDuca *et al.*, 1986; Reems *et al.*, 1995; Stukenberg *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 2000)

El complejo γ , cargador de la abrazadera, es un complejo formado por cinco subunidades que se unen con una estequiometría definida, $\gamma\delta\delta'1\chi1\psi1$ y que son codificadas por los genes *dnaX* (47,5 kDa), *holA*, *holB*, *holC* y *holD* respectivamente (Jeruzalmi *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2000). El complejo γ proporciona la energía necesaria para unir la abrazadera β al DNA mediante la hidrólisis de ATP. Una vez que carga la subunidad β , se separa del DNA dejando a la abrazadera ensamblada, que a su vez une al núcleo α con el DNA (Hingorani y O'Donnell, 1998; Studwell-Vaughan y O'Donnell, 1993; Stukenberg *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1999). El cargador de la

abrazadera asociado con la holoenzima contiene una forma diferente del gen *dnaX*. La subunidad γ se produce mediante un salto ribosómico del marco de lectura del mRNA del gen *dnaX* que causa la terminación casi inmediata de la traducción y produce una proteína de 47,5 kDa (Flower y McHenry, 1986; Tsuchihashi y Kornberg, 1990). El producto completo del gen *dnaX* es la subunidad τ (71,1 kDa), que contiene la secuencia γ más un dominio C-terminal de 23,6 kDa (τ C). Este péptido τ C, de 23,6 kDa, consta de dos dominios, IV y V, que unen la DnaB y el núcleo de la Pol III a través de la subunidad α (Gao y McHenry, 2001a, b). La región τ C no es necesaria para la carga de la abrazadera pero sí es esencial para la viabilidad celular (Blinkova *et al.*, 1993), debido probablemente a su capacidad para organizar a todo el complejo proteico.

Debido a la estructura antiparalela de la molécula de DNA, la elongación de las nuevas cadenas de DNA encuentra una asimetría en el punto de replicación por el hecho de que la DNA polimerasa sólo sintetiza en el sentido 5'→3' (McHenry, 2003). Por tanto, una de las cadenas, la directa, se puede sintetizar de forma continua, mientras que la complementaria, la cadena inversa, ha de sintetizarse de forma discontinua en fragmentos de unas 2 kb, denominados fragmentos de Okazaki. Dado que la DNA polimerasa no puede iniciar la síntesis *de novo*, la DNA primasa es requerida para sintetizar pequeñas secuencias de RNA de unos 10-12 nucleótidos (Zechner *et al.*, 1992a, b) que son utilizadas como cebadores para iniciar cada fragmento de Okazaki. Puesto que un nuevo fragmento de Okazaki ha de iniciarse cada pocos segundos, para asegurar que a esta velocidad la DNA primasa tiene pleno acceso a las cadenas abiertas, su asociación con el punto de replicación se realiza por su unión a la helicasa DnaB unida a la cadena de DNA molde de la cadena inversa (Tougu *et al.*, 1994). La replicación de la cadena inversa a partir de este cebador la lleva a cabo la DNA polimerasa III pero esta síntesis se detendrá al encontrarse con el siguiente fragmento de Okazaki. La unión de los fragmentos de DNA se lleva finalmente a cabo por la actividad reparadora de la DNA polimerasa I, que elimina la secuencia de RNA y los fragmentos son finalmente unidos por la DNA ligasa (Okazaki, 2002).

Para la síntesis de la cadena directa y de la cadena inversa se necesitan al menos dos polimerasas, por lo que se cree que el replisoma de *E. coli* contiene dos núcleos Pol III unidos a un cargador $\tau\gamma\delta\delta'\chi\psi$. Este complejo se ensambla con un orden específico y es denominado Pol III* (o Pol III estrella) (Glover y McHenry, 2000; Onrust *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2000). La subunidad β se asocia con la Pol III* de un modo dependiente de ATP para formar la Holoenzima Pol III. La asociación de todas estas proteínas requeridas para la replicación del DNA se denomina replisoma (Baker y Bell, 1998).

Al ser el cromosoma de *E. coli* circular, la molécula de DNA no tiene libertad de giro a medida que la DnaB helicasa va abriendo la

doble hélice. La separación de las dos cadenas supondría un incremento del superenrollamiento positivo según avanza la replicación, de tal manera que no podría replicarse más de un diez por ciento del cromosoma. Esto hace necesaria la acción de las DNA topoisomerasas I y II que mantienen la topología adecuada de la molécula de DNA durante la replicación. La DNA topoisomerasa I, codificada por el gen *topA*, elimina superhélices negativas y relaja la estructura superenrollada habitual del cromosoma bacteriano y, en mayor medida, tras el punto de replicación. La DNA topoisomerasa II o girasa, compuesta por dos subunidades, GyrA y GyrB, introduce superhélices negativas y elimina el superenrollamiento positivo que se genera delante del punto de replicación. La acción combinada de estas topoisomerasas permite la elongación de la replicación (Nollmann *et al.*, 2007). Se ha comprobado además que mutaciones en *topA* o *gyrAB* detienen la replicación y resultan letales, lo que indica la necesidad de estas actividades durante la replicación (Grompone *et al.*, 2003).

2.3. Terminación

El avance de la replicación bidireccional sobre un cromosoma circular determina que los dos puntos de replicación deben terminar de replicar el cromosoma bacteriano en el punto diametralmente opuesto al inicio. En esta región están las secuencias terminadoras *Ter* donde se une la proteína terminadora Tus (Bussiere y Bastia, 1999; Neylon *et al.*, 2005; Sharma y Hill, 1992). Los lugares *Ter* son diez secuencias de unas 20 pares de bases, localizadas desde el minuto 23 al 48 del mapa genético y agrupados en dos regiones con 5 sitios cada uno. Cada grupo tiene una determinada polaridad, es decir, detiene las horquillas de replicación que proceden en una orientación respecto a *oriC* y no supone ningún impedimento para las horquillas que avanzan con la orientación opuesta. Las horquillas de replicación iniciadas en *oriC* avanzan a un lado y otro hasta encontrarse en las regiones *Ter*. Los 5 sitios *Ter* que afectan a cada horquilla están situados en el lado opuesto al del avance de la elongación con lo que el complejo Tus-*Ter* bloquea la replicación de una manera polar (Bussiere y Bastia, 1999; Sharma y Hill, 1995). La inversión de regiones del dominio *Ter* tiene efectos deletéreos, lo que evidencia la importancia de su polaridad (Guijo *et al.*, 2001). Estos lugares *Ter* se han identificado también en plásmidos y en otras bacterias.

Durante muchos años, y a falta de resultados concluyentes que apuntasen en otra dirección, se propuso el modelo de barricada (*roadblock*) para la acción de Tus. Según este modelo, la unión Tus-*Ter* sería una barrera física e inespecífica contra la que chocaría el complejo de replicación deteniéndose así la síntesis de DNA. Sin embargo, se ha comprobado que este modelo no era correcto porque, entre otras cosas, al cromosoma están unidas distintas proteínas, algunas de ellas con alta

afinidad, y la horquilla de replicación concluye la replicación del cromosoma hasta el término a pesar de encontrarse con estas uniones DNA-proteína en su avance. Posteriormente se descubrió que el complejo Tus-*Ter* detiene la replicación dependiendo de su dirección a través de una interacción entre Tus y la helicasa DnaB a la que Tus inhibe su actividad helicasa impidiendo que se abra la doble cadena de DNA en las regiones *Ter* e interrumpiendo así la replicación (Mulugu *et al.*, 2001). Se ha comprobado que Tus no actúa sobre cualquier tipo de helicasa, sino que es específica de las helicasas replicativas como DnaB y de la RNA polimerasa y que, sin embargo, es incapaz de afectar la actividad de la helicasa II y de Rep. Por tanto, Tus-*Ter* actúa como una barrera específica (Bussiere y Bastia, 1999; Mulugu *et al.*, 2001).

2.4. Segregación de los cromosomas

Muchos estudios han demostrado que el cromosoma bacteriano presenta una orientación definida dentro de la célula y las diferentes regiones se mueven durante el ciclo celular para organizar esta orientación (Niki *et al.*, 2000a; Niki *et al.*, 2000b), contradiciendo la idea de que las bacterias son simples “bolsas” de proteínas y DNA con una pequeña organización interna. Una vez terminada la replicación, los dos cromosomas tienen que segregarse para que las células hijas que se originan tras la división posean una dotación genética completa.

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

La separación de los cromosomas hermanos requiere que la célula deshaga los círculos concatenados resultantes de la replicación del término, que son desenlazados por la topoisomerasa IV, y que resuelvan los cromosomas dímeros producto de una recombinación homóloga entre los cromosomas hermanos, ya que durante toda la replicación se tienen dos copias idénticas del DNA recién sintetizado en una misma estructura, con lo que es probable un gran número de recombinaciones homólogas. Si el número final de recombinaciones es impar el resultado será un cromosoma circular dimérico, mientras que si éste número fuese par puede dar como resultado dos cromosomas encadenados. La segregación cromosómica es un proceso altamente eficaz (en una población exponencial aparecen menos del 0,03% de células anucleadas), por lo que antes de la segregación han de resolverse estos dímeros al menos con la misma eficacia (Niki *et al.*, 2000b).

Esto se consigue con una recombinación específica de sitio catalizada por las proteínas codificadas por los genes *xerC* y *xerD* (Blakely *et al.*, 1991; Blakely *et al.*, 1993; Colloms *et al.*, 1990), que llevan a cabo una recombinación en la secuencia *dif* localizada en el término de la replicación (Cornet *et al.*, 1996; Perals *et al.*, 2000;

Recchia *et al.*, 1999; Steiner y Kuempel, 1998). Tanto los mutantes carentes de proteína *XerC* como los Δdif son deficientes en la segregación cromosómica (Blakely *et al.*, 1991; Kuempel *et al.*, 1991; Sciochetti *et al.*, 1999) y este fenotipo se puede suprimir inhibiendo la recombinación homóloga por una mutación en *recA* (Perals *et al.*, 2001). La construcción de una bacteria con el cromosoma lineal, que no presenta el problema de la dimerización o del encadenamiento cromosómico causados por recombinaciones entre los cromosomas hermanos durante la replicación, hace que en esta estirpe la secuencia *dif* sea prescindible (Cui *et al.*, 2007). Esta observación es consistente con los datos de las secuencias de las bacterias que tienen, de forma natural, un cromosoma lineal, que carecen de los genes homólogos a *xerC* y *xerD* (Ikeda *et al.*, 2003).

Mientras en eucariotas existe una clara separación temporal de la replicación cromosómica y la partición, en bacterias no se conoce con exactitud cómo y cuándo se produce la segregación cromosómica, existiendo principalmente dos modelos para entender este proceso (Fig. 7). Uno de ellos propone que las regiones del cromosoma bacteriano, empezando por el origen, parecen estar destinadas rápidamente a la partición tras su duplicación, mientras el resto del cromosoma espera a replicarse, mientras que otros autores creen que la segregación es un proceso discontinuo similar a la segregación cromosómica en eucariotas. El primero de ellos propuesto inicialmente por Dingman (1974) se basa en la idea de que la maquinaria de replicación está situada en las posiciones centrales de la célula de forma estacionaria. El cromosoma pasa a través de esta maquinaria y los dúplex hermanos recién replicados son empujados en direcciones opuestas hacia los polos celulares para formar dos nuevas masas cromosómicas. (Fig. 7.A). De este modo, la segregación ocurre concomitante con la replicación y avanza desde el origen hasta el término (Dingman *et al.*, 1974; Gordon, 1997; Jensen y Shapiro, 1999; Lemon y Grossman, 2000, 2001; Nielsen *et al.*, 2007; Niki *et al.*, 2000a). Por otra parte, algunos estudios de fluorescencia de hibridación *in situ* muestran evidencias de una cohesión extensiva de las regiones *oriC* hermanas mientras procede la replicación, aproximadamente hasta la mitad (Hiraga *et al.*, 2000) o hasta el último periodo de la fase de replicación (Sunako *et al.*, 2001). Según este modelo, el DNA es replicado de forma que origina una estructura conjunta, en la que la mayoría de los loci del cromosoma permanecen acoplados después de la replicación (Fig. 7.B). De esta manera, la segregación ocurre como un proceso independiente, con todo o la mayoría del cromosoma separándose de sus cromátidas hermanas en un proceso único y coordinado (Bates y Kleckner, 2005; Hiraga *et al.*, 2000; Sunako *et al.*, 2001).

En el cromosoma bacteriano aún no se ha encontrado ninguna secuencia que pueda ser utilizada como zona centromérica ni ningún lugar de anclaje del cromosoma a alguna molécula requerida para el movimiento cromosómico. Aunque la región *oriC* se une de forma

temporal a la membrana, es dudoso que esta unión pueda tener un papel esencial en la partición de los cromosomas ya que los plásmidos con *oriC* se mantienen de forma muy inestable y se pierden con facilidad en una población bacteriana en crecimiento activo. Sin embargo, trabajos recientes parecen indicar que es la propia hiperestructura de replicación la que actúa a modo de centrómero o maquinaria de segregación y partición del cromosoma (Riola *et al.*, 2007).

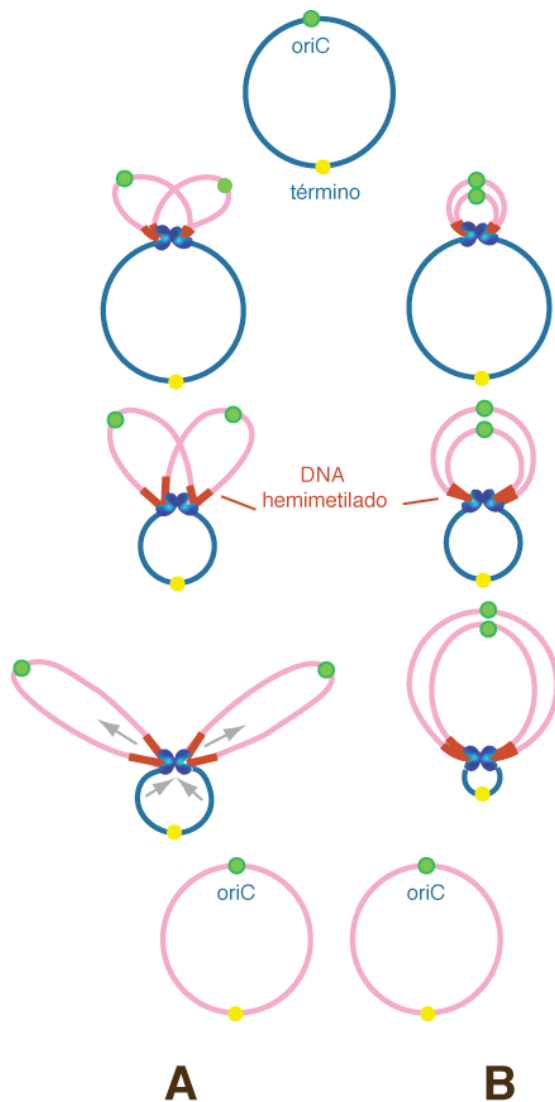


FIGURA 7. Modelos de partición o migración cromosómica en *E. coli*.

(A) Modelo de captura-extrusión.

Después que la región del origen es replicada, los dos orígenes hermanos se alejan del centro donde se localiza el replisoma y se sitúan en las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de la célula.

(B) Modelo de cohesión de orígenes.

Una vez que las regiones del origen es replicada, los dos orígenes hermanos se mantienen unidos durante algún tiempo mientras transcurre la replicación.

En la representación de ambos modelos se ha asumido que los replisomas forman fábricas replicativas

3. MOVIMIENTO DEL REPLISOMA DURANTE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA

El inicio de la replicación genera dos puntos de replicación por origen (Kornberg, 1991). La explicación de cómo los replisomas de cada punto de replicación se mueven desde el origen hasta el término ha ido variando a lo largo del tiempo y aún es una incógnita sin resolver.

Antes de 1983, el modelo dominante de la replicación se basaba en la idea de que las polimerasas de la cadena directa e inversa se alejaban una de la otra debido a la naturaleza antiparalela de la doble hélice de DNA. Resultaba difícil entender cómo estas polimerasas podrían estar coordinadas para sintetizar ambas cadenas al mismo tiempo. Alberts y colaboradores (1983) sugirieron una elegante solución para este problema, el modelo del trombón. Según este modelo, una cadena de DNA se enlaza, a modo de bobina, de forma que las dos polimerasas estén unidas formando un replisoma junto a las otras proteínas auxiliares. Posteriormente se confirmó que las polimerasas hermanas estaban físicamente unidas (Fradkin y Kornberg, 1992) y que no sólo colocalizaban sino que además estaban coordinadas, ya que se observó que bloqueando la replicación de la cadena directa se detenía el replisoma entero (Higuchi *et al.*, 2003; Pages y Fuchs, 2003).

Actualmente, la cuestión que se plantea sobre la replicación del DNA *in vivo* concierne al movimiento de los replisomas de los dos puntos de replicación hermanos: ¿están los replisomas fijos en una posición de la célula y es el DNA molde el que se mueve a través de esta maquinaria o son estas estructuras las que se mueven a lo largo del DNA molde? Digman (1974) fue el primero en proponer el modelo de las fábricas de replicación en el que los replisomas estaban unidos y fijos en la célula. En este modelo, contrario al modelo de trenes sobre vías en que los replisomas derecho e izquierdo se alejan uno del otro hasta llegar al término (Fig. 8A), los replisomas están posicionados estacionariamente en el centro de la célula, desde donde replican ambas mitades del cromosoma (Lemon y Grossman, 2000) (Fig. 8C). Este modelo se basa en la premisa de que los puntos de replicación están unidos a la membrana celular (Ryter y Jacob, 1966) y esta unión podría proporcionar un anclaje desde el que se puede generar suficiente torsión para tirar del cromosoma hacia adentro y de las regiones replicadas hacia fuera. Este modelo recibió poca atención hasta que se pudieron observar los puntos de replicación al microscopio y se detectó un número de focos que era menor que el número de puntos de replicación en diferentes especies bacterianas (Lemon y Grossman, 1998). Aunque en un principio se propuso que el DNA estaba unido a la maquinaria de replicación, con el DNA recién replicado siendo expulsado en direcciones opuestas (Lemon y Grossman, 2000), más

tarde esta idea fue modificada al comprobarse que los replisomas no estaban anclados a ninguna estructura (Berkmen y Grossman, 2006).

Este modelo de organización de la replicación da algunas ventajas a la célula. Por una parte, la disposición de los cromosomas hermanos en orientaciones opuestas debería facilitar la partición del cromosoma (Lau *et al.*, 2003; Lemon y Grossman, 2001). Por otro lado, los dNTPs y proteínas como SSB y β -clamp pueden ser concentradas en un único sitio, lo que mejoraría la velocidad y eficiencia de la replicación. Además el acceso de las proteínas de reparación puede llegar a ser más fácil si la replicación ocurre en un lugar único.

En resumen, la organización del aparato de replicación en una unidad que contenga a las dos horquillas de replicación originadas en el mismo inicio sigue siendo aún controvertida. Se han propuesto diferentes modelos que difieren, principalmente, en el tiempo que los replisomas permanecen cohesivos. Uno de ellos sugiere que las horquillas están acopladas muy poco tiempo y después se separan (Fig. 8.B) (Bates y Kleckner, 2005; Brendler *et al.*, 2000); otro propone que sólo están acopladas durante el primer tercio de la replicación (Fig. 8.B) (Adachi *et al.*, 2008; Hiraga *et al.*, 1998; Sunako *et al.*, 2001); existe otro que sugiere la presencia de una fábrica de replicación estacionaria, formada por una pareja de horquillas, durante la replicación de todo el cromosoma (Fig. 8.C) (Lemon y Grossman, 1998); y, un último modelo, que modifica el anterior proponiendo que, en cultivos con solapamiento de rondas de replicación, la fábrica de replicación contiene cuatro horquillas en el inicio, lo que implicaría cohesión de los orígenes, y después las parejas de horquillas se mueven en direcciones opuestas (Molina y Skarstad, 2004)).

Los últimos resultados apoyan la idea de que las interacciones que mantienen unidas a las horquillas son más dinámicas que estáticas (Migocki *et al.*, 2004) y que el movimiento de los replisomas en replications con múltiples horquillas de replicación puede ser fundamentalmente diferente en células creciendo en diferentes condiciones de crecimiento (Adachi *et al.*, 2008; Molina y Skarstad, 2004; Molina *et al.*, 2008).

FIGURA 8. Modelos de organización de la replicación del DNA en *E.coli* (modificado de Hiraga, 2000).

(A) Modelo de los trenes sobre vías.

Los dos replisomas son independientes y se mueven a lo largo del DNA molde.

(B) Modelo de las fábricas replicativas móviles.

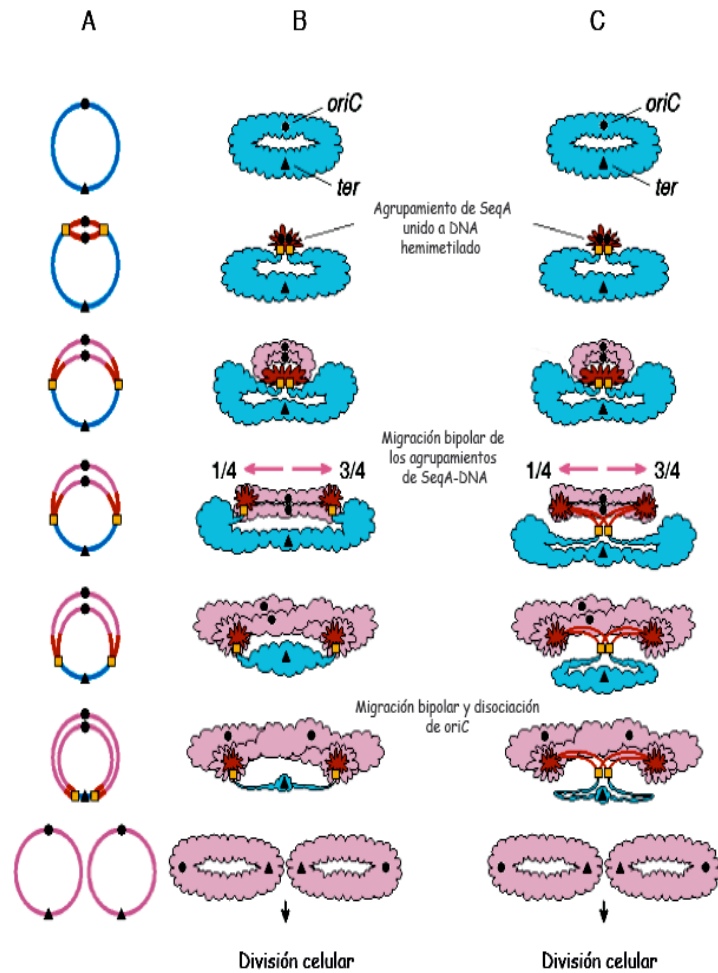
Los dos replisomas están colocalizados únicamente durante una parte del periodo de replicación y después se alejan de direcciones opuestas de la célula, hacia las posiciones $1/4$ y $3/4$ de la misma forma que migran los grupos de SeqA.

(C) Modelo de las fábricas replicativas fijas.

Los dos replisomas están colocalizados y relativamente estacionarios, formando una fábrica desde donde se replican ambas cadenas del DNA.

Las líneas y masas azules representan cadenas de DNA recién replicadas hemimetiladas. Las líneas y masas rosas representan cadenas de DNA hermanas completamente metiladas. Los círculos y los triángulos negros representan los sitios *oriC* y *ter*, respectivamente (se asume el modelo de cohesión de los orígenes para simplificar el esquema). Los cuadrados amarillos hacen referencia a la maquinaria de replicación.

En el esquema se asume la migración polar de los agrupamientos de Seq-DNA



4. RIBONUCLEÓSIDODIFOSFATO REDUCTASA

La ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) es la única enzima requerida para la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos, los precursores directos del DNA en todos los organismos, con contadas excepciones que usan una ribonucleósido trifosfato reductasa. La función de dicha enzima fue necesaria para la aparición del DNA en la evolución ya que se encarga de sintetizar los cuatro desoxirribonucleótidos mediante reducción directa de los correspondientes ribonucleótidos bifosfato (Stubbe *et al.*, 2001). Por tanto, la proteína RNR es esencial para la síntesis de DNA y, consecuentemente, para la supervivencia de todos los organismos vivos (Kolberg *et al.*, 2004).

4.1. Estructura y clases

Se han descrito tres clases principales de reductasas, clasificadas según el generador del radical para su actividad catalítica (Eklund *et al.*, 2001; Jordan y Reichard, 1998; Nordlund y Reichard, 2006; Reichard, 1993):

- **Clase I:** son enzimas dependientes de oxígeno con un radical libre de tirosilo. Están presentes en prácticamente todos los organismos eucarióticos, desde levaduras y algas hasta plantas y animales, y en la mayoría de los procariontes y virus. La clase I está dividida en dos subclases, Ia y Ib, basadas en la homología de sus secuencias y otros comportamientos de regulación alostérica. Las RNRs de la clase Ia son enzimas tetraméricas ($\alpha_2\beta_2$) (Fig. 9). El sitio activo de unión al sustrato está localizado en el homodímero mayor α_2 , llamado R1 en la clase Ia y R1E en la clase Ib. El homodímero pequeño β_2 contiene un sitio de unión para dos átomos de hierro en cada cadena polipeptídica y se llama R2 en la clase Ia y R2F en la clase Ib (Kolberg *et al.*, 2004).
- **Clase II:** no dependen del oxígeno y están confinadas a bacterias, archaeas y unos pocos eucariontes unicelulares. Tienen una estructura simple (α o a veces α_2) (Panagou *et al.*, 1972; Tsai y Hogenkamp, 1980). Generan el radical a partir de adenosilcobalamina.
- **Clase III:** son enzimas sensibles a oxígeno y están presentes en organismos anaeróbicos. Son heterotetrámeros $\alpha_2\beta_2$ similares a los de la clase I (Ollagnier *et al.*, 1996). El polipéptido α , codificado por el gen *nrdD*, contiene un radical glicilo sensible a oxígeno (Sun *et al.*, 1996). El polipéptido β , codificado por el gen *nrdG*, contiene un grupo hierro-azufre que, junto con S-adenosilmetionina, puede generar el radical glicilo (Ollagnier *et al.*, 1996).

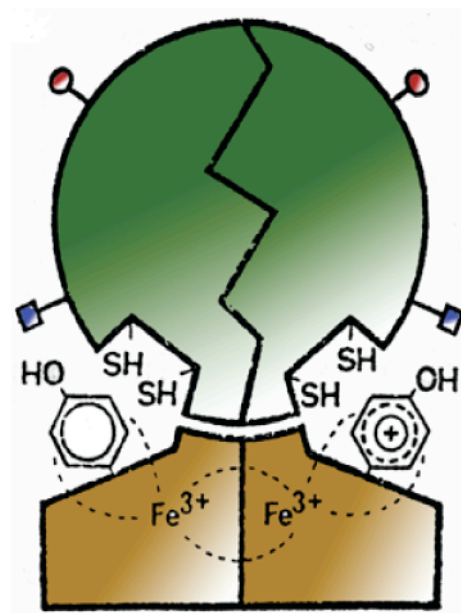
La Clase I (Fig. 9) ha sido la más estudiada ya que fue la primera que se descubrió y con la que se han llevado a cabo la mayoría de los trabajos (Ekberg *et al.*, 2003; Eklund *et al.*, 2001; Fontecave *et al.*, 1992; Nordlund y Eklund, 1993). *E. coli* contiene los genes que codifican tres clases de RNR, las clases Ia, Ib y III. La clase Ia está formada por dos proteínas homodiméricas, R1 (α_2), codificada por el alelo *nrdA*, y R2 (β_2), codificada por el alelo *nrdB* (Fontecave *et al.*, 1992). El operón de la clase Ib consta de cuatro genes, *nrdE* y *nrdF* codifican las subunidades α y β , *nrdH* codifica una proteína de alrededor de 9 KDa que actúa como donador de electrones específico, y *nrdI* codifica una proteína de 15 KDa cuya función permanece desconocida. La RNR Ia y la RNR Ib tienen una identidad de secuencia limitada pero comparten muchas propiedades catalíticas (Jordan *et al.*, 1994). Ambas requieren oxígeno para la generación del radical tirosilo estabilizado por un centro de hierro que transfiere el radical a una cisteína en el centro activo de NrdA o NrdE.

FIGURA 9. Esquema de la enzima RNR (propuesto por Thelander y Reichard, 1979).

Se muestran los sitios de regulación de la especificidad de sustrato y de actividad. El centro catalítico de la enzima se sitúa entre R1 y R2 con los grupos sulfidrilos y los radicales tirosilos y su conexión a los átomos de hierro.

Especificidad de sustrato
(ATP, dATP, dTTP, dGTP)

Actividad (ATP, dATP)



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

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

4.2. Actividad y control alostérico

La actividad de la RNR es un proceso químicamente complejo y requiere la participación de un radical orgánico libre que es almacenado por la enzima hasta su utilización (Reichard y Ehrenberg, 1983). La RNR está formada por dos componentes, uno que genera el radical y otro con la actividad reductasa. El generador del radical no es el mismo para todas las RNR, mientras que el componente reductasa sí

es muy similar en todas ellas.

En el polipéptido α es donde se lleva a cabo la actividad enzimática y donde se suceden las interacciones alostéricas. Dependiendo de la configuración alostérica, uno de los cuatro ribonucleótidos se une al centro catalítico (Nordlund y Reichard, 2006; Reichard, 1993, 1997). Además, la reacción enzimática requiere un donador de electrones externo. Estos donadores son pequeñas proteínas (tioredoxinas y glutaredoxinas) con actividad redox (Holmgren y Bjornstedt, 1995; Nordlund y Reichard, 2006).

La unión de uno de los sustratos al sitio activo de la enzima reducida marca el comienzo de la transferencia del radical desde el residuo de tirosina, unido a los dos átomos de hierro oxidados en R2, hasta el centro activo en R1. El radical se transfiere a R1, a una cisteína que toma el hidrógeno del carbono 3' de la ribosa del sustrato, pasando el radical a dicho sustrato. Del carbono 2' se libera el grupo OH quedándose así con el radical y protonado. Entonces aparecen otras dos cisteínas del sitio activo cuando los grupos tioles reducen el carbono 2' de la ribosa gracias al potencial redox de los dos residuos que quedan unidos por puentes disulfuro. Finalmente el átomo de hidrógeno de la primera cisteína vuelve al carbono 3' y el sustrato pasa a ser producto reducido (Eklund *et al.*, 2001; Nordlund y Reichard, 2006; Yee *et al.*, 2003). El reductor final del sistema es el NADPH que pasa sus electrones a las cisteínas que habían quedado oxidadas y unidas por puentes disulfuro. La enzima queda de este modo preparada para la entrada de un nuevo sustrato (Eklund *et al.*, 2001; Nordlund y Reichard, 2006).

4.3. Regulación de la actividad de la RNR

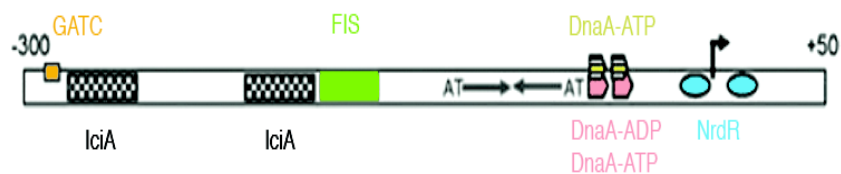
La fina regulación de la actividad de la RNR y el tamaño limitado del pool de nucleótidos reflejan dos hechos importantes: i) un *pool* mal equilibrado resulta en alteraciones de la replicación y mutaciones (Gon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005a; Stubbe, 2000), y ii) la velocidad de la horquilla de replicación depende, entre otras cosas, de la cantidad de RNR activa (Kim *et al.*, 2005a; Manwaring y Fuchs, 1979). Así, el control de la actividad de la RNR juega un importante papel no sólo en la regulación de la cinética de la replicación sino también en el mantenimiento de la integridad del genoma. Para satisfacer los requerimientos de la actividad de la DNA polimerasa se tienen que producir los cuatro desoxirribonucleótidos. Así, la enzima tiene en la subunidad R1 dos sitios de control alostérico, uno de especificidad de sustrato y otro de actividad (Fig. 9); la unión de un desoxirribonucleótido trifosfato concreto hace que el sitio catalítico se adapte para la reducción de un sustrato específico (Brown y Reichard, 1969). La unión de ATP al sitio alostérico de actividad aumenta la actividad enzimática mientras que la unión de dATP la inhibe

(Reichard, 1993).

4.4. Regulación de la expresión génica de la RNR

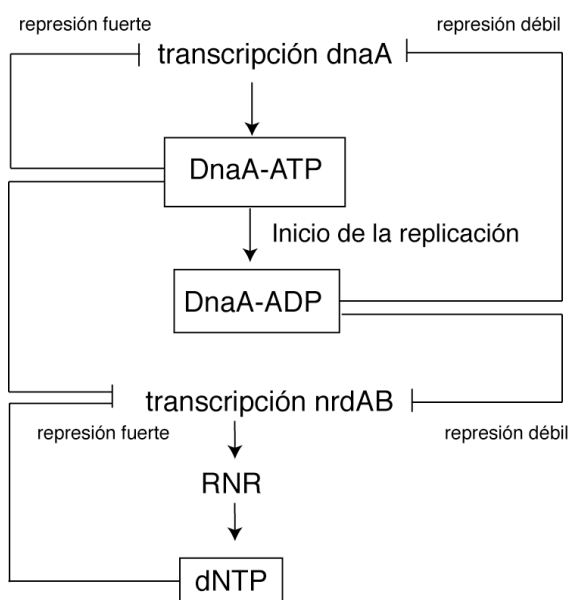
La expresión de *nrdAB* y el ciclo de replicación están coordinados a través de un mecanismo de retroalimentación (Hanke y Fuchs, 1983). La transcripción del operón *nrdAB* (Fig. 10) coincide con el inicio de la replicación (Jacobson y Fuchs, 1998; Sun y Fuchs, 1992, 1994). La inhibición de la replicación, induce el incremento de la síntesis de RNR (Jacobson y Fuchs, 1998). Así, los factores que regulan la iniciación bajo condiciones normales y en condiciones de estrés parecen estar comunicados con los factores que regulan la expresión de *nrdAB* (Herrick y Sclavi, 2007).

FIGURA 10. Promotor del gen *nrdAB* (modificado de Herrick y Sclavi, 2006).



La proteína iniciadora DnaA interactúa con el promotor de *nrdAB*. Varios autores proponen que esta interacción posee un efecto positivo sobre la expresión de *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994; Jacobson y Fuchs, 1998). Sin embargo, recientemente Gon y colaboradores han propuesto un papel regulador negativo de DnaA-ATP sobre la expresión de *nrdAB* (Gon *et al.*, 2006). Según Herrick y Sclavi, estas diferentes observaciones podrían ser reconciliadas si el modo de regulación de *nrdAB* por DnaA fuera dependiente de los niveles celulares de DnaA-ATP. En este papel dual, bajos niveles de DnaA-ATP activarían la expresión de *nrdAB* mientras niveles altos la reprimirían (Fig. 11) (Herrick y Sclavi, 2007).

Por otra parte, existen otros factores que influyen en la expresión de *nrdAB* (Fig. 10). Se ha descrito que tanto FIS como IciA regulan positivamente la expresión de *nrdAB* (Augustin *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1998), y se han encontrado posibles sitios de unión a IHF en las secuencias aguas arriba del promotor.



Recientemente se ha identificado un nuevo regulador de la transcripción de los genes de la RNR, la proteína NrdR (Borovok *et al.*, 2004; Rodionov y Gelfand, 2005). Torrents y colaboradores han demostrado que, aunque NrdR se une a los promotores de los genes de las tres RNR presentes en *E. coli*, la represión que ejerce sobre *nrdAB* es mucho menor que la que ejerce sobre *nrdHIEF* (Torrents *et al.*, 2000), lo que parece indicar que este factor está más implicado en la regulación de la expresión de la RNR de clase IIB que en el control de la transcripción de *nrdAB* a lo largo del ciclo.

5. HIPERESTRUCTURA DE REPLICACIÓN

Actualmente se dedica un gran esfuerzo al estudio de las conexiones entre los constituyentes de la célula, como revela la aparición de términos como transcriptoma, proteoma, metaboloma e, incluso, interactoma. A lo largo de las últimas décadas se ha revelado la existencia de un nivel estructural de gran importancia en bacterias. Este avance en nuestro conocimiento ha generado la propuesta de un nivel de organización intermedio entre los complejos de proteínas y la célula. Éste es el nivel de las hiperestructuras (Norris *et al.*, 1999). Una hiperestructura es un nivel superior a lo que se conoce como un “ensamblaje supramolecular”, una “maquinaria molecular” o incluso un “módulo” (Hartwell *et al.*, 1999). Según esta hipótesis, las hiperestructuras son ensamblajes temporales de moléculas y macromoléculas que interactúan unas con otras y que determinan el

FIGURA 11. Modelo para explicar la relación entre la síntesis de dNTP y la replicación del DNA mediada por el factor de iniciación DnaA.

La proteína DnaA recién sintetizada está en la forma unida a ATP, que supone que está activa para iniciar la replicación. Además la DnaA-ATP es un represor transcripcional de los genes *dnaA* y *nrdAB*. Al final del inicio de la replicación, la DnaA-ATP se hidroliza a DnaA-ADP de una manera dependiente de la subunidad β . La fracción de la proteína DnaA en la célula que está en la forma unida a ADP aumenta. La proteína DnaA-ADP reprime débilmente la transcripción del operón *nrdAB*, que dirige a un aumento de la síntesis de dNTP, permitiendo que la elongación pueda empezar. La proteína DnaA-ADP además reprime débilmente el gen *dnaA* provocando la síntesis de nueva proteína DnaA. Si la replicación del DNA es lenta o no ocurre, las células experimentan un retraso entre las sucesivas rondas de replicación. Durante esta demora, la proteína DnaA unida a ATP se acumula en la célula, mientras el RIDA no está funcionando debido a la ausencia de las subunidad β -clamps cargadas en el DNA. La unión de la proteína DnaA-ATP unida a las cajas DnaA del promotor de *nrdAB* provocan una represión fuerte de la transcripción de *nrdAB* y una disminución de la síntesis de RNR.

fenotipo de la célula. En este sentido, la hiperestructura determinan los puntos de control que ocurren durante el ciclo celular para que los distintos eventos tengan lugar en el sitio, tiempo y orden correctos (Norris *et al.*, 2007).

El inicio de la replicación es un proceso que requiere la interacción de muchas proteínas, membrana y *oriC*. El resultado es la formación de una hiperestructura de iniciación que contiene diferentes tipos de proteínas, moléculas y la región cromosómica de *oriC*. Además, la participación de la membrana en la iniciación de la replicación es una cuestión antigua (Firshein, 1989) y se ha especulado que esta hiperestructura de iniciación puede contener cardiolipinas ya que la transformación de DnaA-ADP en DnaA-ATP *in vitro* requiere fosfolípidos ácidos en una bicapa fluida (Boeneman y Croke, 2005; Castuma *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005). La formación de una hiperestructura de iniciación conlleva la unión de muchas copias de la proteína DnaA a sus secuencias reconocidas en *oriC*, la unión de las proteínas DnaB helicasa y DnaC y el reclutamiento del resto de la maquinaria enzimática. Este proceso es dependiente del superenrollamiento, de la unión de las proteínas Fis y IHF a los sitios de reconocimiento y de la unión menos específica de las proteínas HU y H-NS (Bahloul *et al.*, 2001; Dame *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2004).

La replicación requiere el suministro de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) en una cantidad estimada de unos 1.600 nucleótidos por segundo por punto de replicación. A pesar de esta elevada tasa, en la célula sólo existen nucleótidos para permitir medio minuto de síntesis de DNA (Werner, 1971). De forma adicional, la DNA polimerasa III tiene una K_M elevada, con lo que se necesita tener unos niveles de dNTPs muy altos en los sitios de replicación para poder funcionar a su máxima velocidad (Mathews, 1976; Mathews y Sinha, 1982). En otras palabras, los dNTPs no pueden llegar al lugar donde van a ser utilizados a la velocidad a la que se necesitan simplemente por un proceso de difusión (Ji y Mathews, 1991). Por tanto, no es sorprendente que se haya sugerido, tanto en eucariontes como en procariontes, la presencia de un complejo de síntesis de dNTP asociado de alguna manera al replisoma, que permitiría la canalización y compartimentación de los precursores justo en el lugar donde son requeridos (Ji y Mathews, 1991; Kim *et al.*, 2005a; Mathews, 1976; Mathews y Sinha, 1982; Shen *et al.*, 2006). Los estudios realizados por nuestro grupo, utilizando un mutante de *E. coli* que produce una RNR termolábil, demostraron que *in vivo* esta enzima debe estar protegida de la inactivación térmica por su inclusión en alguna estructura de orden superior y que su alteración repercute en una merma de la procesividad del complejo de replicación, aportando las primeras pruebas de la existencia de la hiperestructura de replicación en *E. coli* (Guarino *et al.*, 2007a; Guzmán *et al.*, 2002) y que en esta hiperestructura deben estar asociadas las funciones de

segregación y partición cromosómica (Riola *et al.*, 2007).

La estructura y funcionamiento de la maquinaria de replicación se explica actualmente por la formación de una hiperestructura dinámica, constituida por una o más hiperestructuras de replicación (Norris *et al.*, 2007), y serían estas mismas interacciones dinámicas y lábiles las que mantendrían unidas temporalmente a las horquillas de replicación dependiendo de la tasa de crecimiento y del número de estructuras presentes en una célula. La imagen de una hiperestructura dinámica que depende de su actividad está de acuerdo con el ensamblaje y desensamblaje que sucede en la hiperestructura en algunas situaciones, por ejemplo, cuando la horquilla de replicación se encuentra con distintas barreras que provocan la parada de la replicación antes de que la horquilla llegue al término (Guarino *et al.*, 2007b), o cuando la horquilla de replicación encuentra un daño en el DNA o proteínas unidas al DNA que bloquean la replicación y fuerzan una reanudación mediante el reensamblaje de la maquinaria de replicación con la ayuda de enzimas de recombinación (Cadman y McGlynn, 2004; Courcelle y Hanawalt, 2003) o cuando el aporte de nucleótidos es limitado (Molina y Skarstad, 2004).

La formación de una hiperestructura basada en la proteína SeqA es uno de los principales mecanismos que previenen los múltiples reinicios en *E.coli*. Un *oriC* recién replicado permanece hemimetilado de forma temporal. SeqA se une preferentemente a sitios GATC hemimetilados para secuestrar éstas y otras regiones y prevenir reinicios múltiples. Existen 19.130 secuencias GATC en el cromosoma de *E. coli* que flanquean genes implicados en la replicación, en la reparación y en la estructura del DNA, así como en *oriC*. Estos genes incluyen *dnaA*, *dnaC*, *dnaE*, *gyrA*, *topA*, *hepA*, *lhr*, *parE*, *mukB*, *recB*, *recD* y *uvrA*, así como los genes implicados en la síntesis de precursores del DNA, *nrdAB*, *purA*, *purF*, *purL*, *pyrD* y *pyrI* (Norris *et al.*, 2000). Este hecho ha generado la idea de la existencia de una hiperestructura de secuestro/replicación que englobaría no sólo a las proteínas y moléculas necesarias para la replicación del DNA, sino también a las enzimas encargadas de sintetizar y suministrar los precursores del DNA (Norris *et al.*, 2000; Norris *et al.*, 2007). En este modelo, la dinámica de la hiperestructura de secuestro definiría el periodo durante el que *oriC* está protegido de nuevos inicios. La diferenciación entre hiperestructura de replicación e hiperestructura de secuestro probablemente corresponde al momento en el que *oriC* vuelve a estar disponible para la iniciación. Una posible explicación para esto es la producción continua de nuevas secuencias GATC metiladas y hemimetiladas controladas por SeqA y por Dam, que debilitarían la hiperestructura de secuestro. En el caso de cultivos sincronizados para la replicación cromosómica, hay evidencias de que los foci de SeqA cambian en su composición cuando la replicación tiene lugar (Yamazoe *et al.*, 2005). Otra posibilidad complementaria estaría relacionada con la existencia de una maquinaria de segregación que podría ayudar a

separar los orígenes y la hiperestructura de secuestro. Se han observado interacciones funcionales entre proteínas que forman parte de la hiperestructura de replicación (DnaX, SeqA, RNR) con proteínas de la segregación y decatenación (topoisomerasa IV y FtsK) (Kang *et al.*, 2003; Riola *et al.*, 2007; Weiss, 2004) lo que sugiere la formación de una hiperestructura superior que comprendería a todas las funciones de replicación, síntesis de nucleótidos, segregación y partición.

La presencia de la enzima RNR en la hiperestructura de replicación implica que su localización subcelular estaría concentrada en puntos discretos cercanos a los puntos de replicación y en número igual o similar al de las otras proteínas de la maquinaria de replicación. Algunos autores han sugerido recientemente que esta proteína no se encuentra concentrada en puntos concretos que puedan verse como focos por inmunofluorescencia, sino que está dispersa en la célula y no debería aceptarse, por tanto, su asociación con la maquinaria de replicación (den Blaauwen *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2007).

El objetivo principal de este trabajo ha sido la localización subcelular de la RNR para comprobar si aparecen focos discretos que pudieran explicar una concentración puntual y, si estos focos pudiesen verse, estudiar su número y posición relativos a las proteínas de la replicación.



MATERIALES Y
MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS

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

ESTIRPE BACTERIANA	GENOTIPO	ORIGEN
MG1652 <i>dnaC2</i>	<i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Dr. Morigen
CM735	<i>metE46 trp3 his4 thi1 galK2 lacY1 mtl1 ara9 tsx3 ton1 rps8 supE44 l-</i>	Dra. Kirsten Skarstad
CMT927	CM735/pKD46	Transformación de CM735 con pKD46
CMT931	CMT927 <i>nrdB::3xFLAG</i>	Transformación de CM931 con la secuencia 3xFLAG
CMT932	CMT927 <i>dnaB::HA</i>	Transformación de CM931 con la secuencia HA
CMT933	CMT927 <i>dnaX::HA</i>	Transformación de CM931 con la secuencia HA
CMT934	CMT931 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a CMT931
CMT935	CMT932 <i>nrdB::3xFLAG/pKD46</i>	Transducción de 3XFLAG de CMT931 a CMT932
CMT936	CMT933 <i>nrdB::3xFLAG/pKD46</i>	Transducción de 3XFLAG de CMT931 a CMT933

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

CMT937	CMT932 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a CMT932
CMT938	CMT933 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a CMT933
CMT939	CMT935 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a CMT935
CMT940	CMT936 <i>dnaC2 thr::Tn10</i>	Transducción de <i>dnaC2 thr::Tn10</i> de MG1655 <i>dnaC2</i> a CMT936
EBO193	CM735 Δ <i>seqA</i>	Dra. Kirsten Skarstad
JK607	JS1018 <i>nrdA+ yfaL::Tn5</i>	Este laboratorio
JS1018	<i>nrdA101 thyA arg his thi malA Lr rpsL mtl xyl su</i>	Este laboratorio
JSFL1018	JS1018 <i>nrdB::3xFLAG</i>	Transducción de 3XFLAG de CMT931 a JS1018

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

2. FAGOS

El fago P1 *vir* fue obtenido de este laboratorio. Como es incapaz de lisogenizar a la bacteria huésped se emplea frecuentemente para realizar transducción generalizada. Permite la construcción de estirpes y cartografiar genes que se encuentren a menos de 2 minutos en el cromosoma.

3. PLÁSMIDOS

3.1. *pKD46*

El plásmido pKD46 (Fig. 12) es un plásmido de bajo número de copias con un tamaño de 6,329 Kpb (Datsenko y Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001). Posee un replicón sensible a la temperatura, que permite su cura de las cepas transformantes a 42 °C. Tiene clonado el sistema λ Red bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (ParaB), que permite prevenir recombinación en condiciones de no inducción. El sistema Red incluye tres genes: γ , β y *exo* cuyos productos son Gam, Bet y Exo, respectivamente. Gam inhibe la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD del hospedador, de forma que Bet y Exo puedan acceder a los extremos del DNA para promover la recombinación. Este plásmido es resistencia al antibiótico Ampicilina (100 μ g/ml).

La adición de arabinosa permite la inducción de los genes clonados a continuación del promotor *ParaB*. La concentración final de arabinosa utilizada en este trabajo para inducirlo fue de 1 mM.

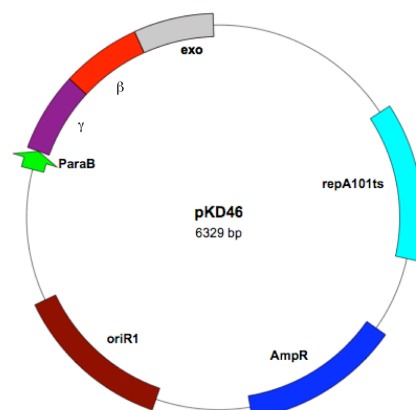
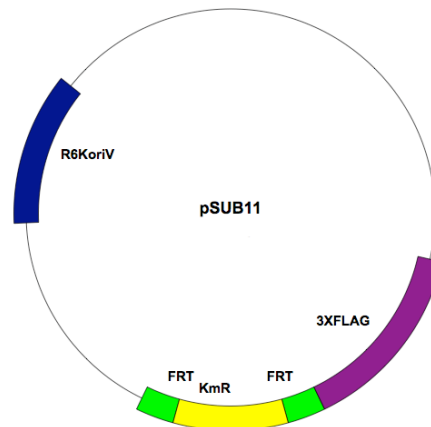


FIGURA 12. Esquema representativo del plásmido pKD46.

3.2. *pSUB11*

El pSUB11 (Fig. 13) es un plásmido derivado de pKD4 (Datsenko y Wanner, 2000; Uzzau *et al.*, 2001) que contiene la secuencia completa del péptido sintético FLAG (DYKDDDDK) repetidas 3 veces, denominada 3xFLAG. A continuación de dicha secuencia presenta una resistencia al antibiótico kanamicina flanqueada por sitios heteroespecíficos de recombinación FRT (poseen 48 pb de longitud, constituidos por dos repeticiones invertidas de 13 pb separadas por un espaciador de 8 pb y una tercera secuencia de 13 pb, y es el sitio de reconocimiento de la enzima FLP recombinasa) (Baer y Bode, 2001). Ésta puede ser eliminada utilizando el plásmido pCP20 (más detalle en el apartado 3.4).

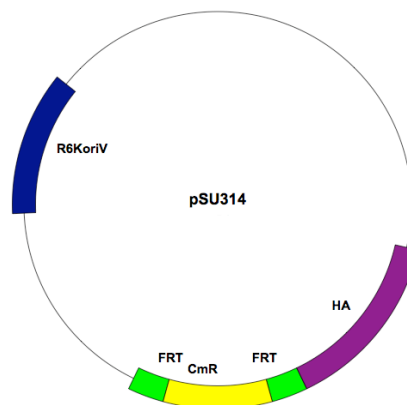
FIGURA 13. Esquema representativo del plásmido pSUB11 con la secuencia completa del epítipo 3xFLAG.



3.3. pSU314

Este plásmido es un derivado de pKD314 (Fig. 14) (Datsenko y Wanner, 2000; Uzzau *et al.*, 2001) que tiene clonado la secuencia de un péptido de la proteína hemaglutinina influenza humana (YPYDVPDYA). Además de esta secuencia, presenta una resistencia a cloranfenicol flanqueada por sitios FRT. Dicha resistencia también puede ser eliminada utilizando el plásmido pCP20 (más detalle en el apartado 3.4).

FIGURA 14. Esquema representativo del plásmido pSU314 con la secuencia completa del epítipo HA (proteína hemaglutinina influenza humana).



3.4. *pCP20*

El plásmido *pCP20* (Fig. 15) es un plásmido resistente a ampicilina y a cloranfenicol, construido por Cherepanov (Cherepanov y Wackernagel, 1995). Este plásmido muestra una replicación termosensible y contiene un gen que codifica la enzima FLP recombinasa bajo el control de un promotor inducible por temperatura (Figura 15). Esta enzima permite la eliminación de genes de resistencias cuando están flanqueados por sitios FRT.

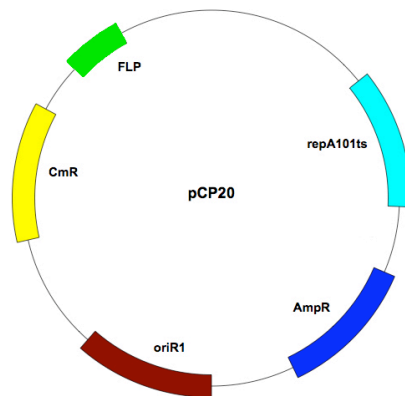


FIGURA 15. Esquema representativo del plásmido *pCP20*.

3.5. *pPS2*

El plásmido *pPS2* (Fig. 16) es el plásmido *pBR322* que contiene clonado el operón entero de los genes *nrdA* y *nrdB* que codifican la proteína ribonucleósido difosfato reductasa aeróbica de *E. coli* (Platz y Sjoberg, 1980). Presenta resistencia a Ampicilina y a Tetraciclina y tiene un tamaño de 16,081 Kpb.

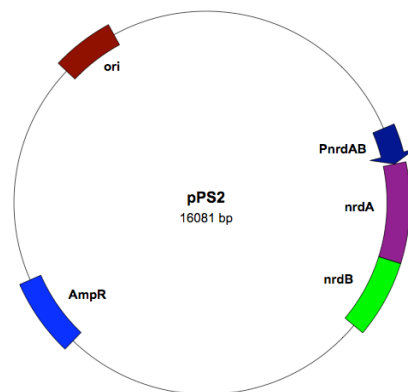


FIGURA 16. Esquema representativo del plásmido *pPS2*.

4. PRODUCTOS QUÍMICOS

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

4.1. Antibióticos

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

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

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

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

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

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

4.2. Productos radiactivos

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

4.3. Soluciones y tampones

4.3.1. Aislamiento y purificación de DNA cromosómico y plasmídico

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

Solución EDTA-Tritón-Lisozima. EDTA 100 mM (pH 8,0), Tritón

0,1% (v/v) y Lisozima 2 mg/ml (añadida inmediatamente antes de usar) en agua destilada.

Solución PEG-NaCl. PEG 8.000 20% (p/v) y NaCl 1 M en tampón TE.

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

Tampón HTE. Tris HCl 50 mM (pH 8,0) y EDTA 20 mM (pH 8,0) en agua destilada.

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

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

4.3.2. Electroforesis de DNA

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

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

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

4.3.3. Electroforesis de proteínas

Gel de empaquetamiento. 1,4 ml de agua destilada, 0,33 ml de la mezcla de archilamida 30%, 0,25 ml de Tris 1 M (pH 6,8), 0,02 ml de SDS 10%, 0,02 ml de APS 10%, 2 µl de TEMED (BioRad).

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

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

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

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

4.3.4. Western blot

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

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

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

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

Tampón PBS-Tween. NaCl 140 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM y Tween 0,2%.

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

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

Uridina. Se preparó a 150 mM en agua estéril y se utilizó a 150 μM en los cultivos de estirpes que no eran Thy⁻ para poder medir la síntesis de DNA *in vivo*.

4.3.6. Manipulación *in vivo* de bacterias y fagos

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

La solución salina M9 se preparó disolviendo 60 g de HNa₂PO₄, 30 g de H₂KPO₄, 5 g de NaCl y 10 g de NH₄Cl, en este orden, en un volumen final de agua destilada de 1.000 ml. Se ajustó su pH a 7,2 y se esterilizó.

Tampón MC. Se preparó mezclando MgSO₄ 100 mM y CaCl₂ 5 mM en agua estéril.

4.3.7. Citometría de flujo

Solución de fijación de bacterias. Se empleó etanol al 70%. 1500 μl de muestra fueron lavadas y resuspendidas en buffer TE y después suspendidas en etanol al 70%.

Soluciones de lavados. Buffer fosfato 0,1 M a pH 9,0 y buffer fosfato salino 0,02 M a pH 7,5

Solución de tinción. Se preparó una solución de Isotiocianato Fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich) en el buffer fosfato 0,1 M a pH 9,0. La solución se pasó a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro poro y las células se tiñeron durante 16 horas a 4°C. El DNA fue teñido durante 1 hora en 3 μg/ml de Hoechst 33258 en buffer fosfato salino 0,02 M.

4.3.8. Microscopía óptica de contraste de fase y fluorescencia

PBST. Se preparó añadiendo 7 ml de una solución 5M NaCl, 125 µl 4 M KCl, 20 ml 0,1 M Na₂HPO₄, 150 µl 1 M KH₂PO₄ y 2.5 ml 5 % Tween y hasta 250 ml de agua estéril para obtener unas concentraciones finales 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ y 0.05 % Tween.

Solución de lisozima. Se preparó añadiendo 160 µl 25 mg/ ml de lisozima, 50 µl 1 M Tris-HCl, 90 µl 1.1 M (20%) glucose y 40 µl 0.5 M EDTA y hasta 2 ml de agua estéril, para conseguir unas concentraciones finales de 2 mg/ ml lysozyme, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM glucose y 10 mM EDTA.

Medio de montaje con Hoechst. La solución que sirvió de soporte para las preparaciones microscópicas en el portaobjetos constaba de 5 µg/ ml Hoechst 33258 en 0,02 M PBS al 40 % de glycerol. Previamente el portaobjetos había sido tratado con polyisina a 10 mg/ml. El Hoechst 33258 es un fluoróforo que se une específicamente al DNA.

Medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en agua destilada estéril. Se usó añadiendo 10 µl de la solución a cada ml de glicerol al 40 %.

4.3.9. Inmunoprecipitación de cromatina- chip de DNA (ChIP-chip)

TBS. Se preparó 1000 ml, disolviendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl y 3 g Tris-HI en agua estéril. Se ajustó el pH a 7,4.

Buffer de lisis. Se preparó 500 ml a 10 mM Tris pH 8,0, 20% de sacarosa, 50 mM de NaCl y 10 mM de EDTA. Antes de usar se añadió lisozima a una concentración de 20 mg/ml.

Buffer de inmunoprecipitación (IP). Se preparó 2 soluciones de 1000 ml a 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0,1 % Na deoxicolato, 0,1% SDS para cada solución de 1000ml.

Buffer IP + sal. Se preparó 500 ml. Este buffer es el mismo que el buffer IP pero con 500 mM de NaCl.

Buffer de lavado. Se preparó 500 ml a 10 mM Tris pH 8,0, 250 mM LiCl, 1mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40 y 0,5% Na deoxicolato.

Buffer de elución. Se preparó 500 ml a 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA y 10% SDS.

PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride). Se preparó a 100 mg/ml en metanol y se conservó a -20 °C. Suministrada por Sigma Chemical Co.

5. MEDIOS DE CRECIMIENTO

5.1. Medios de crecimiento para bacterias

Medio Mínimo M9. Se preparó añadiendo 100 ml de la solución salina M9, 10 ml de una solución de CaCl_2 0,01 M, 10 ml de MgSO_4 0,1M, 10 ml de una solución de los aminoácidos requeridos por la estirpe a 2 mg/ml (histidina y arginina para JS1018 y derivadas), 10 ml de una solución de tiamina a 0,2 mg/ml y 2,5 ml de timidina a 2 mg/ml (a menos que se indique una concentración final distinta) a 847,5 ml de agua destilada que contenían 4 g de glucosa. Todas las soluciones se esterilizan previamente por separado. Este medio se enriqueció con una solución de caseína hidrolizada (casaminoácidos) hasta una concentración del 0,1% (p/v) final. Los resultados presentados en esta memoria, a menos que se indique otra cosa, se obtuvieron con cultivos crecidos en medio mínimo con glucosa como fuente de energía suplementado con casaaminoácidos al una concentración del 0,2%.

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

Medio rico Luria-Bertani (LB). Se disolvieron 10 g de bacto triptona (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid) y 10 g de NaCl en 1.000 ml de agua destilada, el pH de la solución se ajustó entre 7,2 y 7,4 y se autoclavó. En algunas ocasiones este medio era suplementado con timidina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y con glucosa 0,1% (en este caso se le llamó LBTG). Para realizar transformaciones con el plásmido pKD46, se añadió a este medio arabinosa a una concentración de 1 mM.

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

5.2. Medios de crecimiento para el fago P1

Agar de cobertera. 6 g de agar se añadieron a 1.000 ml de LB y una vez estéril se adicionó CaCl_2 y glucosa hasta una concentración final de 2,5 mM y 0,1%, respectivamente.

LA10. Se preparó añadiendo 10 g de agar a 1.000 ml de LB. Después de su esterilización se añadió CaCl_2 a una concentración final de 5 mM y glucosa 0,1% final. Se utilizó para aumentar el título de las suspensiones del fago y para titular éstas.

6. ENZIMAS

DNA Polimerasa Taq. Suministrada a una concentración de 5 U/ml, junto a su tampón de dilución que contenía MgCl₂ concentrado 10 veces. Suministrada por Bioron.

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

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

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

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

7. ANTICUERPOS

Anti-3xFLAG-Cy3. Suministrado por Sigma-Aldrich. Es un anticuerpo monoclonal procedente de ratón. Se usó a una dilución 1/1000 para inmunofluorescencia y 1/3000 para Western Blot. Se conservó a -20°C.

Anti-3xFLAG. Suministrado por Sigma-Aldrich. Es un anticuerpo monoclonal procedente de ratón. Se usaron 2 µl a una concentración de 1 µg/ml para CHIP-on-chip. Se conservó a -20°C.

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

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

Anti-HA. Suministrado por Sigma Aldrich. Es un anticuerpo monoclonal producido en ratón (clone HA-7). Se usó a una dilución 1/100 para inmunofluorescencia y 1/1000 para Western Blot. Se conservó a -20°C.

Anti-SeqA. Suministrado por la Dra. Kirsten Skarstad. Es un anticuerpo monoclonal procedente de conejo. Se usó como anticuerpo una solución tratada con extracto celular a una dilución 1/200.

Anti-conejo FITC. Suministrado por Sigma Aldrich. Es una Ig policlonal procedente de oveja. Se utilizó para inmunofluorescencia a una

dilución 1/200.

Anti-ratón Alexa 488 (color verde). Es un anticuerpo policlonal producido en cabra. Se utilizó para inmunofluorescencia a una dilución 1/200. Suministrado por Molecular Probes.

Anti-conejo Alexa 594 (color rojo). Es un anticuerpo policlonal producido en cabra. Se utilizó para inmunofluorescencia a una dilución 1/200. Suministrado por Molecular Probes.

8. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos usados como cebadores para las reacciones de PCR previas al etiquetado de los genes, así como los cebadores utilizados para comprobar su correcta inserción aparecen en la tabla 2.

TABLA 2. Oligonucleótidos empleados, objetivo del cebador y producto de PCR.

En negrita y cursiva aparecen las secuencias homóloga a los plásmidos pSUB11 y pSU314.

NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	OBJETIVO
nrdBFlagF	GAAGTGGACACCGACGATTTGAGTAACTT CCAGCTCGACTACA AAGACCATGACGG	Etiquetar gen con FLAG
nrdBFlagR	TCAAATTTTTTCCAATCGCCACTAATTGTTCC CATGCACAT CATATGAATATCCTCCTTAG	
finrdBF	GACGGTTCGATGATTGGTCT	Comprobar inserción
finrdBR	TCTCGATTTCAATATCGCCTTT	
dnaBHAF	CGCTTCGACA ACTATGCGGGCCGCAGTA CGACGACGA ATTCTATCCGTATGATGTTCC	Etiquetar gen con HA
dnaBHAR	GTGTTTCCTTGATAAGTGTGGTTTCAATT ACCTAA TATATGAATATCCTCCTTAG	
findnaBF	GACGGTACGCCTGACCTTTA	Comprobar inserción
findnaBR	TAAAACGCCTCAGCCTGTTC	
dnaXHAF	GCGGAGCTGGATGAAGAAAGTATCCGCC CCATTT TTCTATCCGTATGATGTTCC	Etiquetar gen con HA
dnaXHAR	GGTTTCTCTCTCAATCACGTTAAGGATGA CGAACG TATATGAATATCCTCCTTAG	
findnaXF	CACAGCAAAA ACTGGCTGAA	Comprobar inserción
findnaXR	CACCAGTCTTCCAGCATCT	

Todos los cebadores fueron suministrados por StabVida en estado liofilizado. Una vez diluidos a una concentración 100 μ M se conservaron a -20°C

1. CRECIMIENTO DE ESTIRPES

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

El crecimiento en masa de un cultivo líquido para calcular el tiempo de generación se determinó por aumento de la absorbencia en un espectrofotómetro Spectronic 20 Génesis. Cuando las células se cultivaron en medio mínimo se determinó la absorbencia a 450 nm mientras que cuando se empleó medio mínimo con casaminoácidos, la medición se hizo a 550 nm y a 600 nm si era medio rico, de este modo se corrige la absorción del propio medio a longitudes de onda inferiores. Para realizar las mediciones se utilizaron tubos de 1 cm de paso de luz. El volumen utilizado para realizar la medida se devolvió al cultivo de donde se tomó. La representación en una escala semilogarítmica de las densidades ópticas obtenidas en las distintas mediciones frente al tiempo de cada medición permite obtener el tiempo de generación, τ , de ese cultivo. Este valor viene dado por el tiempo que tarda en duplicarse la densidad óptica, que es equivalente al tiempo que tarda en duplicarse la masa del cultivo.

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

1.1. Cambios en las condiciones de crecimiento

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

El tratamiento con rifampicina, 150 $\mu\text{g/ml}$, y/o cefalexina, 50

µg/ml, así como los cambios de temperatura de 30°C a 42°C, se realizó añadiendo el antibiótico o cambiándolo a un baño con la temperatura requerida, a cultivos creciendo exponencialmente cuando éste alcanzaba aproximadamente 0,15 unidades de absorbencia.

2. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

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

Para la conservación de las estirpes durante periodos de tiempo de hasta dos semanas y para permitir su uso inmediato a partir de colonias aisladas y purificadas, las estirpes se conservaron en placas Petri con el medio sólido adecuado a 4°C . Las estirpes que iban a ser utilizadas durante cada etapa del trabajo se obtuvieron por extensión de 10 a 20 µl del volumen conservado a -80°C sobre una placa de medio sólido. A partir de esta primera extensión se obtuvieron colonias aisladas a las que se les comprobaron sus características genéticas específicas. Mediante siembra por agotamiento de una colonia comprobada y correcta, se aislaron las colonias con las que se trabajó. Las estirpes fueron traspasadas a placas con medio fresco cada dos semanas para impedir que las células alcanzaran un estado estacionario avanzado, con el consiguiente cambio fisiológico, alteración de la viabilidad y tasa de mutación.

3. AISLAMIENTO DE DNA

3.1. Aislamiento de DNA cromosómico

Para aislar el DNA cromosómico se usó un procedimiento que resulta muy satisfactorio con *E. coli* y con varios otros tipos de bacterias Gram negativas (Mahaffy y Zyskind, 1989). Se centrifugaron 1,2 ml de un cultivo denso de las bacterias a 7.000 g durante 1 minuto y el sedimento se resuspendió en 310 µl de HTE. A la suspensión celular se adicionaron 350 µl de N-lauroil-sarcosina al 2% en HTE y se mezcló bien mediante la inversión del tubo. Posteriormente se añadieron 5 µl de RNasaA preparada a 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 17,5 µl de Pronasa y se dejó actuar de 30 a 90 minutos a 50°C hasta que la lisis fue completa. A continuación se agitó fuertemente el lisado durante 2 minutos para fragmentar el DNA.

3.2. Aislamiento de DNA plasmídico

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

4. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE DNA

4.1. Purificación de DNA mediante extracciones con fenol/cloroformo

Tras el tratamiento de lisados celulares con enzimas proteolíticas, la eliminación de las proteínas de una solución de ácidos nucleicos se realizó por el procedimiento de extracción de la solución acuosa con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y, posteriormente, con cloroformo:alcohol isoamílico para eliminar los residuos de fenol de la preparación. A la solución de ácidos nucleicos se añadió un volumen igual de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; los componentes se mezclaron por agitación mecánica fuerte durante un minuto hasta formar una emulsión que se mantuvo a 0°C durante 15 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 7.000 g durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Estos pasos se repitieron hasta que las proteínas no eran visibles en la zona de la interfase (un mínimo de dos veces). A la solución acuosa final obtenida se añadió el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezclaron y se separaron las fases por centrifugación y finalmente se recuperó la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos en solución.

4.2. Concentración de DNA mediante precipitación

Para concentrar soluciones de DNA se procedió normalmente a su precipitación con etanol o isopropanol. Para ello, a la solución de

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

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

4.3. Obtención de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para la extracción y purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el Kit GeneClean II (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los rendimientos obtenidos rondaron el 50%.

5. ELECTROFORESIS DE DNA

La separación e identificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue de 0,8% (p/v). Las electroforesis se realizaron aplicando una intensidad de corriente constante, para evitar el sobrecalentamiento del tampón de electroforesis, que dependió del grado de resolución que se pretendía obtener.

Para la preparación del gel y como tampón de electroforesis se utilizó Tris-acetato 1X (TAE) (apartado 4.3.2 de *Materiales*). Las

electroforesis se realizaron en presencia del colorante fluorescente bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml incorporado en el gel, que, aunque reduce la movilidad del DNA, permite su visualización durante y al final de la electroforesis tras la iluminación del gel con luz ultravioleta de onda corta. Las muestras cargadas en el gel se mezclaron previamente con solución BBFX1 (apartado 4.3.2 de *Materiales*). Esta solución confiere color e incrementa la densidad de la muestra facilitándose la entrada en los pocillos del gel. A la vez, debido a que el colorante de esta solución *azul de bromofenol* migra hacia el ánodo en un campo eléctrico y aproximadamente al mismo nivel que un fragmento de DNA lineal de doble cadena de 300 pares de bases, nos permite inferir el recorrido de las muestras durante la electroforesis. Por último, las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

6. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA MEDIANTE DENSITOMETRÍA DE GELES

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

7. WESTERN BLOT

El Western Blot (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979) es un método para la detección de proteínas en una muestra de un tejido homogeneizado o extracto celular. Las proteínas separadas electroforéticamente son transferidas del gel a una membrana. Para determinar la presencia de una proteína la membrana con las proteínas se trata con un anticuerpo, usualmente sin marcar, que reconoce específicamente un epítipo antigénico en la proteína unida a la membrana. Este anticuerpo es detectado por la unión de algún reactivo inmunológico secundario, como una anti-inmunoglobulina, marcado. Esta técnica es muy útil en la detección y cuantificación de proteínas específicas no marcadas en una mezcla compleja de proteínas. Además, como la separación en electroforesis de las proteínas se lleva a cabo, normalmente, en condiciones desnaturizantes, se eliminan los problemas de solubilización, agregación y coprecipitación de la proteína diana con otras proteínas adventicias. El western blot es un método

originado en los laboratorios de George Stark en Stanford. El nombre de "western blot" fue dado a la técnica por W. Neal Burnette (Burnette, 1981) en base a "Southern blot", técnica para la detección de DNA desarrollada con anterioridad por Edwin Southern. La detección de RNA es denominada Northern blotting.

7.1. Obtención de extractos celulares

Para la obtención de los extractos proteicos se centrifugaron 20 ml de cultivos de la estirpe deseada tras el tratamiento oportuno, y el sedimento de células fue resuspendido en una solución de lisozima en PBS (0,4 mg/ml) cuyo volumen varió dependiendo del tamaño del sedimento. Esta suspensión se mantuvo 30 minutos en hielo y después fue sonicada 4 veces durante 30 segundos cada vez en hielo. Se añadió Tritón 100 hasta una concentración final de 1% y se mezcló vigorosamente. El lisado se aclaró centrifugando a 4°C durante 30 minutos a 12.000 g y recogiendo el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante se hirvió durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

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

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido como SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamina y SDS) descrito por Laemmli y colaboradores (Laemmli, 1970). Se usó el sistema vertical Mini Protean II (BioRad). El gel consta de dos partes: una superior o gel de empaquetamiento de 1 cm de longitud y a continuación una inferior o gel de

separación de 5 cm de longitud. El gel de empaquetamiento permite que las proteínas migren a mayor velocidad y, cuando éstas llegan al límite con el gel de separación, la muestra sufre una condensación o empaquetamiento de todas las proteínas en una sola banda. Una vez dentro del gel de separación, las proteínas se separarán formando bandas en función de su masa molecular. Este tipo de electroforesis se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes debido a la presencia de

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

El gel se montó en la cubeta de electroforesis y se añadió tampón de migración 1X en la cámara interna hasta cubrir los pocillos y en la cámara externa hasta superar el límite inferior del gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 50 minutos con un campo eléctrico de 150 V.

7.3. Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Después de completarse la electroforesis se extrajo el gel, se le retiró la porción superior correspondiente al gel de empaquetamiento y el resto se montó sobre tres papeles Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel, previamente humedecido en tampón de transferencia 1X. Encima del gel se colocó la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL de Amersham), cortada del mismo tamaño que el gel, que había permanecido sumergida en tampón de transferencia durante 15 minutos. Después se colocaron otros tres papeles de filtro humedecidos y se eliminaron las posibles burbujas que pudieran haber quedado atrapadas.

Finalmente, todo el conjunto se situó entre dos esponjillas empapadas en tampón de transferencia y se colocó en el cassette de transferencia. Se utilizó el sistema de transferencia húmeda (Trans-Blot cell de BioRad). La transferencia se realizó a 4°C durante 12 horas ajustando la intensidad de corriente a 84 mA.

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

7.4. Inmunodetección de las proteínas

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

A continuación se eliminó la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario diluido 3.000 veces en leche en polvo al 10% en PBS-Tween 0,2% y se incubó toda la noche a 4°C en agitación suave.

Posteriormente se llevaron a cabo 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tween 0,2% y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 3.000 veces en leche en polvo al 10% en PBS-Tween 0,2% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada. Tras esta incubación se lavó otras 5 veces con PBS-Tween 0,2% durante 5 minutos cada vez y se pasó al revelado de la membrana. Como el anticuerpo secundario usado llevaba acoplada la enzima peroxidasa, se usó un método de revelado basado en la quimioluminiscencia producida por la reacción de esta enzima en presencia de luminol, para ello se usó el Kit SuperSignal West Pico de Pierce Biotechnology según las instrucciones de uso del proveedor.

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

8. ELECTROPORACIÓN

La eficiencia en la introducción del DNA plasmídico dentro de una bacteria es un fenómeno de gran importancia práctica en Biología Molecular. La electroporación provee un método de transformación en *E. coli* con una eficiencia de 10 a 20 veces más alta que la obtenida con los mejores métodos químicos (Shigekawa y Dower, 1988). A partir de una dilución aproximada de 1:100 de un cultivo nocturno de la estirpe a transformar en LBTG, se obtuvo un cultivo entre 0,5 y 0,8 unidades de absorbencia creciéndolo con agitación vigorosa. En este momento, se incubó el cultivo a 0°C durante 20 minutos y a continuación se recogieron las células centrifugando a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de agua milliQ a 0°C que del cultivo tomado inicialmente y se volvieron a centrifugar para concentrarlas en la mitad del volumen de agua milliQ a 0°C. Se centrifugaron de nuevo y el sedimento se concentró en 1/50 del volumen del cultivo inicial en glicerol al 10% en agua milliQ a 0°C. Las células volvieron a recogerse por centrifugación y se resuspendieron en un volumen final 1/3 del anterior de la misma solución (la concentración celular debería ser de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml).

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

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

de Bio-Rad a 25 μ F, 2,5 KV y 200 Ω . Posteriormente, se sacó la cubeta de la cámara y se añadió inmediatamente 1 ml de LBTG, se resuspendieron las células con la ayuda de una micropipeta y se transfirieron a un tubo de cristal estéril para su incubación a 30°C durante 2 horas con agitación suave para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el DNA plasmídico adquirida por las células transformadas. Finalmente, la selección de los transformantes se llevó a cabo extendiendo la suspensión celular sobre placas de medio rico selectivo e incubándolas 48 horas a 30°C.

9. ETIQUETADO DE GENES CROMOSÓMICOS UTILIZANDO FRAGMENTOS DE PCR

Desde hace mucho tiempo es conocido que los bacteriófagos codifican su propio sistema de recombinación homóloga y se ha demostrado que la función λ -Red (γ , β y *exo*) promueve una tasa de recombinación de fragmentos lineales de DNA más alta que la demostrada por los mutantes *recBC sbcB* o *recD*. Uzzau y colaboradores han desarrollado un método eficiente y sencillo, fundamentado en esta idea, que permite añadir una cola con un epítipo a un gen de interés en el cromosoma bacteriano (Uzzau *et al.*, 2001). Este procedimiento está basado en una modificación del método de reemplazo de genes propuesto por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). De forma general, el sistema diseñado por Datsenko consiste en reemplazar secuencias cromosómicas por otras secuencias similares que contienen un gen de resistencia a un antibiótico. Estas secuencias se construyen por PCR usando cebadores específicos con extensiones de homología de 36 a 50 nucleótidos. El proceso de reemplazo se lleva a cabo por el sistema de recombinación de regiones vecinas homólogas mediante el sistema λ -Red

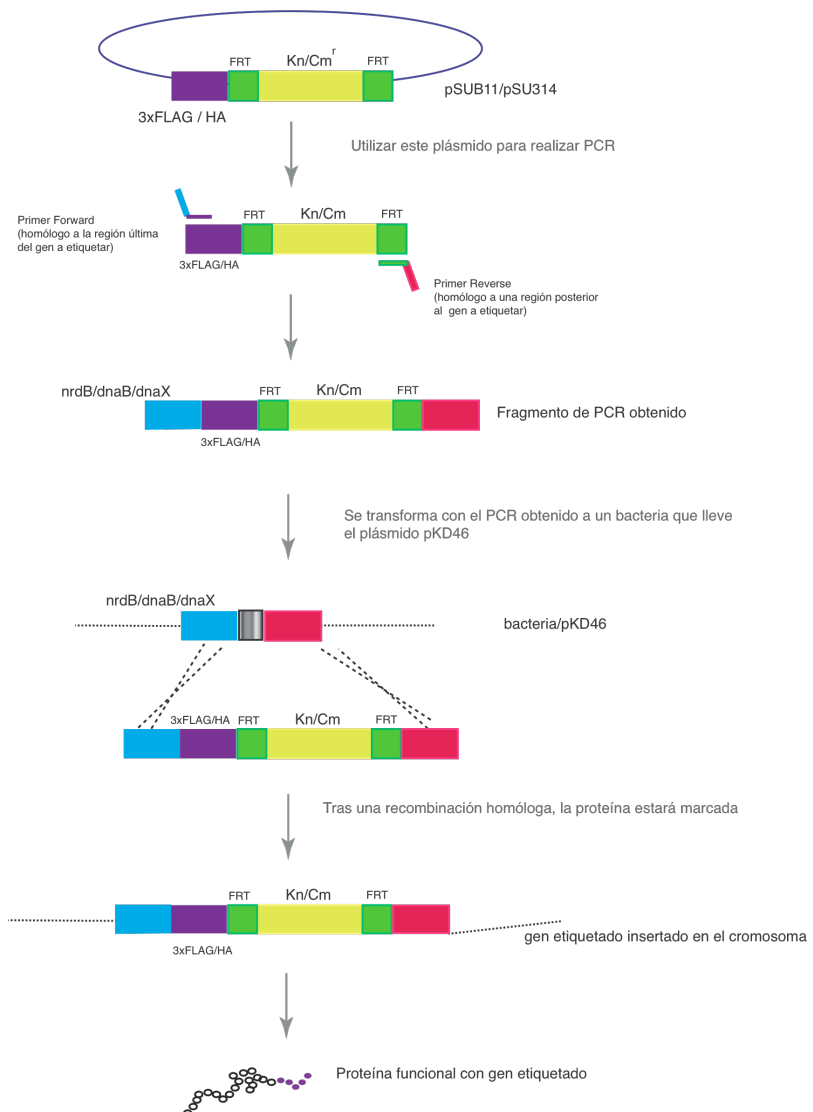
El método desarrollado por Datsenko, junto con las modificaciones propuestas por Uzzau *et al.*, se utilizó para llevar a cabo el etiquetado de los genes *nrdB*, *dnaX* y *dnaB*. Los pasos seguidos para este etiquetado se detallan en los apartados siguientes (Fig. 17).

9.1. Generación del fragmento de DNA que se va a insertar

La primera fase del proceso de etiquetado de los genes consiste en obtener el fragmento adecuado de DNA que nos permita insertar el epítipo de interés en el lugar elegido. Para este fin se diseñan unos cebadores específicos y se elige como molde un plásmido que lleve la secuencia del epítipo junto a un gen de resistencia a un antibiótico.

Los cebadores diseñados llevan extensiones homólogas a la última región del gen que se va a etiquetar (cebador *directo*) y a una región próxima al final de éste (cebador *inverso*). El cebador *directo* lleva entre 36-39 nucleótidos complementarios al extremo 3' del final del gen y 20 nucleótidos complementarios a una región del plásmido por delante de la secuencia del epítipo y el cebador *inverso* lleva entre 36-39 nucleótidos complementarios a una región posterior de la secuencia que codifica al gen de interés a etiquetar y 20 nucleótidos complementarios al extremo 3' de la secuencia FRT posterior al gen de resistencia al antibiótico (Fig. 17). Las secuencias de los cebadores utilizados para etiquetar los genes *nrdB*, *dnaB* y *dnaX* se muestran en la tabla 2.

FIGURA 17. Protocolo para el etiquetado de genes basado en la recombinación homóloga.



El plásmido pSUB11 se utilizó como molde para la amplificación de fragmentos que contengan la secuencia 3xFLAG, seguida de un cassette con el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por sitios FRT. El plásmido pSU314 se utilizó como molde para la amplificación de fragmentos con la secuencia del epítipo HA del virus influenza humana y con el gen de resistencia a cloranfenicol (Uzzau *et al.*, 2001).

Para obtener los fragmentos de DNA seleccionados se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un termociclador Eppendorf (Modelo Mastercycler Gradient). Las concentraciones finales de los componentes de la PCR fueron: tampón Taq 1X, dNTPs 50 μ M, cebador inverso 0,25 μ M, cebador directo 0,25 μ M y Taq polimerasa 2U/100 μ l. El DNA molde se obtuvo de una colonia de la estirpe que llevaba el plásmido de interés en 20 μ l de TE. A esta solución se añadieron 5 μ l a la reacción de PCR. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 64°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 2 minutos. Este ciclo se repitió 35 veces. Para optimizar el rendimiento de la reacción las muestras fueron incubadas a 95°C durante 2 minutos antes de comenzar los ciclos de amplificación. De este modo se asegura una completa desnaturalización del DNA molde. Asimismo y para garantizar la finalización de las polimerizaciones en marcha, se incubó durante 10 minutos a 72°C tras los ciclos desnaturalización-hibridación-polimerización.

Tras la reacción de PCR se comprobó que la amplificación de la secuencia tenía el tamaño adecuado mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 18).

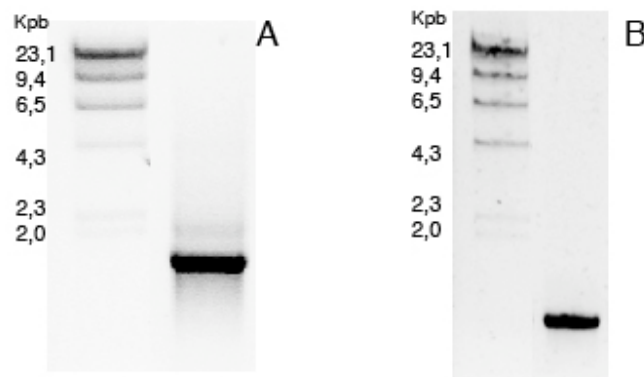


FIGURA 18. Electroforesis para comprobar si la amplificación de la secuencia que se va a insertar tiene el tamaño adecuado.

A) Fragmento generado con el epítipo 3xFLAG utilizando el plásmido pSUB11 como DNA molde.

B) Fragmento generado con el epítipo HA utilizando el plásmido pSU314 como DNA molde.

9.2. Transformación de CMT927 (CM735/pKD46) con el fragmento de DNA adecuado e inducción del sistema λ -Red para su inserción en el cromosoma bacteriano

El sistema λ -Red se encuentra clonado en el plásmido de bajo número de copias pKD46 que posee un replicón sensible a la temperatura. Este plásmido expresa el sistema λ -Red bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (P_{araB}) que permite prevenir la recombinación en condiciones de no inducción. El sistema λ -Red incluye tres genes: γ , β y *exo* cuyos productos son Gam, Bet y Exo, respectivamente. Gam inhibe a la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD del hospedador, de forma que Bet y Exo puedan acceder a los extremos del DNA para promover la recombinación (Datsenko y Wanner, 2000).

De esta manera, el crecimiento de la cepa CMT927 (CM735/pKD46) en un medio con arabinosa produciría la expresión intracelular del sistema λ -Red cuya presencia, en forma activa, induce la recombinación homóloga del DNA lineal. Por lo tanto, la introducción de un exceso estequiométrico de un fragmento de DNA amplificado por PCR al interior de estas células podría favorecer una recombinación con el cromosoma si existen regiones homólogas.

Las células de CMT927 se transformaron con los fragmentos de DNA portadores de las secuencias de los epítomos y los genes de resistencias a antibióticos por el método del cloruro cálcico (Dower *et al.*, 1988). Este método de transformación se basa en la exposición de un cultivo bacteriano en fase exponencial, al que previamente se había añadido arabinosa para inducir el sistema λ -red, a una solución hipotónica de cloruro de calcio 0,1 M a 0 °C que provoca la formación de células competentes capaces de captar DNA exógeno.

Para ello se hizo una dilución 1:100 de un cultivo nocturno de la cepa CMT927 en 100 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y arabinosa a una concentración final de 1 mM. Se incubó a 30°C con fuerte agitación hasta que alcanzó una absorbencia₆₀₀ de 0,3 a 0,4. Posteriormente, el cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos y, a continuación, se centrifugó durante 7 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante en condiciones de esterilidad y se resuspendió el sedimento en 1/5 del volumen inicial de 0,1 M de CaCl₂ frío. Después de mantenerlo 10 minutos en hielo, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sedimento se resuspendió en 1/25 el volumen inicial de 0,1 M CaCl₂ frío. Finalmente, se separaron 100 μl de las células competentes a un tubo TCA estéril frío y se añadieron 50 ng/ μl del DNA obtenido tras la amplificación. Se mezcló suavemente y se colocó a 0°C durante 30 minutos para que el DNA se adhiriese a la pared de las células competentes. A continuación se incubó el tubo a 42°C durante 90

segundos. Este choque térmico sirve para incorporar el DNA dentro del célula. Posteriormente, se mantuvo entre 1 y 2 minutos en hielo. Para finalizar, se añadieron 400 µl de LB y se colocó en un baño orbital con agitación suave durante 1 hora a 37°C para permitir la expresión fenotípica. Finalmente, se sembraron en placas de kanamicina o cloranfenicol, según el antibiótico, y se incubó a 30°C durante 24 horas.

9.3. Comprobación de la inserción del fragmento en el cromosoma bacteriano

Con los clones obtenidos se comprobó por PCR si la inserción se había producido correctamente. Los cebadores utilizados (Tabla 2) se diseñaron de forma que se pudiera diferenciar no sólo si la inserción se había producido en el cromosoma, sino también si ésta se había producido en el lugar correcto. Por ese motivo no se utilizaron los mismos cebadores que para la generación del fragmento de DNA, sino unos diseñados próximos al gen insertado. Si no existe inserción los fragmentos generados serán de 501 pb en el caso del etiquetado del gen *nrdB*, 550 pb en el caso del gen *dnaB* y 501 en el caso del gen *dnaX* (Fig. 19). La PCR se realizó utilizando las mismas condiciones que anteriormente fueron descritas, variando únicamente la temperatura de hibridación que en este caso fue de 55 °C.

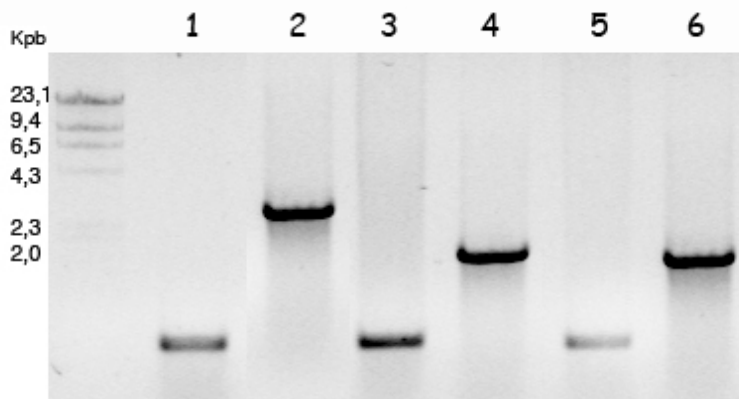


FIGURA 19. Electroforesis para comprobar si la inserción se ha producido en el lugar correcto.

1, 3 y 5. CM735/pKD46
2. CM735nrdB:3XFLAG/pKD46,
4. CM735dnaB::HA
6. CM735dnaX::HA

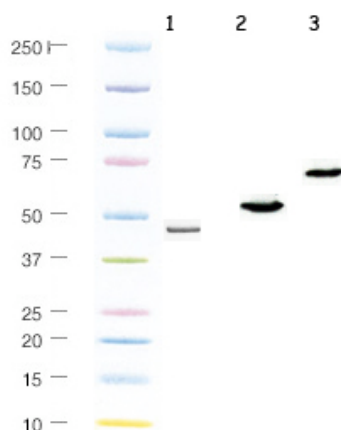
Para los PCR de la calle 1 y 2 se utilizaron los cebadores *finrdB* F y R, para las calles 3 y 4 se utilizaron los cebadores *findnaB* F y R y para las calles 5 y 6 se utilizaron los cebadores *findnaX* F y R.

9.4. Análisis de inmunodetección

En las estirpes CMT931 (*nrdB*:3xFLAG), CMT932 (*dnaB*:HA) y CMT933 (*dnaX*:HA) se comprobó la especificidad de los anticuerpos por Western Blot usando los anticuerpos monoclonales de ratón anti-3xFLAG (Sigma-Aldrich) y el anti-HA clone HA-7 (Sigma-Aldrich) diluidos 1:3000, así como el anti-conejo con la enzima peroxidasa conjugada a una dilución 1:3000 (Fig. 20).

FIGURA 20. Western Blot para comprobar la especificidad de los anticuerpos en un gel al 12%.

El peso molecular de la proteína NrdB, DnaB y DnaX es 43,51, 52,4 y 71,3 KDa, respectivamente).



10. TRANSDUCCIÓN

Debido a que el fenotipo asociado a cada construcción cromosómica puede variar según el fondo genético en que se exprese, se decidió realizar todos los análisis en la misma estirpe. Como en algunos casos las construcciones a analizar se encontraban en otras estirpes, era necesaria su transferencia. El método empleado en la mayoría de los casos para lograrlo fue la transducción generalizada, que consiste en la transferencia de material genético bacteriano de una célula a otra dentro de una cápsula vírica. El bacteriófago usado fue P1vir (Miller, 1992).

10.1. Multiplicación de fagos

De un cultivo con una densidad óptica de 0,8 de la estirpe donadora en medio rico LB con glucosa al 0,1% y 5 $\mu\text{g/ml}$ de TdR (LBTG) que contenía CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 100 mM, se tomaron alícuotas de 0,1 ml del cultivo y se infectaron con 10 μl de una suspensión de fagos (10^9 fagos/ml). Tras un periodo de 15 minutos de preadsorción a 37°C se adicionaron 3 ml de agar de cobertera precalentado a 45°C y se vertieron en una placa de medio rico LA10 con glucosa al 0,1%, 5 $\mu\text{g/ml}$ de TdR y CaCl_2 5mM. Las placas se incubaron de 20 a 24 horas a la temperatura de crecimiento de la estirpe donadora, se recogió el agar de cobertera, se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 g, se recuperó el sobrenadante y se conservó a 4°C con unas gotas de cloroformo.

Para el recuento del número de fagos se realizó una dilución seriada de una alícuota de 100 μl en LBTG hasta obtener una suspensión de 1.000 a 2.000 fagos/ml. A partir de ella se tomó una

alícuota de 0,1 ml que se añadió a un tubo que contenía 250 µl de un cultivo de la estirpe receptora crecida a la temperatura de crecimiento de la bacteria en LBTG, al que se le añadía CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 100 mM antes de la infección con el fago. Finalmente y tras 15 minutos de incubación a 37°C, la mezcla se sembró con agar de cobertera en placas de LA10 con glucosa al 0,1%, 5 µg/ml de TdR y CaCl_2 5 mM. Una vez incubadas de 20 a 24 horas a la temperatura apropiada se procedió al recuento de las calvas.

10.2. Transducción

Se obtuvo un cultivo estacionario fresco (densidad óptica de 0,8) de la estirpe receptora en medio rico LBTG al que se le añadió CaCl_2 2,5 mM y MgSO_4 1 mM antes de la infección con el fago. Alícuotas de 900 µl de esta suspensión se infectaron con los fagos obtenidos a partir de la estirpe donadora con una multiplicidad de infección de 0,1. Transcurridos 30 minutos de preadsorción a la temperatura de crecimiento de la estirpe receptora, las infecciones se interrumpieron por la adición de 5 ml de LBTG con

citrato sódico 5 mM. Tras incubar las bacterias una hora y media con agitación y a la temperatura apropiada, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 µl de MgCl_2 0,01 M y se sembraron en palcas selectivas de NAT, a las que se le habían añadido los antibióticos requeridos en cada caso, y se incubaron a la temperatura adecuada durante al menos 24 horas para seleccionar los transductantes que contenían la construcción deseada.

10.3. Comprobación de los transductantes

En los transductantes obtenidos se comprobaron los requerimientos de aminoácidos y de la resistencia a antibióticos, así como la correcta incorporación de timidina radiactiva.

11. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE DNA SINTETIZADO

11.1. Marcaje del DNA in vivo

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

La timidina trifosfato (TTP) es un nucleótido específico de la síntesis de DNA. Las células sintetizan este nucleótido a partir de

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

Para llevar a cabo el marcaje de un cultivo creciendo en medio líquido, se diluyó un cultivo nocturno en el mismo medio de crecimiento al que se había añadido previamente 5 µg/ml de TdR y 1 µCi/ml de ³H-TdR. La toma de muestras y todos los tratamientos de estos cultivos comenzaron tras un tiempo de incubación en este medio radiactivo no inferior a cinco generaciones. En el caso de las estirpes que no eran *thyA* para que la ³H-TdR se incorporara a la síntesis de DNA se añadió al cultivo uridina a una concentración final de 150 mM.

11.2. Medida de la síntesis de DNA

Para cuantificar la incorporación de ³H-TdR en el DNA se tomaron alícuotas de 200 µl y se depositaron en tubos que contenían 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% a 0°C. Transcurridos no menos de 30 minutos, para permitir la precipitación del material insoluble en el ácido, el contenido de cada tubo se filtró a través de un filtro Wathman GF/C de fibra de vidrio, de 24 mm de diámetro, previamente humedecido en agua destilada. Los tubos se lavaron con TCA 5%, se filtró este volumen y finalmente los filtros se lavaron dos veces con agua destilada. Después de secarlos a 80 °C se colocaron en viales a los que se añadieron 3 ml de la mezcla de centelleo. La medida de la cantidad de ³H-TdR incorporada al DNA se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801.

11.2.1 Medida de la síntesis de DNA en crecimiento exponencial

El valor de la cantidad de radiactividad incorporada al DNA en las muestras tomadas a diferentes tiempos a lo largo del crecimiento es equivalente a la cantidad de DNA presente en el cultivo. De este modo, se puede averiguar la relación:

$$\frac{DNA}{masa} = \frac{dpm}{absorbencia \cdot 1000}$$

11.2.2. 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 (150 µg/ml) a cultivos que habían alcanzado 0,04 unidades de absorbencia. En el momento del comienzo del tratamiento se tomaron varias muestras de 200 µl de cultivos que se precipitaron en TCA. Se continuó con la toma de alícuotas y su precipitación a diferentes tiempos hasta al menos un tiempo igual al doble del de generación de la estirpe.

La cantidad de DNA acumulada por el cultivo tras el inicio del tratamiento inhibitor se determinó por las dpm en las que se estabiliza la acumulación relativas a las dpm en el momento del inicio de la inhibición. De esta forma, la síntesis residual de DNA es el resultado de la siguiente fórmula:

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

A partir de esta ecuación, se determinó n utilizando el programa de ordenador Replicon (Jiménez-Sánchez & Guzmán, 1988).

12. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas y de una en una por delante de un haz de luz (Oteen *et al.*, 1980; Boye *et al.*, 1983, Michelsen *et al.*, 2003).

La citometría de flujo de células tratadas con cefalexina y rifampicina permite estimar el valor del periodo $C+D$ (Boye *et al.*, 1988). La citometría de flujo ha sido usada, además, para la determinación directa de los periodos C y D por el análisis de la distribución de cultivos creciendo exponencialmente, de forma directa (Skarstad *et al.*, 1983) o mediante simulación por ordenador (Molina y Skarstad, 2004; Skarstad *et al.*, 1985).

12.1. Tratamiento de las muestras

Las células creciendo exponencialmente con una absorbencia de 0,15 fueron tratadas con 150 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina, que inhibe la transcripción resultando en la inhibición del inicio de la replicación, y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cefalexina, que inhibe la división, durante cuatro o cinco generaciones. Las células finalizan con 2^n cromosomas (Skarstad et al;1986), donde n representa el número de puntos de replicación al tiempo del inicio del tratamiento con las drogas.

Las células tratadas con rifampicina y cefalexina fueron lavadas y resuspendidas en tampón TE y después fijadas en etanol al 70%. Cuando las muestras quisieron ser analizadas, las células fijadas en etanol fueron lavadas en tampón fosfato 0,1 M a pH 9,0 y teñidas durante toda la noche con Isotiocianato Fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich) en el mismo tampón (Wold *et al.*, 1994). Las células fueron lavadas dos veces en un tampón fosfato salino 0,02 M a pH 7,5 y resuspendidas en el mismo tampón. El DNA fue teñido durante 1 hora en 3 $\mu\text{g/ml}$ de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) en el mismo tampón (concentración final 1,5 $\mu\text{g/ml}$).

El análisis de la citometría de flujo se realizó utilizando un FACStar (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón y un láser de kriptón (Torheim *et al.*, 2000).

12.2. Análisis del ciclo celular

Basándose en el modelo de replicación del DNA en *E. coli* propuesto por Cooper y Helmstetter (1968), Skarstad *et al* (1985) determinó la duración del periodo C y D , las edades de inicio y de terminación de la replicación y la cantidad media de DNA a partir de una distribución normal de DNA obtenidas por citometría de flujo (Cooper y Helmstetter, 1968; Skarstad *et al.*, 1985). El valor de los parámetros τ , C y D determinan la silueta y posición exacta de la distribución de DNA por célula de un cultivo exponencial.

La cantidad de DNA acumulado por célula ($DNA/cél$) está en función de la edad de las células (a), las horquillas de replicación por célula (F) y la relación constante de la síntesis de DNA por horquilla de replicación ($K=\tau/2C$).

Si no hay variabilidad de una célula a otra en el valor de C , D y τ , la iniciación es sincrónica en todos los orígenes de una célula y asumiendo que el movimiento de la horquilla de replicación es constante, la velocidad de síntesis de DNA durante el ciclo celular puede ser descrita como una función con dos discontinuidades, una al inicio y otra en el término de la replicación.

El ciclo, por tanto, está dividido en tres intervalos, con las edades a_1 y a_2 :

$$a_1 = \frac{(y\tau - (C + D))}{\tau} \quad y$$

$$a_2 = \frac{(x\tau - D)}{\tau}$$

donde y y x son un número entero de ciclos de división en el que D y $C + D$ ocurren, respectivamente.

La cantidad de DNA por célula en cada uno de los tres intervalos, definidos por el inicio y el término, es la siguiente:

$$DNA/cél(a) = k(F_1a + F_3) + a_1K(F_1 - F_2) + a_2K(F_2 - F_3)$$

$$0 \leq a \leq a_1$$

$$DNA/cél(a) = k(F_2a + F_3) + 2a_1K(F_1 - F_2) + a_2K(F_2 - F_3)$$

$$a_1 \leq a \leq a_2$$

$$DNA/cél(a) = kF_3(a + 1) + 2a_1K(F_1 - F_2) + 2a_2K(F_2 - F_3)$$

$$a_2 \leq a \leq 1$$

La proporción de células con un contenido en DNA dado, $h(G)$, en un cultivo exponencial puede ser obtenida:

- de la distribución de edades, $f(a)$, definida como la densidad probabilística de que una célula esté en la edad a , y
- de la distribución del DNA acumulado por célula ($DNA/cél$).

En los intervalos en los que se está sintetizando DNA, la fracción del cultivo comprendida entre las edades a y $a + \Delta a$ es igual a la que tiene un contenido de DNA entre G y $G + \Delta G$.

La distribución de DNA, $h(G)$, es una combinación de las ecuaciones $f(a)$, $DNA/cél(a)$ y $f(G)$.

Si $G_1 = G(a_1)$ y $G_2 = G(a_2)$ y sustituimos, entonces:

$$h(G) = 2 \cdot \ln 2 / (F_1 K) \cdot e^{-\ln 2 [G - F_3 K - a_1 K (F_1 - F_2) - a_2 K (F_2 - F_3)] / (F_1 K)},$$

$$G_0 \leq G \leq G_1$$

$$h(G) = 2 \cdot \ln 2 / (F_2 K) \cdot e^{-\ln 2 [G - F_3 K - 2a_1 K (F_1 - F_2) - a_2 K (F_2 - F_3)] / (F_2 K)},$$

$$G_1 \leq G \leq G_2$$

$$h(G) = 2 \cdot \ln 2 / (F_3 K) \cdot e^{-\ln 2 [G - F_3 K - 2a_1 K (F_1 - F_2) - 2a_2 K (F_2 - F_3)] / (F_3 K)},$$

$$G_2 \leq G \leq G_3$$

donde G_0 es el contenido de DNA de las células recién nacidas y $G_3 = 2 \cdot G_0$ es el contenido de DNA de las células dividiéndose.

13. MICROSCOPIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE Y FLUORESCENCIA

13.1. Instrumentación

El sistema de microscopía Delta Vision (Applied Precision) integra un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 equipado con objetivos 40x, 60x y 100x UPLS 2 APO y filtros para DAPI, FI-GF-BF y RD-TR-PE, además de un especial filtro policromico CFP/YFP/RFP. Este equipo también presenta un modelo de contraste diferencial Nomarski. Este sistema permite controlar la temperatura, incubar con CO_2 y monitorizar en X-Y-Z-T en células vivas. El sistema de captación de las imágenes está formado por una cámara Cool 3 SNAP H9/ICX885.

Este sistema de microscopía se define como un microscopio de deconvolución. La deconvolución es un proceso basado en software por el cual una imagen fuera de foco puede ser re-enfocada. Este método se realiza después de la adquisición de la imagen y utiliza un tipo de algoritmo para extraer información de las regiones borrosas de una imagen y colocarlas en el mismo plano de foco. El programa Silicon Graphics O₂ se carga con el software DeltaVision para el análisis y adquisición de las imágenes, este programa da directamente el tamaño de cada foto adquirida en μm .

Entre las ventajas que presenta este sistema de microscopía, podemos destacar la posibilidad de generar imágenes fluorescentes multi-color 3D, particularmente de estructuras pequeñas. Debido al potente software integrado es posible generar un alto contraste en las imágenes capturadas. Una ventaja que el microscopio de deconvolución tiene respecto al confocal es que las muestras son iluminadas con luz blanca a partir de una lámpara de mercurio de 100 W que pasa por un filtro óptico seleccionado. Esto implica que la toma de muestras teñidas con múltiples fluoróforos (la rueda de filtros sólo necesita ser girada) es un proceso mucho más rápido y sencillo que cambiar la longitud de onda de la fuente de iluminación, además de que el rango de excitación de la longitud de onda de los láseres es mucho más pequeño.

La microscopía de contraste de fase y fluorescencia de las estirpes JS1018 y JK607 fue llevada a cabo usando un microscopio Zeiss Axioplan y las de CMT934, JS1018/pPS2, JK607/pPS2 y

JS1018FL con un microscopio Nikon, modelo Eclipse E600, ambos con lámparas Nikon de alta presión de mercurio.

El tamaño de los focos, el de los nucleoides y el de las células fue medido usando Image J software 4 (Wayne Rasband, NIH) y Adobe Photoshop CS3. Las medidas de la longitud de la célula y del nucleoide en la estirpe CMT927, origen de las que se construyeron para los estudios de inmunomicroscopía, dio la recta de regresión $L(\text{cel})=L(\text{nuc})\cdot 0,98947+0,21714$ con un coeficiente de regresión de 0,96723, que se aplicó para calcular la longitud celular a partir de la del nucleoide en las imágenes donde no se pudo adquirir una foto con luz visible.

13.2. Fijado de las muestras

Las bacterias se fijaron en etanol. Para ello, 1,5 ml de células bacterianas de un cultivo exponencial se recogieron por centrifugación, se lavaron en 1,5 ml de tampón TE frío y se resuspendieron en 1ml del mismo tampón. Las células se fijaron añadiendo 500 μl de etanol al 74% frío (Fossum *et al.*, 2003).

13.3. Inmunotinción con el anticuerpo SeqA

Para la detección de SeqA se utilizó un anticuerpo anti-SeqA proporcionado por la Dra. Kirsten Skarstad. Esta inmunotinción se basa en un proceso previo de absorción del anticuerpo inespecífico para evitar la fluorescencia derivada de ésta (Fossum *et al.*, 2003).

a) Preparación del extracto celular.

El extracto celular para la absorción inespecífica del anticuerpo SeqA fue preparada a partir de una estirpe ΔseqA (EBO193). Las células de 1000 ml de un cultivo de esta estirpe se recogieron y se lavaron en 10 ml de una solución 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a pH 7,4 y se resuspendieron en 1,5 ml del mismo tampón. A continuación se lisaron con la adición de 500 μl de una solución de lisozima 250 mg/ml durante 30 minutos, mediante un proceso de congelación y descongelación a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Se recogió el sobrenadante por centrifugación (15.000 rpm 30 minutos a 4°C) y el extracto celular se almacenó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, para una posterior utilización.

b) Absorción del anticuerpo inespecífico.

Para la absorción del anticuerpo inespecífico se utilizó una dilución 1:200 del anticuerpo anti-SeqA. Para ello se añadieron 2,35 μl del anticuerpo a 467,65 μl del extracto celular preparado con anterioridad. Posteriormente se añadió 30 μl de PBST con 10 mM EDTA y se incubaron durante una hora en hielo. Tras una

centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C se recogió el sobrenadante. Este sobrenadante se utilizó como anticuerpo con el objetivo de eliminar toda la fluorescencia debida a una absorción inespecífica.

13.4. Tinción de las células fijadas con los diferentes anticuerpos

La suspensión de células fijadas se centrifugó y se lavó con PBST. Posteriormente se añadió 200 µl de la solución de lizozima y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para proceder a la destrucción de la pared celular. A continuación, el sedimento se sometió a 5 lavados de 3 minutos con 200 µl de PBST para eliminar cualquier resto de lizozima. Antes del tratamiento con anticuerpos, la solución celular fue tratada con metanol y con acetona durante 1 minuto a temperatura ambiente para re-fijar estructuras celulares. Posteriormente, se procedió a la incubación durante 30 minutos a 30 °C con PBST con 2% de BSA para bloquear la unión inespecífica del anticuerpo.

El siguiente paso fue la eliminación de la solución de bloqueo y la incubación con 50 µl de la dilución adecuada del anticuerpo primario (extracto celular del anticuerpo anti-SeqA de conejo diluido 1:200, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG conjugado con Cy-3 (Sigma-Aldrich) diluido 1:1000 o el anticuerpo policlonal de ratón anti-HA diluido 1:100 (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 30°C. A continuación se centrifugó y el sedimento se sometió a lavados de 5 lavados de 3 minutos con 200 µl de PBST. Una vez tratados con el anticuerpo primario, y antes de tratar con el anticuerpo secundario, se procedió a otro paso de bloqueo con PBST con 2% BSA. Posteriormente, se procedió a la incubación del anticuerpo secundario adecuado diluido 1:200 (anti-ratón conjugado con FITC o anti-conejo conjugado con FITC) durante 1 h a 30 °C. Para finalizar, se procedió a eliminar cualquier resto de anticuerpos mediante lavados de 3 minutos con PBST.

13.5. Preparación de las muestras para su visualización

Los portaobjetos se lavaron con etanol y agua y, posteriormente, se trataron con polyisina 10 mg/ml y se secaron a 30°C durante 10 minutos.

Las muestras inmunoteñidas con el medio de montaje Hoestchst 33258, que permite visualizar el DNA, se depositaron sobre el cobre y, a continuación, se colocó en el portaobjeto. Éstos fueron almacenadas a 4°C en oscuridad para su posterior visualización.

14. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA SEGUIDA DE LA HIBRIDACIÓN A MICROARRAYS GENÓMICOS DE DNA DE *E. coli* (ChIP-on-chip)

14.1. Introducción

La inmunoprecipitación de cromatina (chIP) es una técnica para detectar la asociación de proteínas con regiones específicas del genoma *in vivo*. Los cultivos celulares se tratan con formaldehído para fijar las uniones proteína-proteína y proteína-DNA entre moléculas que están próximas a la cromatina. Para ello se prepara un extracto de células y, posteriormente, la cromatina unida a las proteínas se somete a sonicación o digestión enzimática para reducir el tamaño medio de los fragmentos de DNA hasta unos 500 pb. El DNA que se obtiene de este proceso es inmunoprecipitado con un anticuerpo frente a la proteína deseada. Por tanto, las secuencias de DNA que son directamente o indirectamente unidas a una proteína específica están enriquecidas en la muestra inmunoprecipitada. La PCR puede ser utilizada con cebadores específicos para comprobar si el DNA inmunoprecipitado está enriquecido en la secuencia de DNA que se espera que esté unida a la proteína de interés. El chIP puede ser combinado con la tecnología de microarrays para identificar la localización de proteínas específicas en el genoma completo (Kuo y Allis, 1999).

Este método proporciona una imagen instantánea de las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA en un momento determinado del ciclo celular, gracias a la utilización de formaldehído que inactiva todas las enzimas celulares esenciales en el momento de su adición en el cultivo celular. Por lo tanto, esta técnica es muy útil para el análisis cinético de eventos que ocurren en secuencias del cromosoma *in vivo*.

Un requerimiento esencial para el chIP o chIP-on-chip es la disponibilidad de un anticuerpo para la precipitación selectiva de los complejos DNA-proteínas. Gracias a la disponibilidad de anticuerpos comerciales frente a antígenos específicos y la facilidad para etiquetar genes usando fragmentos de PCR, explicado con anterioridad, es posible estudiar las interacciones de la proteína que nos interese. En nuestro trabajo hemos utilizado dos anticuerpos diferentes: anti-SeqA y anti-3xFLAG, epíteto unido al extremo 3' *nrdB*.

14.2. Condiciones de cultivo

Para los experimentos de chIP-chip utilizamos una estirpe con la mutación *dnaC2* que permita sincronizar las replicaciones de un cultivo. Un cultivo de 20 ml de la estirpe adecuada se creció en LB hasta una absorbencia entre 0,9 y 1,0. Posteriormente se añadió formaldehído al cultivo a una concentración final del 1% y se incubó durante 20 minutos. Para parar la unión de las proteínas con el DNA se incubó el cultivo con glicina a una concentración de 0,5 M durante 5 minutos.

14.3. Inmunoprecipitación de la cromatina

14.3.1. Obtención de la cromatina

El cultivo de 20 ml se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm y se lavó dos veces con 1,5 ml de TBS. Después del segundo lavado, las células se resuspendieron en 0,5 ml del tampón de lisis (la lisozima es añadida en este momento) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.

Después del tratamiento con lisozima, se completó la lisis celular por la adición de 4 ml de tampón IP. Para minimizar la degradación de las proteínas, se añadió PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) a una concentración final de 1 mM. La muestra se mantuvo en hielo para proceder a la sonicación con un sonicador Branson S150D y repetimos la operación 3 veces con una amplitud del 20% durante 30 segundos.

A continuación se eliminan los restos celulares mediante centrifugación durante 20 minutos a 17.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio al que se añadió 2 ml de tampón IP.

14.3.2. Inmunoprecipitación y lavados de la muestra

Antes de su uso, las bolas Ultralink proteína A/G (Pierce) se lavan tres veces con PBS. Para inmunoprecipitar los complejos DNA-proteínas, se añadieron 800 µl de la cromatina sonicada a 20 µl de las bolas A/G y 2 µl del anticuerpo apropiado. A continuación se incuban en “rotating wheel” durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Después de la inmunoprecipitación se recuperaron las bolas A/G y se lavaron en columnas Spin-X, suministradas por Sigma Aldrich, durante 1 minuto a 3.000 rpm. A continuación las bolas A/G se lavaron dos veces en 0,5 ml de tampón IP y se incubaron durante 3 minutos en “rotating wheel”. Después se lavaron una vez con 0,5 ml tampón IP con una concentración más alta de sales, una vez con tampón de lavado y una última vez con TE a pH 8,0.

14.3.3. Elución de la muestra por calor

A continuación se transfirió la columna con las bolas a un eppendorf limpio y se resuspendieron en 100 µl de tampón de elusión. Se incubaron durante 20 minutos a 65 °C y, posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a 3.000 rpm y se transfirieron a un tubo de PCR.

14.3.4. Ruptura de las uniones generadas (decrosslinking)

En esta etapa se eliminan las uniones generadas por el formaldehído mediante calor y el DNA recuperado puede ser analizado.

Para ello se añadieron 10 µl de Pronasa (Roche preparada en PBS) preparada a 40 mg/ml a cada muestra y se utilizó un termociclador para calentar la muestra durante 2 horas a 42°C y después 6 horas a 65°C. Las reacciones pueden ser mantenidas a 4°C durante toda la noche.

A continuación se procedió a la purificación de los fragmentos de DNA usando el kit de purificación Quiagen PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Al final de este proceso se eluyó el DNA de la columna y se determinó la concentración del DNA utilizando un Nanodrop (Eppendorf).

14.4. Marcaje del DNA e hibridación a los microarrays

Para identificar segmentos de DNA específicos asociados con las proteínas que se van a estudiar, la muestra problema y el control se combinaron e hibridaron a 44.000 oligonucleotidos de DNA de los microarrays (Oxford Gene Technology, Oxford, UK). Para cada sonda, se midió la relación Cy5/Cy3 y se representó frente a la correspondiente posición en el genoma de *E. coli* K12.

Para ello, el DNA de la muestra y del control se resuspendieron en un volumen de 20 µl y a una concentración mínima de 5 µg/ml. Se mezcló el DNA con 20 µl de 2,5 X cebador aleatorio (Bioprime kit, Invitrogen) y 0,25 µl de agua estéril y se desnaturalizó por calor durante 3 minutos a 94 °C. Después de la desnaturalización, se añadieron 5 µl de dNTP (2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 0,5 mM dCTP), 3,5 µl de dCTP marcado con Cy5 o Cy3 (1 mM; GE Healthcare), dependiendo de si era el control o la muestra, 1 µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa (Bioprime kit), se mezcló suavemente y se incubó 2 horas a 37°C.

Posteriormente se añadió 0,5 µl de la DNA polimerasa a cada tubo y se incubó a 37°C durante 2 horas.

Para purificar los fragmentos de DNA de la reacción de marcaje se usaron las columnas de purificación de PCR QIAquick (Quiagen), según las instrucciones del fabricante. El DNA marcado se eluyó de la columna usando 50 µl del tampón de elución de Quiagen.

Las muestras de DNA marcadas pueden ser mezcladas e hibridadas a los arrays de la compañía Oxford Gene Technology. Los arrays de OGT son construidos en la plataforma Agilent y las hibridaciones se realizan en el instrumento Agilent SureHyb.

El escaneado de los microarrays produjo una lista de intensidades de señal de Cy5 y Cy3. Para cada sonda en el microarray se calculó la relación de la intensidad de la fluorescencia y se representó frente a la posición del genoma de la sonda correspondiente.



RESULTADOS

Localización y organización de las horquillas de replicación

Resumen

El análisis del número y localización de los focos de la proteína SeqA, obtenidos por microscopía de inmunofluorescencia, muestra que la proteína SeqA se localiza en posiciones discretas en la célula y que la formación de sus focos depende de la replicación cromosómica.

Las horquillas de replicación presentan una organización dinámica dependiente del ciclo celular, aumentando la cohesión de las horquillas con el solapamiento de rondas de replicación. Este resultado acaba con la controversia planteada sobre los diferentes modelos de organización de la maquinaria de replicación propuestos y establece una compatibilidad entre ellos.

La utilización de ChIP-on-chip en cultivos sincronizados nos permite detectar las horquillas de replicación activas y abre un campo de posibilidades para conocer con más detalle la replicación cromosómica.

Por último, el estudio de un mutante con una RNR termosensible revela que los focos SeqA no pueden identificarse como focos concretos a temperatura restrictiva y la segregación cromosómica está afectada gravemente. Por lo tanto, la proteína RNR debe jugar un importante papel funcional y/o estructural, conectando el complejo de síntesis de nucleótidos con las maquinarias de replicación y segregación y con la división celular.

Abstract

The analysis of the number and location of SeqA foci, obtained by immunofluorescence, shows that SeqA protein is located in discrete positions that depend on chromosome replication.

Replication forks show a dynamic organization which were found to be dependent on the cell cycle, with a higher fork association the higher the overlapping replication cycles. The dynamic organization of replisomes reported here, may allow ending the controversy among the alternative models of the organization of the replication machinery.

The ChIP-on-chip technique using synchronized cultures permits the recognition of the localization of active replication forks upon DNA molecule and opens a wide range of possibilities of new studies on replication.

Finally, the use of a thermosensitive mutant strain affected in the RNR protein shows that SeqA foci can not be observed at the restrictive temperature, furthermore, chromosome segregation is drastically affected. Consequently, the RNR protein must play an important functional or/and structural role connecting nucleotide synthesis to segregation and cell division.

Capítulo 1 · Localización y organización de las horquillas de replicación

La replicación cromosómica de *E. coli* progresa bidireccionalmente a partir de dos horquillas de replicación originadas en *oriC*. Existe una gran controversia sobre dónde se localiza y cómo se organiza la maquinaria de replicación (Bates y Kleckner, 2005; Dingman *et al.*, 1974; Hiraga, 2000; Lemon y Grossman, 2000; Molina y Skarstad, 2004). Empleando diferentes técnicas de microscopía y condiciones de crecimiento, se han propuesto modelos que difieren en el agrupamiento de las horquillas de replicación, oscilando entre los que asumen que las horquillas de replicación son independientes y los que sugieren que varias horquillas se agrupan durante toda la replicación formando un aparato de replicación estacionario.

El primer objetivo de este capítulo ha sido estudiar la proteína SeqA y su relación con la replicación cromosómica. Para este estudio utilizamos dos técnicas diferentes: la inmunodetección por microscopía de fluorescencia y la inmunoprecipitación de la cromatina seguida de la hibridación a microarrays genómicos de *E. coli* (ChIP-on-chip). El segundo objetivo fue determinar si la organización de las horquillas de replicación depende del ciclo celular, basándonos en la citometría de flujo e inmunomicroscopía de fluorescencia de la proteína SeqA.

1.1. La proteína SeqA se localiza en posiciones discretas dentro de la célula y la formación de focos SeqA depende de la replicación cromosómica

Estudios *in vitro* demuestran que la proteína SeqA se une a las secuencias GATC hemimetiladas originadas tras el avance de las horquillas de replicación (Guarne *et al.*, 2005). Además, la inmunodetección de la proteína SeqA, usando microscopía de fluorescencia (Brendler *et al.*, 2000; Onogi *et al.*, 1999), ha revelado focos discretos dentro de la célula que coinciden con los correspondientes al DNA recién replicado (Adachi *et al.*, 2005; Brendler *et al.*, 2000; Molina y Skarstad, 2004; Onogi *et al.*, 1999). Por tanto, la localización y el número de focos de SeqA puede ser utilizado

para estudiar la replicación cromosómica en funcionamiento y, en definitiva, las horquillas de replicación.

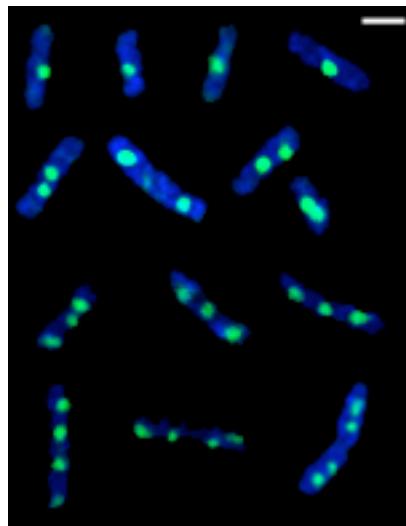
En primer lugar analizamos la posición subcelular de los focos SeqA en células de *E. coli*. Para ello se utilizó la estirpe CMT931 (*nrdB::3xFLAG*) creciendo en glicerol a 37°C. La microscopía de fluorescencia mostró la presencia de focos discretos (Fig. 21) en número desde uno a cuatro focos (Fig. 22). La localización de los focos mostró que las células que presentan un único foco, éste está situado, preferentemente, cerca del punto medio de la célula ($0,4 \pm 0,08$) (Fig. 22.A). Cuando las células presentan dos focos, en la mayoría (86,1%) están situados a ambos lados del centro celular y localizados en las posiciones 1/4 y 3/4 ($0,28 \pm 0,11$ y $0,67 \pm 0,17$) (Fig. 22.B). En las células con tres focos, uno de ellos está situado cercano a la posición 1/4 ($0,22 \pm 0,13$), el segundo en el centro ($0,53 \pm 0,13$) y el tercero en la posición 3/4 ($0,86 \pm 0,15$) (Fig. 22.C). La proporción de células con 4 focos es baja (1,56%) y parecen estar localizados en las posiciones 1/8, 3/8, 5/8 y 7/8 ($0,13 \pm 0,09$; $0,37 \pm 0,08$; $0,68 \pm 0,16$; $0,86 \pm 0,08$) (Fig. 22.D).

FIGURA 21. Inmunolocalización de la proteína SeqA en células de un cultivo exponencial de la estirpe CMT931(*nrdB::3xFLAG*) de *E. coli* creciendo en glicerol a 37°C.

Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína SeqA se marca con los anticuerpos anti-SeqA y anti-conejo-FITC (verde).

El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).



Estos resultados apoyan la idea preexistente de que los focos SeqA están en posiciones discretas en la célula. Además dichas posiciones son similares a las obtenidas al analizar las horquillas de replicación con pulsos de BrdU, que marca el DNA recién replicado (Adachi *et al.*, 2005).

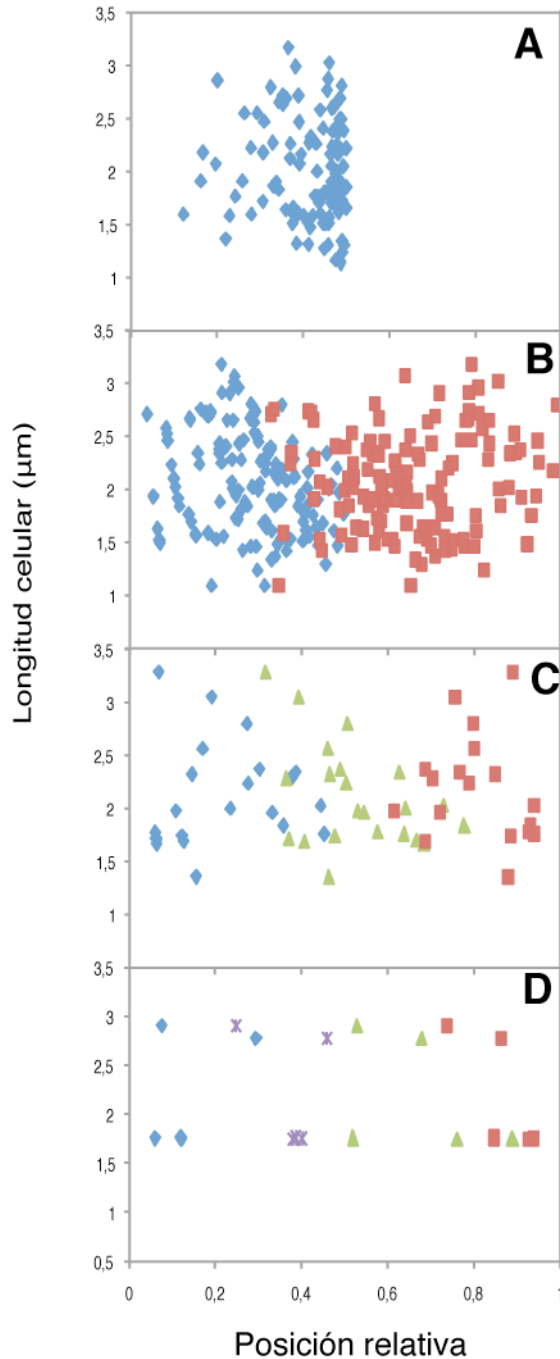


FIGURA 22. Posiciones subcelulares de los focos de la proteína SeqA en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.

El número de células analizadas fue 321. El 2,8% de las células presentaban 0 focos, (A) el 45,8% con 1 foco, (B) el 42,68% presentaban 2 focos, (C) el 6,85% 3 focos, (D) el 1,6% 4 focos y el 0,3% tenían 5 focos.

Como la proteína SeqA se une al DNA hemimetilado, es decir, recién replicado (Onogi *et al.*, 1999), los focos deberían desaparecer cuando la iniciación de la replicación cromosómica se bloquea. Ya ha sido estudiado cómo disminuye el número de focos de SeqA en cultivos con rifampicina (Molina y Skarstad, 2004), pero como la rifampicina afecta a la transcripción y a la estructura cromosómica puede distorsionar el análisis de los focos SeqA. Para verificar que la presencia de focos de SeqA depende de la replicación activa se utilizó la estirpe CMT934 (*dnaC2 nrdB::3xFLAG*) que presenta el alelo *dnaC2*. Este

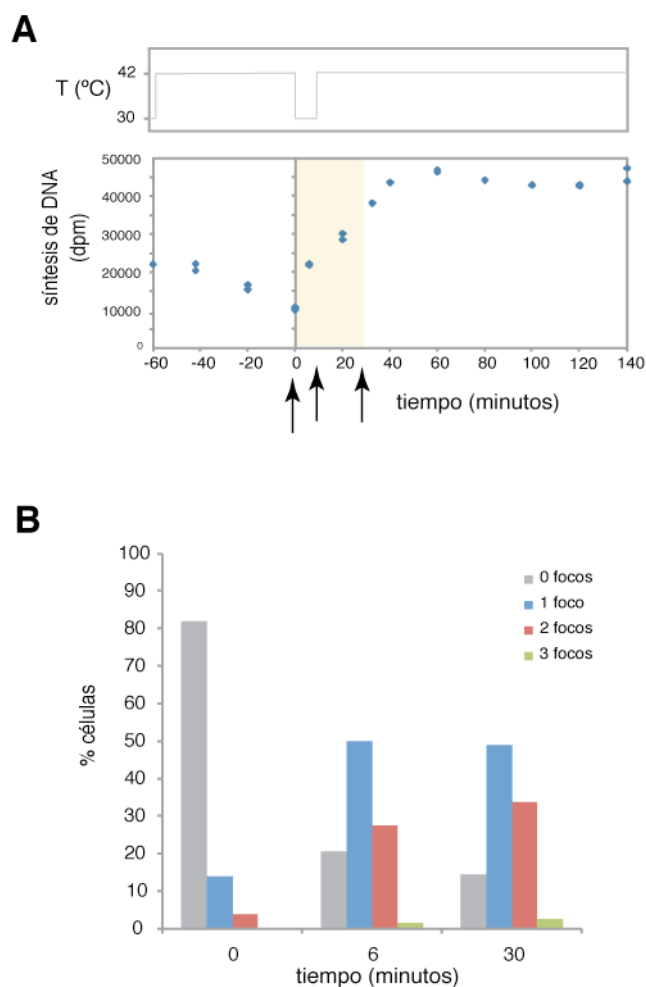
alelo codifica una proteína DnaC termosensible que, a temperatura restrictiva, afecta a la carga de la helicasa DnaB sobre las cadenas de DNA en la apertura del origen de replicación (Marians, 1995) e inhibe la iniciación cromosómica cuando se incubaba a temperatura no-permisiva. Para obtener células sincronizadas para el inicio de la replicación cromosómica un cultivo exponencial de CMT934 creciendo en medio mínimo con glicerol a 30°C se incubó a 42°C durante 60 minutos para completar las rondas de replicación en marcha mientras se bloqueaba la iniciación de la replicación. El cultivo se transfirió posteriormente a 30°C durante 6 minutos, para permitir el inicio de la replicación y después se cambió de nuevo a 42°C para inhibir posteriores inicios de replicación. La síntesis de DNA en este cultivo fue analizada mediante la acumulación de ^3H -timidina. Los resultados de la incorporación de la radiactividad indican que en estas condiciones sólo ocurre una ronda de replicación y que la replicación termina a los 30 o 40 minutos (Fig. 23.A).

FIGURA 23. Estudio de la proteína SeqA en células sincronizadas.

(A) Síntesis relativa de la estirpe CMT934 (*dnaC2 nrdB::3xFLAG*).

(B) Número de focos de SeqA en células sincronizadas a diferentes tiempos.

En la parte superior de la figura A aparece un diagrama esquemático del diseño del experimento para sincronizar las células. La zona sombreada representa el momento del cultivo (señalado por flechas) donde se analiza el número de focos de SeqA.



A continuación, analizamos el número de focos SeqA tras el bloqueo y posterior sincronización de la replicación cromosómica (Fig. 23.B). Cuando no hay replicación activa (tras 60 minutos a 42°C) más de un 80% de las células carece de focos visibles de SeqA. Al transferir el cultivo a 30°C permitiendo el inicio de nuevas rondas de replicación, se inicia la primera ronda de replicación y un 80% de las células presentaron 1 y 2 focos de SeqA y sólo un 20% no mostró focos. El número de células con 2 focos SeqA experimenta un pequeño aumento a los 30 minutos de incubación a 42°C, que podría indicar que algunos de los focos de SeqA correspondían con dos horquillas de replicación que se han separado en dos focos al migrar en direcciones opuestas. El número de células con un foco disminuye ligeramente, lo que correspondería con las células que han iniciado la replicación en los 6 min a 30°C. El resto de células sin focos serían las células que no han iniciado en estos 6 min y ya no iniciarán tras incubación a 42°C.

Estos resultados sugieren que la aparición de focos SeqA depende de la replicación cromosómica en funcionamiento y apoyan la idea de que los focos SeqA discretos son agrupamientos de moléculas de SeqA unidas a segmentos de DNA recién replicados y hemimetilados en las horquillas de replicación.

1.2. ChIP-on-chip de cultivos sincronizados permite detectar las horquillas de replicación activas

Los estudios de localización subcelular de las horquillas de replicación con pulsos con BrdU y posterior análisis por inmunofluorescencia muestran una colocalización con los focos SeqA (Adachi *et al.*, 2005; Molina y Skarstad, 2004). Sin embargo, la inmunomicroscopía no permite determinar si SeqA se une uniformemente a lo largo de todo el cromosoma. Además, ya que la secuencia GATC no está homogéneamente distribuida por todo el genoma (Henaut *et al.*, 1996) y la desaparición de los focos depende de la remetilación por la proteína Dam metilasa que ocurre a los 2-5 minutos tras pasar la horquilla de replicación (Slater *et al.*, 1995), es posible que la replicación de determinadas zonas del cromosoma no produzca focos de SeqA.

En este trabajo hemos utilizado la técnica de ChIP-on-chip para detectar la asociación de proteínas con regiones específicas del genoma *in vivo* que combinada con el array del genoma de *E. coli* nos permite identificar la localización de la proteína SeqA en el cromosoma completo y en un momento determinado del ciclo celular.

Para estudiar la localización de las horquillas de replicación activas mediante ChIP-on-chip se utilizó la estirpe CMT933 (*dnaC2 dnaX::HA nrdB::3xFLAG*) a 30°C en medio LB. El alelo *dnaC2* nos

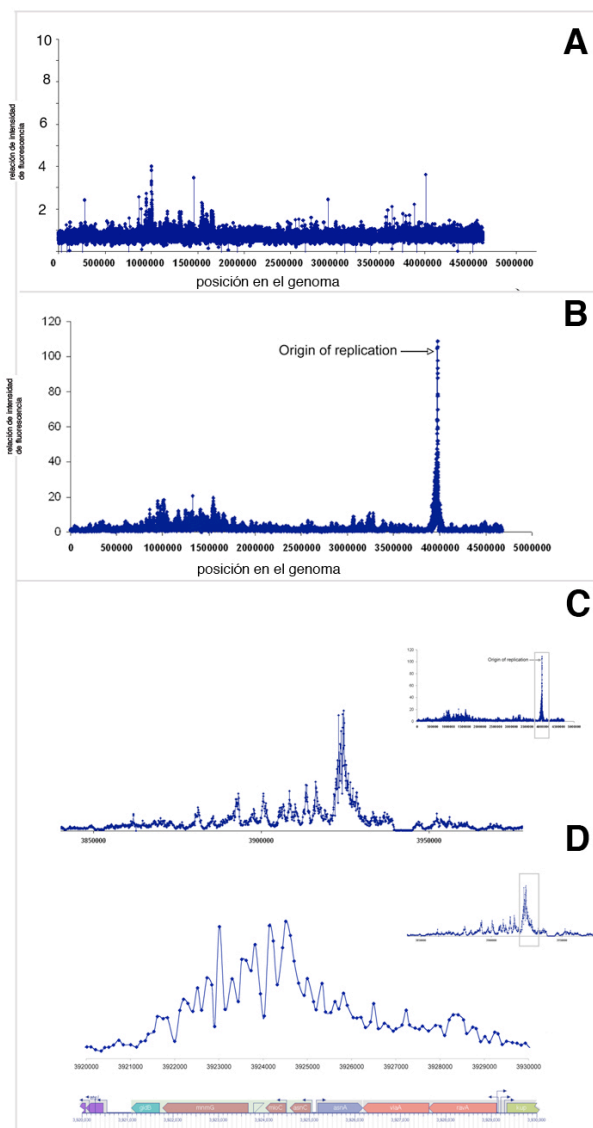
permite obtener células sincronizadas para el inicio de la replicación cromosómica. Las muestras se tomaron cuando la replicación estaba bloqueada (tras 60 minutos a 42°C) (Fig. 24.A) y cuando sólo una ronda de replicación estaba funcionando (6 minutos después del cambio a 30°C) (Fig. 24.B, C y D).

Los resultados indican que los ensayos de ChIP-on-chip sirven para detectar segmentos de DNA unidos a SeqA y que éstos son secuencialmente detectados según progresa la replicación bidireccional del DNA cromosómica. De esta forma, la proteína SeqA se une al DNA hemimetilado recién replicado y nos permite seguir el funcionamiento de las horquillas de replicación activas. Estos resultados indican que todo el genoma debe generar focos de la proteína SeqA.

FIGURA 24. ChIP-on-chip en células sincronizadas a diferentes tiempos con el anticuerpo anti-SeqA.

- (A) Tras 60 minutos a 42°C, cuando está inhibida la replicación.
 (B) A los 6 minutos tras el cambio a 30°C.
 (C) Análisis detallado de 100.000 pb correspondientes al minuto donde se inicia la replicación cromosómica.
 (D) Análisis detallado de 10.000 pb correspondientes a la secuencia *oriC* y las regiones más próximas.

La relación de intensidad de fluorescencia es la intensidad de la señal de la muestra analizada dividida por la del control (sin anticuerpo).



1.3. Las horquillas de replicación presentan una organización dinámica

1.3.1. La organización de las horquillas de replicación es dependiente del ciclo celular

Se han elaborado distintos modelos de organización de los replisomas empleando datos correspondientes a distintos tipos de ciclo celular. Con objeto de estudiar si la organización de las horquillas de replicación depende del tipo de ciclo, comparamos la distribución de los puntos de replicación, obtenida por citometría de flujo, con la de los focos de SeqA obtenidos por microscopía de inmunofluorescencia, en bacterias creciendo en diferentes medios de cultivo. Dado que las horquillas acopladas son detectadas como un único foco, la relación horquillas/foco o puntos de replicación/foco puede ser usada para entender la organización de la maquinaria de replicación.

Se cultivó la estirpe de *E. coli* CMT931 (*nrdB::3xFLAG*) a 37°C en medio mínimo que contenía glicerol, glucosa o glucosa con casaminoácidos como fuente de carbono. Los histogramas de los contenidos de DNA por célula de cultivos exponenciales (Fig. 25 A-C) se utilizaron para determinar el tiempo de replicación, periodo *C*, el tiempo transcurrido entre el fin de la replicación y división celular, periodo *D* (Fig. 25.D-F) y la distribución de los puntos de replicación por célula (Fig. 25.G-I). Las muestras tratadas con rifampicina y cefalexina (Fig. 25.A-C) se utilizaron para calcular el número de orígenes de replicación de los cultivos exponenciales. La existencia de dos picos mayoritarios, correspondientes a 2ⁿ cromosomas por célula, en cada población indica una baja variabilidad intercelular en los parámetros del ciclo y sincronía de la iniciación de la replicación en todos los medios de cultivo. Las bacterias crecidas en diferentes medios presentan diferentes ciclos celulares con un mayor solapamiento de rondas de replicación a medida que aumenta la velocidad de crecimiento. De esta forma, las bacterias con menor velocidad de crecimiento (Fig. 25.D), correspondientes al cultivo en glicerol, poseen cromosomas sin ninguna ronda de replicación en funcionamiento durante una parte de su ciclo celular. Al aumentar la velocidad de crecimiento (Fig. 25.E) hay dos rondas de replicación por cromosoma y hasta 6 puntos de replicación activos durante una parte del ciclo. En un medio con glucosa suplementado con casaminoácidos, el cromosoma bacteriano puede llegar a presentar hasta tres rondas de replicación y 12 puntos de replicación por célula (Fig. 25.F).

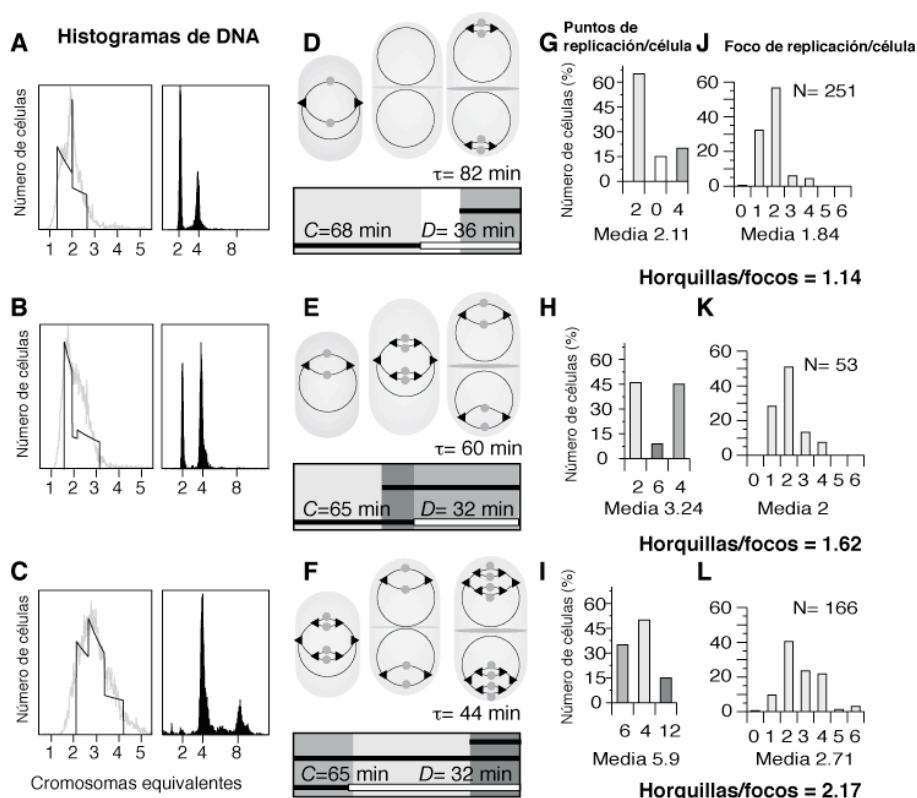
El análisis del número de focos SeqA por célula observados por inmunomicroscopía (Fig. 25. J-L) mostró que, en todos los cultivos, el número de focos es más bajo que el de puntos de replicación, con el grupo más frecuente de focos SeqA correspondiendo a la mitad del número de puntos de replicación (Fig. 25. G-L). Este resultado indica que las horquillas hermanas colocalizan durante una fracción del

periodo de replicación. Sin embargo, las horquillas de replicación y los focos no aumentan en la misma extensión al incrementarse el solapamiento de rondas de replicación. Así, el número de horquillas de replicación por foco aumenta con la velocidad de crecimiento, pasando de 1,14, a 2,17 (Fig. 25 G-I). Esto sugiere que la cohesión de las horquillas de replicación se alarga con la velocidad de crecimiento o con el número de horquillas por célula. Es destacable que estos resultados no están de acuerdo con ningún modelo propuesto sobre la organización del replisoma, ya que todos ellos suponen una correlación lineal entre el número de focos y el de horquillas.

FIGURA 25. Organización de las horquillas de replicación en células creciendo exponencialmente.

La estirpe CMT931 se creció en glicerol (A, D, G, J), glucosa (B,E, H, K) o glucosa con casaminoácidos (C, F, I, L). A-C son los histogramas de DNA de cultivos exponenciales (líneas grises) comparado con los histogramas teóricos simulados (líneas negras) y los histogramas de cultivos tratados con rifampicina y cefalexina. D-F representan los ciclos celulares de las bacterias creciendo en los distintos medios. G-I muestran la distribución de las horquillas de replicación estimadas por citometría de flujo y J-L la distribución de los focos de SeqA.

El valor de τ se determinó por densidad óptica y los valores C y D a partir de la citometría de cultivos exponenciales y tratados con rifampicina y cefalexina. Las horquillas de replicación están representadas por triángulos y los orígenes por círculos.



1.3.2. Análisis de la fracción de los nucleoides ocupada por focos de SeqA

Dado que el número de focos de SeqA es analizado a partir de imágenes de microscopía, diversos factores podrían dificultar su correcta detección. Durante el ciclo celular, la longitud celular se duplica, el tamaño del nucleoide aumenta y todas las macromoléculas se duplican. Sin embargo, el número de puntos de replicación por célula no aumenta necesariamente a lo largo del ciclo celular (Fig.

25.D-F). Por ejemplo, las células recién nacidas pueden tener más puntos de replicación que en una fase posterior del ciclo (Fig. 25.D y F) o el número máximo de puntos de replicación por célula puede alcanzarse en la mitad del ciclo y no al final (Fig. 25.E). De este modo, debido al variable espacio disponible para cada foco, podrían producirse subestimaciones de focos en determinadas clases de células.

Para estudiar si la cohesión diferencial de las horquillas de replicación detectada en este estudio podría ser debida a un error en la detección de algunos focos en algunas clases de células, se analizaron las imágenes deconvolucionadas de células creciendo lenta o rápidamente y se midieron las áreas de los focos de SeqA y de los nucleoides (Fig. 26). La fracción total del nucleoide ocupada por los focos de SeqA está entre 11,1 y 15,2% en las células creciendo en glicerol y entre 13 y 19,7% en los cultivos con glucosa y casaaminoácidos. Aunque esta fracción es más pequeña en células con menor número de focos, las diferencias no parecen ser suficientemente significativas para distorsionar el significado del recuento de células y producir una aparente cohesión de horquillas de replicación.

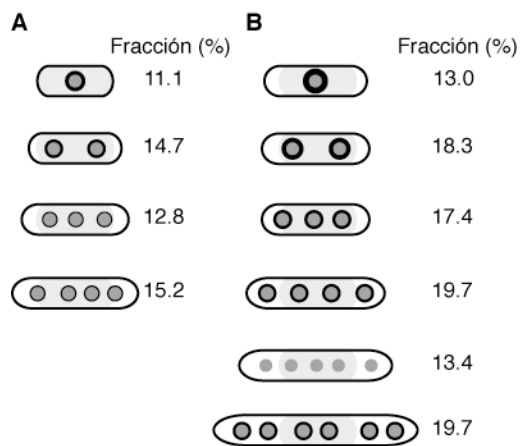


FIGURA 26. Fracción del nucleoide ocupada por las horquillas de replicación.

Se midieron 326 células creciendo en glicerol (A) y 111 células creciendo en glucosa con casaaminoácidos (B).

El esquema representa las áreas medias de los nucleoides y de los focos de las horquillas de replicación en células con diferente número de focos SeqA.

Para facilitar la comparación de tamaños entre los focos y los nucleoides, el foco y el nucleoide más pequeño aparecen como áreas grises solapadas en cada uno de distintos tipos de células. De manera que el foco más pequeño corresponde a la célula con 5 focos creciendo en glucosa con casaaminoácidos y el foco más grande a las células con 1 foco creciendo en el mismo medio y el nucleoide más pequeño corresponde a las células con 1 foco creciendo en glicerol.

Adicionalmente, hay que considerar que la intensidad de los focos podría disminuir y obtenerse una señal menor cuando aumenta el número de focos por célula, debido simplemente a que la cantidad de anticuerpo fluorescente se repartiría. Si tenemos en cuenta que células que poseen un número anormalmente alto de nucleoides y puntos de replicación (tratadas con cefalexina que bloquea la división celular pero no la replicación del DNA) presentan focos de SeqA de tamaño y apariencia normal (Molina y Skarstad, 2004) y, que trabajos en los que algunos mutantes de replicación (con pocas horquillas de replicación por célula) muestran muchos focos pequeños (Bach *et al.*, 2003; Molina y Skarstad, 2004), podemos concluir que el tamaño de los focos refleja,

al menos en parte, una organización dinámica de las horquillas de replicación.

1.3.3. El número de focos de replicación por célula sugiere una organización dinámica de los replisomas

El número de puntos de replicación por célula puede ser descrito por una función con un máximo de tres intervalos determinados por las edades de inicio y terminación de la replicación (Fig. 25.D-F) por lo que solamente se esperan tres clases de células con diferentes números de focos de replicación para cada ciclo celular. Sin embargo, prácticamente todos los estudios de focos de proteínas de la replicación bacteriana describen más de tres tipos de células (Adachi *et al.*, 2008; Brendler *et al.*, 2000; Espeli *et al.*, 2003; Hiraga *et al.*, 2000; Lemon y Grossman, 1998; Molina y Skarstad, 2004). Esta discrepancia entre los valores experimentales y los teóricos podría ser explicada por: i) la variación célula a célula, ii) el solapamiento de focos, o iii) por el agrupamiento dinámico de las horquillas de replicación.

Aunque la variación célula a célula podría explicar la distribución de focos, ya que aumentaría las diferentes subpoblaciones de células, nuestros resultados indican que la distribución de los focos de replicación no puede ser debida a una pequeña variación célula a célula, ya que los histogramas de DNA deberían ser muchos más amplios que los obtenidos.

La microscopía de deconvolución utilizada para este análisis minimiza las subestimaciones del número de focos, pero siempre podrían existir algunos focos que podrían solaparse aleatoriamente y no detectarse como focos individuales. Si los focos estuvieran distribuidos al azar, el solapamiento de focos estaría determinado por el área del nucleoide y de los focos y por el número de focos por célula. De esta forma podríamos estimar la fracción de células esperada que “esconden” focos. En la figura 26.A, el 7% de las células con dos focos serían observadas con un solo foco, es decir, en 7 de cada 100 células el segundo foco estaría, debido al azar, exactamente en la misma posición que el primero. Aunque esto añadiría más clases de células, la subestimación debido a la superposición aleatoria de focos no daría lugar a la distribución de focos encontrada, es decir, no permitiría transformar directamente la distribución de horquillas en distribución de focos. Por lo tanto, para explicar satisfactoriamente la presencia de células con 4 y 6 focos y la ausencia de células con 12 focos en un cultivo con 6, 4 y 12 puntos de replicación, hay que sugerir una organización dinámica de las horquillas de replicación.

1.3.4. Cohesión de las horquillas de replicación

En los trabajos que analizan la organización de la maquinaria de replicación se han utilizado diferentes estirpes, condiciones de crecimiento y técnicas, por lo que no es sorprendente la controversia que existe a la hora de considerar las diferencias encontradas. Para agrupar los modelos alternativos se utilizaron los datos publicados previamente para medir el grado de colocación de las horquillas. Los datos publicados se seleccionaron según los siguientes criterios: a) solamente estirpes silvestres; b) se conoce el número medio de horquillas/célula o puede ser calculado y c) esos datos se utilizaron para apoyar algún modelo de organización del replisoma. De esta forma, se compararon el número medio de horquillas de replicación y de focos en 16 cultivos seleccionados (Tabla 3). Aunque, de forma general, el número de focos aumenta al aumentar el de horquillas, la correlación entre ellos no es sencilla.

TABLA 3. Número medio de focos de replicación en 16 cultivos seleccionados.

μ , tasa de crecimiento
a. Método usado para visualizar las horquillas de replicación o proteínas.

Muestra	Estirpe	μ	DNA/ célula	Horquillas/ célula	Foco/ célula	Origen	Método de análisis ^a
1	NK9387	0.2	1.27	0.4	0.28	(Bates y Kleckner, 2005)	DnaX-GFP
2	NK9387	0.48	1.61	0.82	0.624	(Bates y Kleckner, 2005)	DnaX-GFP
3	IL05	0.4	1.4	0.97	0.65	(Adachi <i>et al</i> , 2008)	BrdU
4	CSH50	0.75	1.42	0.99	0.71	(Sunako <i>et al</i> , 2001)	FISH
5	NK9387	0.67	1.54	1.12	0.76	(Bates y Kleckner, 2005)	DnaX-GFP
6	CMT931	0.73	1.83	2.1	1.84	Este trabajo	Anti-SeqA Ab
7	JP313	0.95	1.79	2.1	1.6	(Brendler <i>et al</i> , 2000)	SeqA-GFP
8	IL05	0.8	1.94	2.76	1.76	(Adachi <i>et al</i> , 2008)	BrdU
9	CMT931	1	2.15	3.2	2	Este trabajo	Anti-SeqA Ab
10	JK607	0.86	2.16	3.4	2.63	Este trabajo	Anti-SeqA Ab
11	CM735	1.5	2.68	4.6	2.5	(Molina y Skarstad, 2004)	Anti-SeqA Ab
12	JP313	1.77	2.54	4.7	2.6	(Brendler <i>et al</i> , 2000)	SeqA-GFP
13	MGN54	1.76	2.55	4.9	2.6	(Molina y Skarstad, 2004)	Anti-SeqA Ab
14	SF72	1.46	2.64	5.34	2.7	(Fossum <i>et al</i> , 2007)	BrdU
15	CMT931	1.36	2.88	5.9	2.71	Este trabajo	Anti-SeqA Ab
16	IL05	1.71	2.94	7.09	2.53	(Adachi <i>et al</i> , 2008)	BrdU

Para el análisis de la cohesión de las horquillas de replicación se compararon las relaciones horquillas/foco y horquillas/célula (Fig. 27). El número medio de puntos de replicación/foco derivado de la tabla 3 indica el solapamiento de rondas de replicación y fue utilizado como índice de cohesión para comparar los cuatro modelos diferentes de organización de la maquinaria de replicación:

Modelo 1. Horquillas independientes. En este modelo, las horquillas de replicación se alejan una de otras independientemente a lo largo del cromosoma y cada una dará un foco.

Modelo 2. Fábricas de replicación transitorias con 2 horquillas. Las horquillas de replicación permanecen juntas durante el primer tercio de la fase de elongación y después se mueven en direcciones opuestas (Bates y Kleckner, 2005; Brendler *et al.*, 2000; Hiraga, 2000).

Modelo 3. Fábricas de replicación fijas. Las parejas de horquillas están unidas formando una factoría de replicación durante toda la replicación del DNA (Dingman *et al.*, 1974; Lemon y Grossman, 1998).

Modelo 4. Fábricas de replicación dinámicas con 4 y 2 horquillas. Los orígenes hermanos están unidos en el inicio, de forma que las 4 horquillas están agrupadas en las fábricas de replicación recién formadas y posteriormente las parejas de horquillas se desplazan en direcciones opuestas (Molina y Skarstad, 2004).

Los modelos 1 y 3 proponen valores del cociente puntos de replicación/focos iguales a 1 y 2, respectivamente. Mientras que en el modelo 2 los puntos de replicación se separan después del primer tercio, en el modelo 4 las fábricas replicativas se escinden en dos tras la replicación del primer décimo del cromosoma. En conclusión, los cuatro modelos proponen que el cociente puntos de replicación/foco está comprendido en intervalos muy estrechos.

Todos los modelos mencionados asumen que los replisomas están organizados independientemente del tipo de ciclo celular, difiriendo simplemente en la cohesión propuesta de las horquillas y, consecuentemente, en la relación puntos de replicación/foco esperada. Sin embargo, ninguno de los modelos es compatible con los resultados que sugieren una relación horquillas de replicación/foco variable. Para afrontar este problema se compararon el número de horquillas de replicación/foco, usado como índice de cohesión de replisomas, y el número de puntos de replicación/célula (Fig. 27). Aquí la relación de horquillas de replicación/foco fluctúa entre 1,14 (muestra 7) y 2,79 (muestra 16). En cultivos con menos de tres puntos de replicación/célula, las horquillas de replicación colocalizan durante una fracción moderada, alrededor de un tercio del periodo de replicación, mientras que en cultivos con más de tres puntos de replicación por

célula, la colocación de las horquillas de replicación aumenta con el solapamiento de los ciclos de replicación. La fase donde el índice de cohesión sobrepasa el valor que corresponde con el modelo de factoría de replicación, es decir, un número de puntos de replicación/foco superior a 2, sugiere un agrupamiento transitorio de más de dos horquillas en cada fábrica de replicación.

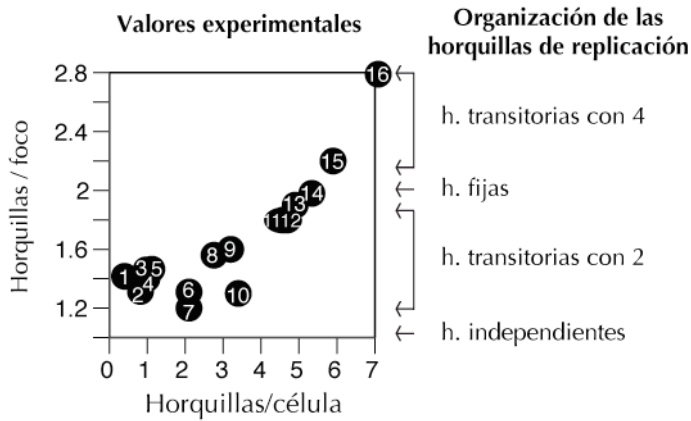


FIGURA 27. Análisis de la cohesión de las horquillas de replicación: comparación de las relaciones horquillas/focos y puntos de replicación/células.

El número medio de horquillas de replicación/foco (calculado a partir de los datos de la tabla 3) se usa como índice de cohesión para comparar los diferentes modelos. El número de puntos de replicación/célula indica el solapamiento de ciclos.

Los trabajos previos similares no consideran el crecimiento de las células lento y rápido juntos y/o asumen, sin analizar, los parámetros del ciclo celular, por lo tanto, no tienen en cuenta la influencia del solapamiento de ciclos. Nuestros resultados indican que existe una organización dinámica de las horquillas de replicación que depende del solapamiento de rondas de replicación, es decir, del número de horquillas de replicación por cromosoma.

1.4. Organización de las horquillas de replicación en un mutante en la ribonucleosidodifosfato reductasa

La elongación de la replicación depende de un complejo multiproteico que incorpora dNMPs en las cadenas de DNA recién replicadas. La RNR, codificada por el operón *nrdAB*, una enzima clave para la síntesis de estos precursores, sintetiza los cuatro dNDPs que una vez fosforilados serán utilizados por la DNA polimerasa III para la polimerización del DNA. Para analizar qué ocurre con las horquillas de replicación cuando la maquinaria de síntesis de nucleótidos está afectada, se utilizó la estirpe JS1018 que contiene el alelo *nrdA101*. Este alelo codifica una proteína termosensible y presenta problemas de replicación después de 4 horas a la temperatura no permisiva (42°C), además de alteraciones en la segregación de los cromosomas hermanos y en la división celular (Guzmán *et al.*, 2002; Riola *et al.*, 2007).

La estirpe parental, JK607, y la mutante JS1018, *nrdA101*, se cultivaron en medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos a 30°C y, posteriormente, se cambió a 42°C (a una D.O. de 0,15) (Fig. 28.A, D, G y J). Después de 30 minutos del cambio a 42°C, las cantidades de DNA/célula y masa/célula sufren un aumento similar (Fig. 28.D, E, J y K) demostrando que el contenido de DNA y masa celular están aún correlacionados en ambas estirpes. Además no se observa ninguna alteración importante ni en el número, ni en la morfología de los focos de SeqA (Fig. 28. N). Tras 180 minutos del cambio a la temperatura no permisiva, los focos de la proteína SeqA se agregan en la mitad de la célula y pasan a no poder ser identificados como focos individuales en el mutante *nrdA101* (Fig. 28. C, F, I, L, M y N). Además la segregación del nucleoide se pierde completamente y aparecen células anucleadas. Por lo tanto, estos datos sugieren que en un mutante que tiene afectada la maquinaria de síntesis de nucleótidos los focos de SeqA no pueden identificarse como focos concretos y la segregación del nucleoide está afectada gravemente, de manera que tiene comprometida tanto la maquinaria de replicación como la de segregación.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la proteína RNR juega un papel funcional y/o estructural importante, conectando la síntesis de nucleótidos con la replicación y la división celular (Guzmán *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2008; Riola *et al.*, 2007).

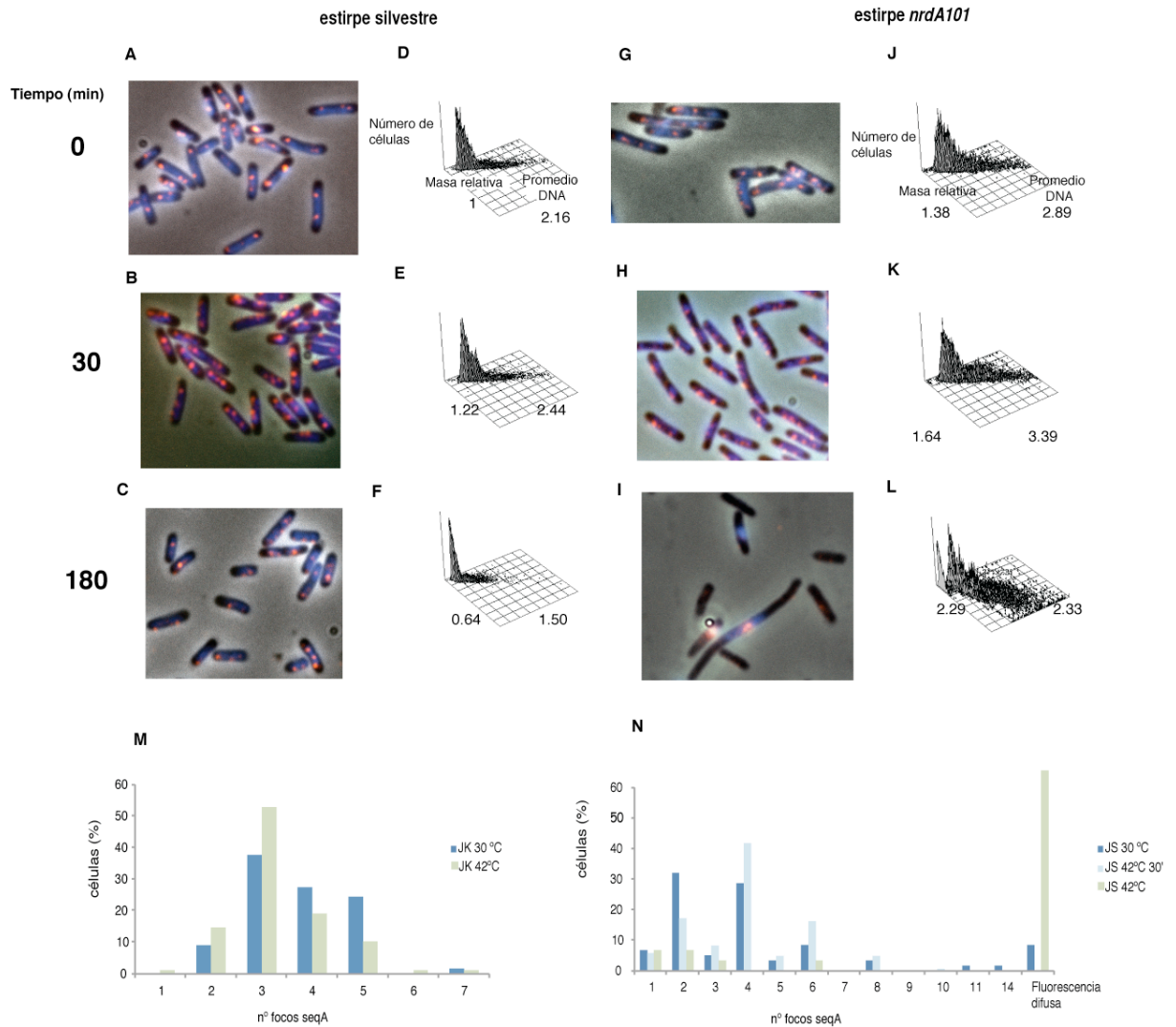


FIGURA 28. Inmunolocalización de la proteína SeqA de las estirpes JK607 (*nrdA+*) y JS1018 (*nrdA101*) (A, B y C y G, H, I respectivamente).

Análisis del número de focos de la proteína SeqA de ambas estirpes (N y M).

Distribución del contenido de DNA y masa por célula de las estirpes JK607 y JS1018 (D-F y J-L, respectivamente).

Las células se crecieron exponencialmente en glucosa con casaaminoácidos a 30°C ($\tau=70$ y 74 minutos, respectivamente) y las muestras se tomaron antes de iniciar el cambio a 42°C (A, D, G y J), tras 30 minutos (B, E, H y K) y 3 horas a 42°C (C, F, I y L).

Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína SeqA se marca con los anticuerpos anti-SeqA y anti-conejo-FITC (rojo).

El contenido de DNA y masa por célula se determinó a partir de las distribuciones de intensidad de fluorescencia de los fluoróforos Hoestch 33258 y FITC, respectivamente, obtenidas por citometría de flujo.

Las imágenes se tomaron con el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan.

Localización y organización de la maquinaria de replicación: subunidad τ de DNA pol III y helicasa DnaB

Resumen

Para entender como se organiza la maquinaria de replicación, se han estudiado dos proteínas del replisoma, la subunidad τ de la DNA polimerasa III y la helicasa DnaB. Ambas proteínas están localizadas en focos discretos en la célula y presentan una distribución ordenada similar a las horquillas de replicación durante la replicación cromosómica. En células creciendo lentamente, el número de puntos de replicación y los focos de estas proteínas apoyan la existencia de una organización dinámica de la maquinaria de replicación a lo largo del ciclo celular.

La relación espacial y numérica entre la proteína SeqA y las proteínas del replisoma sugieren la idea de un preensamblaje previo al comienzo de la replicación cromosómica.

Abstract

In order to understand the replication machinery organization, localization of two replisome proteins foci, the τ subunit of DNA polymerase III holoenzyme and DnaB helicase, have been studied. Both proteins are located in discrete foci and reflect an ordered distribution similar to that of the replication forks during DNA replication. The number of forks and those of these proteins in slowly growing bacteria, support a dynamic replication machinery model during the replication period.

The numerical and spatial relationship between replisome and SeqA suggests a preassembly of the required proteins near the midcell before replication initiates.

Capítulo 2 · Localización y organización de la maquinaria de replicación: subunidad τ de la DNA polimerasa III y helicasa DnaB

2.1. Localización y organización de la subunidad t de la DNA polimerasa III

En esta parte del trabajo, el objetivo ha sido analizar la localización y organización de la subunidad τ de la DNA polimerasa mediante la fusión del epítipo HA a su extremo carboxilo. La subunidad t de la DNA polimerasa III pertenece al complejo γ o complejo cargador de la abrazadera β de la holoenzima pol III al DNA y su función principal es el aumento de la procesividad de la DNA polimerasa III (Pritchard *et al.*, 2000).

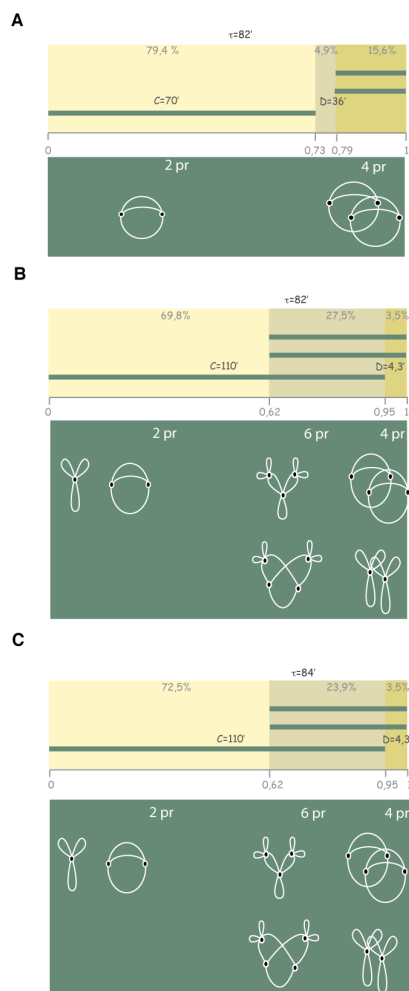
Considerando la organización dinámica de las horquillas de replicación detallada en el capítulo anterior elegimos estudiar la organización de la maquinaria de replicación en células creciendo lentamente, es decir, con menor solapamiento de rondas de replicación, para simplificar la interpretación de los resultados. En la figura 29.B se muestra el ciclo de la estirpe CMT936 (*dnaX::HA*, *nrdB::3xFLAG*) creciendo en medio mínimo con glicerol a 37°C. En estas condiciones esta estirpe tiene unos valores de τ , C y D de 82, 110 y 4,3 minutos. Estos datos implican un n de replicación de 1,34 lo que supone que durante un tercio del ciclo celular existen dos ciclos de replicación solapados que presentan hasta

seis puntos de replicación.

FIGURA 29. Ciclo celular de la estirpe CMT927 (CM735/pKD46) (A), CMT936 (*dnaX::HA, nrdB::3xFLAG*) (B) y CMT937 (*dnaX::HA, nrdB::3xFLAG*) (C).

El valor de τ se determinó por densidad óptica y los valores C y D a partir de la citometría de cultivos exponenciales y tratados con rifampicina y cefalexina.

En la parte inferior de cada figura aparece el número de puntos de replicación esperado y un diagrama esquemático de posibles modelos de organización del replisoma.



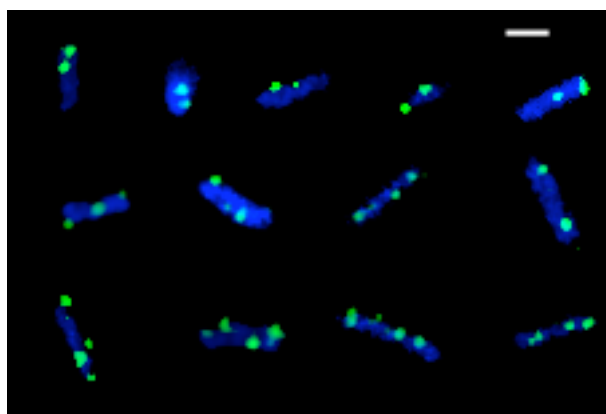
El análisis de la subunidad τ mediante microscopía de inmunofluorescencia (Fig. 30) muestra a esta proteína localizada en focos discretos y no se observó ninguna célula con fluorescencia difusa. Las células en las que τ no llevaba el epítipo HA no presentaron fluorescencia.

FIGURA 30. Inmunolocalización de la subunidad τ de la DNA polimerasa III en células de un cultivo exponencial de la estirpe CMT936 (*dnaX::HA, nrdB::3xFLAG*) de *E.coli* creciendo en glicerol a 37°C.

Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína DnaX se marcó con los anticuerpos anti-HA y anti-ratón-FITC (verde).

El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).



Para obtener información sobre la localización subcelular de la subunidad τ , analizamos las posiciones relativas de los focos de esta estirpe creciendo exponencialmente (Fig. 31).

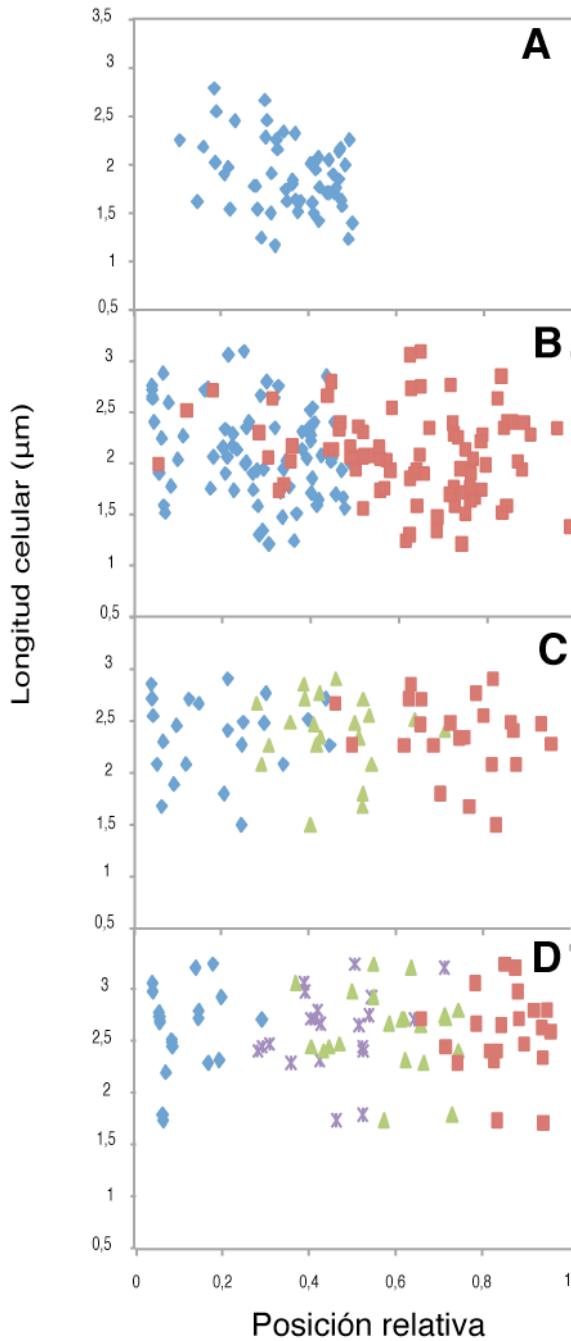


FIGURA 31. Posiciones subcelulares de los focos de la subunidad τ de la DNA polimerasa III en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.

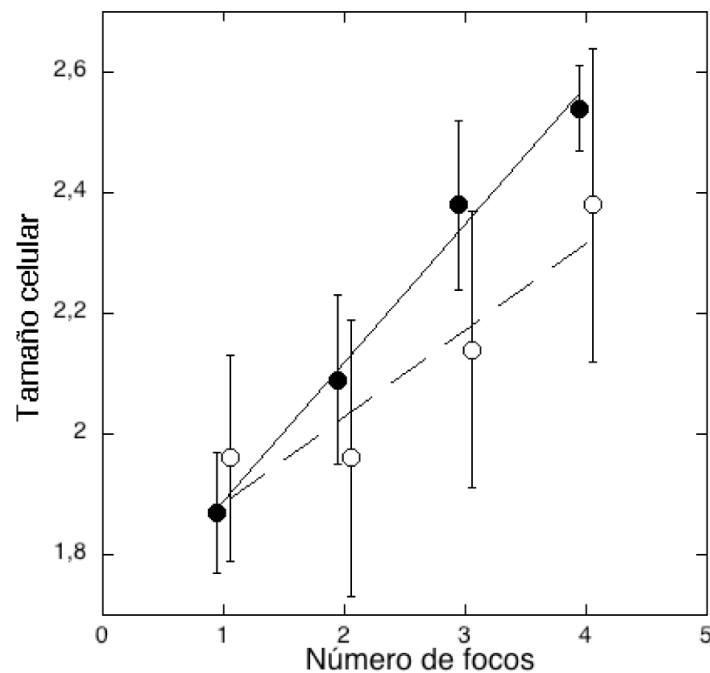
El número de células analizadas fue de 190. El 3,2% de las células presentaban 0 focos, el 29,5% con 1 foco (A), el 42,63% presentaban 2 focos (B), el 12,10% 3 focos (C), el 11,1% 4 focos (D) y el 1,57% tenían 5 focos.

En el cultivo analizado se observó una correlación positiva entre el número de focos y el tamaño celular (Fig. 32), como cabría esperar dado que el ciclo de esta bacteria implica

dos puntos de replicación al inicio del ciclo y seis y cuatro puntos en las etapas finales del ciclo. En las células más cortas, con un único foco, éste se encuentra preferentemente cerca del punto medio de la célula (posición relativa $0,35 \pm 0,1$). En las células con dos focos éstos se sitúan a ambos lados del centro celular, desplazados desde el centro a las posiciones $1/4$ y $3/4$ (posiciones relativas $0,28 \pm 0,14$ y $0,63 \pm 0,19$ respectivamente). Cuando las células tienen tres focos, uno de ellos está situado cercano a la posición $1/4$ (posición relativa $0,19 \pm 0,14$), el segundo al punto medio ($0,46 \pm 0,11$) y el tercero a la posición $3/4$ ($0,74 \pm 0,13$). Las células con 4 focos presentan una distribución en valores relativos $0,10 \pm 0,07$, $0,40 \pm 0,12$, $0,59 \pm 0,12$, y $0,85 \pm 0,08$ que correspondería con una distribución ordenada en las posiciones aproximadas de $1/8$, $3/8$, $5/8$ y $7/8$.

FIGURA 32. Longitud celular promedio de células con 1, 2, 3 y 4 focos de la subunidad τ de la DNA polimerasa III (A) y de la helicasa DnaB (B) en cultivos creciendo en glicerol a 37°C .

Los círculos rellenos representan los valores de la subunidad τ de la DNA polimerasa III y los círculos vacíos los de la helicasa DnaB



Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo con la proteína SeqA, así como a los obtenidos por Onogi *et al.* cuando estudian la localización subcelular de los focos de la subunidad β de la DNA polimerasa (Onogi *et al.*, 2002).

Dado que el crecimiento de la longitud celular en una población bacteriana es exponencial durante el ciclo entero (Koppes *et al.*, 1978; Koppes y Nanninga, 1980; Trueba y Koppes, 1998), la longitud celular media podría ser usada para determinar la edad de la célula y analizar la evolución de los focos a lo largo del ciclo celular (Fig. 33). Aunque la longitud celular no da una medida precisa de la edad celular, se ha observado una buena correlación (Reyes-Lamothe *et al.*, 2008). Las células más pequeñas tienen mayoritariamente 1 y 2 focos por célula que podrían corresponder a las que acaban de nacer y los dos replisomas hermanos están unidos (1 foco) o se han separado (2 focos) (Fig. 33.A). Similar situación aparece en las células de mayor longitud que tienen, predominantemente, 2, 3 y 4 focos. Éstos corresponderían a células que se encuentran en el periodo *D*, han acabado el primer ciclo de replicación, y el segundo continúa funcionando. De esta forma, existirían dos cromosomas cada uno con dos replisomas hermanos localizados en la misma posición celular (1 foco por cada cromosoma), un cromosoma con los dos replisomas unidos y el otro cromosoma con los replisomas separados (tres focos por célula) y células con dos cromosomas con los replisomas separados (4 focos por célula) (Fig. 33 A).

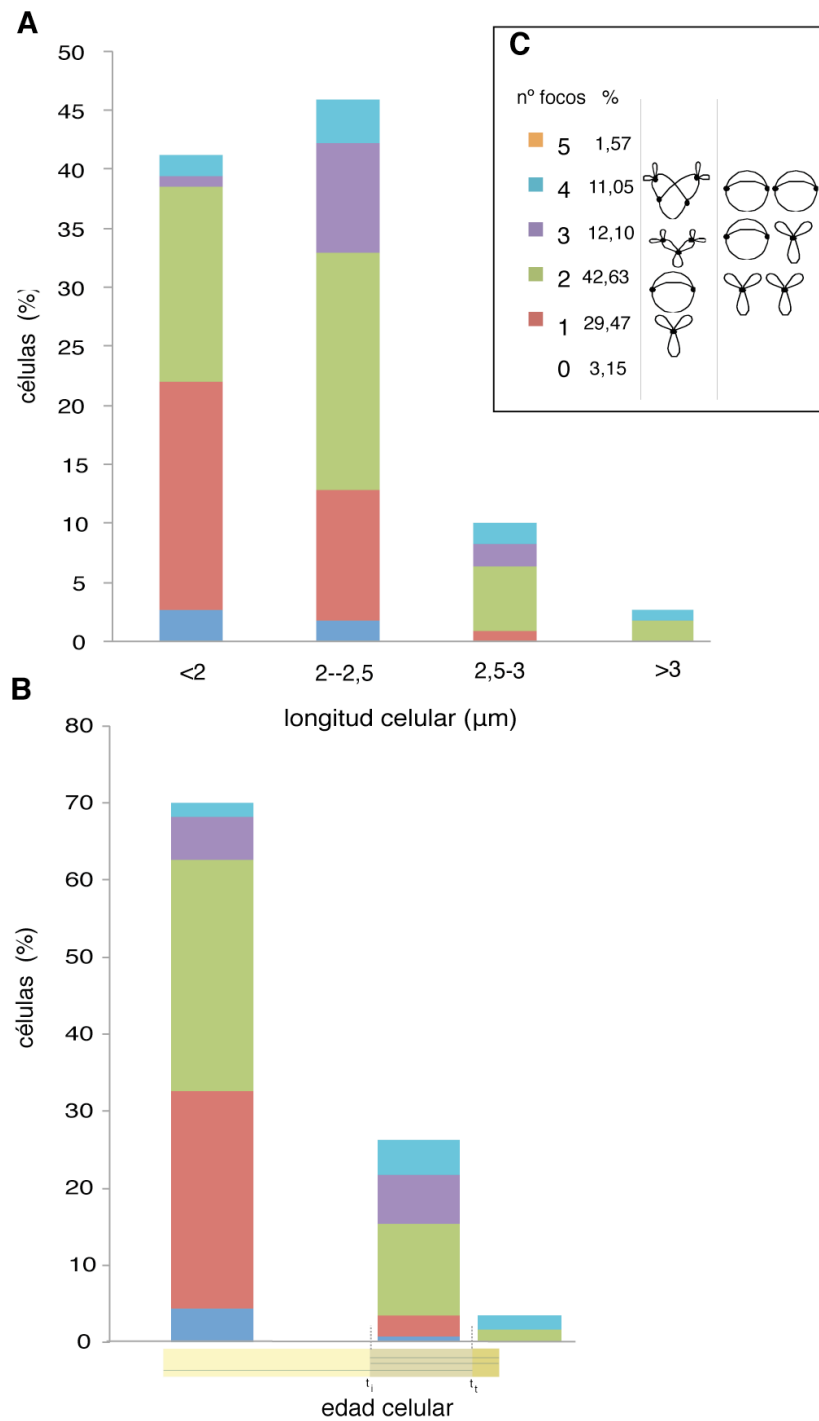
Para analizar cómo evoluciona el número de focos de DnaX con el ciclo celular, el análisis del número de focos se hizo agrupando las células en tres intervalos determinados por las edades de inicio y terminación de la replicación. De esta manera se esperarían tres clases de células con diferentes números de puntos de replicación. Según los datos del ciclo, debería haber un 69,8% de células con 2 puntos de replicación, 26,6% con 6 puntos de replicación y 3,5% con 4 puntos de replicación (Fig. 29). Asumiendo la longitud celular como un equivalente de la edad celular, agrupamos las células de menor tamaño que suman el 69,8% del cultivo, las siguientes en tamaño hasta alcanzar el 26,6% y las mayores corresponderían con el 3,5%. Los datos observados (Fig. 33 B) muestran que las células con dos puntos de replicación tienen, preferentemente, 1 y 2 focos de DnaX (los replisomas hermanos unidos o separados, respectivamente); las de 6 puntos de replicación muestran mayoritariamente 2, 3 y 4 focos en las que dos ciclos de replicación se encuentran solapados (existen en el mismo cromosoma replisomas hermanos unidos y separados) y las de 4 puntos de replicación al final del ciclo tienen 2 y 4 focos que se interpretan como dos cromosomas con sus dos focos unidos o separados. Estos resultados muestran una correlación entre el número de

puntos de replicación y los focos de la proteína DnaX que tiene importantes consecuencias para deducir el estado de asociación de la maquinaria de replicación a lo largo del ciclo celular que será discutido más adelante.

FIGURA 33. Distribución de la subunidad τ de la DNA polimerasa III en función de la longitud celular (A) y de los grupos de células en distintas fases del ciclo (B).

En el panel C se muestra el porcentaje de células con diferente número de focos y un diagrama esquemático de la posible localización de los replisomas al principio y final del ciclo celular.

t_i es el momento en que se inicia la replicación y t_f cuando finaliza la replicación en cada ciclo celular.



2.2. Localización y organización de la helicasa DnaB

La helicasa DnaB es la enzima encargada de abrir la doble hélice y forma parte del replisoma uniéndose a él mediante la subunidad τ (Kim *et al.*, 1996).

El objetivo del trabajo presentado en este apartado ha sido el estudio de la localización y organización de la helicasa DnaB mediante la fusión y detección del epítipo HA. El análisis del ciclo celular de la bacteria CMT935 (*dnaB::HA*, *nrdB::3xFLAG*), creciendo en medio mínimo con glicerol a 37°C, mostró un tiempo de generación de 84 minutos y unos valores de *C* y *D* de 110 y 4,3 minutos (Fig. 29.C) y un valor de *n* de 1,30. Según estos datos la población de bacterias creciendo exponencialmente tendrá un 72,5% de células con 2 puntos de replicación, 23,9% con 6 puntos y 3,5% con 4 puntos. Esta estirpe presenta un ciclo celular muy parecido al de la estirpe CMT936, utilizada para estudiar la subunidad *t*, que comparados con los 79 minutos del periodo *C* de la estirpe parental CM735 (Fig. 29), indican que las inserciones en *dnaX* o *dnaB* causan un enlentecimiento de la velocidad de replicación que afectan por igual a ambas estirpes.

La observación de la proteína DnaB mediante microscopía de inmunofluorescencia (Fig. 34) muestra que esta proteína está localizada en focos discretos y no se observó ninguna célula con fluorescencia difusa. Las células que no contenían el epítipo HA no presentaron fluorescencia.

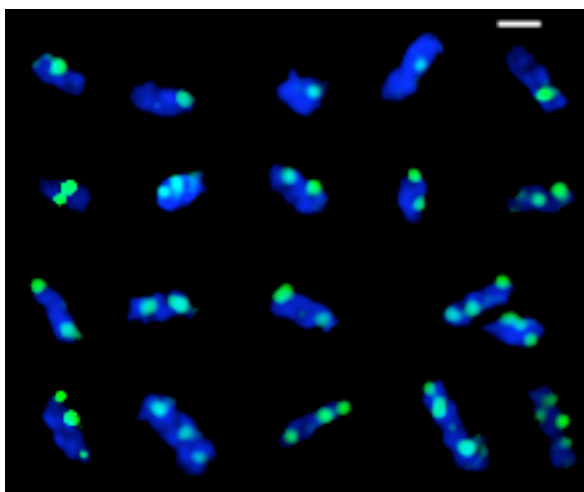


FIGURA 34. Inmunolocalización de la helicasa DnaB en células de un cultivo exponencial de la estirpe CMT935 (*dnaB::HA nrdB::3xFLAG*) de *E.coli* creciendo en glicerol a 37°C.

Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína DnaB se marcó con los anticuerpos anti-HA y anti-ratón-FITC (verde).

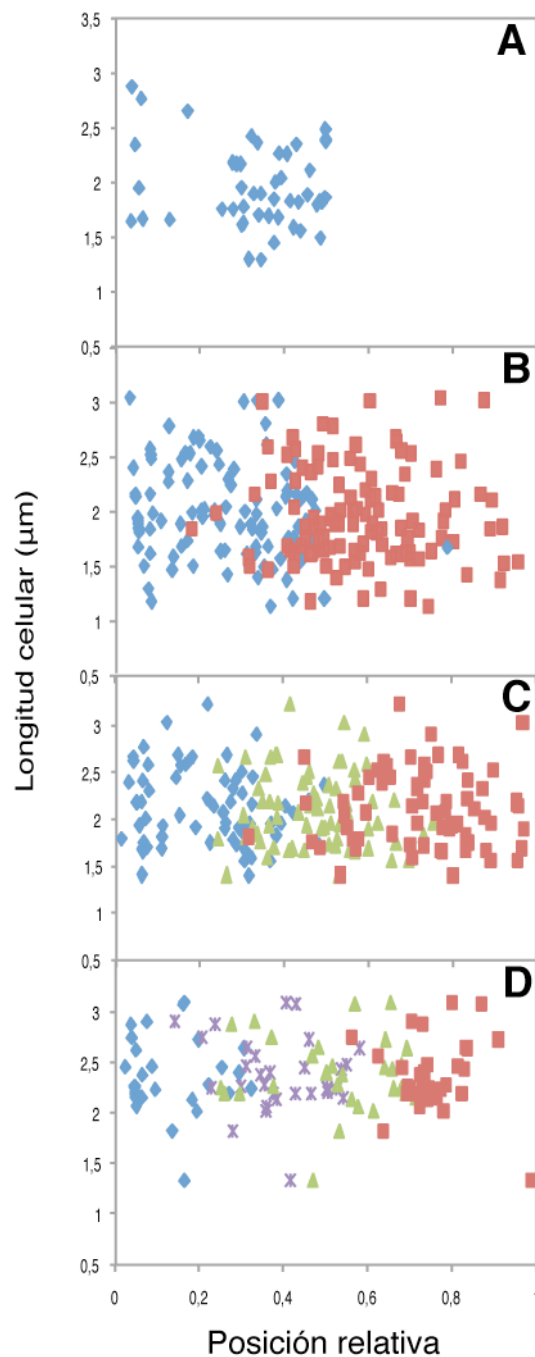
El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).

La localización subcelular de la proteína DnaB se estudió mediante el análisis de las posiciones relativas de los focos en cultivos de la estirpe CMT935 creciendo exponencialmente en medio mínimo con glicerol a 37°C (Fig. 35). El número de focos por célula muestra una correlación positiva con la longitud celular de forma similar a como lo hace la proteína DnaX (Fig. 32).

FIGURA 35. Posiciones subcelulares de los focos de la helicasa DnaB en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.

El número de células analizadas fue 270. El 0,7% de las células presentaban 0 focos, el 17,8% con 1 foco (A), el 42,2% presentaban 2 focos (B), el 26,7% 3 focos (C), el 11,5% 4 focos (D) y el 1,57% tenían 5 focos.



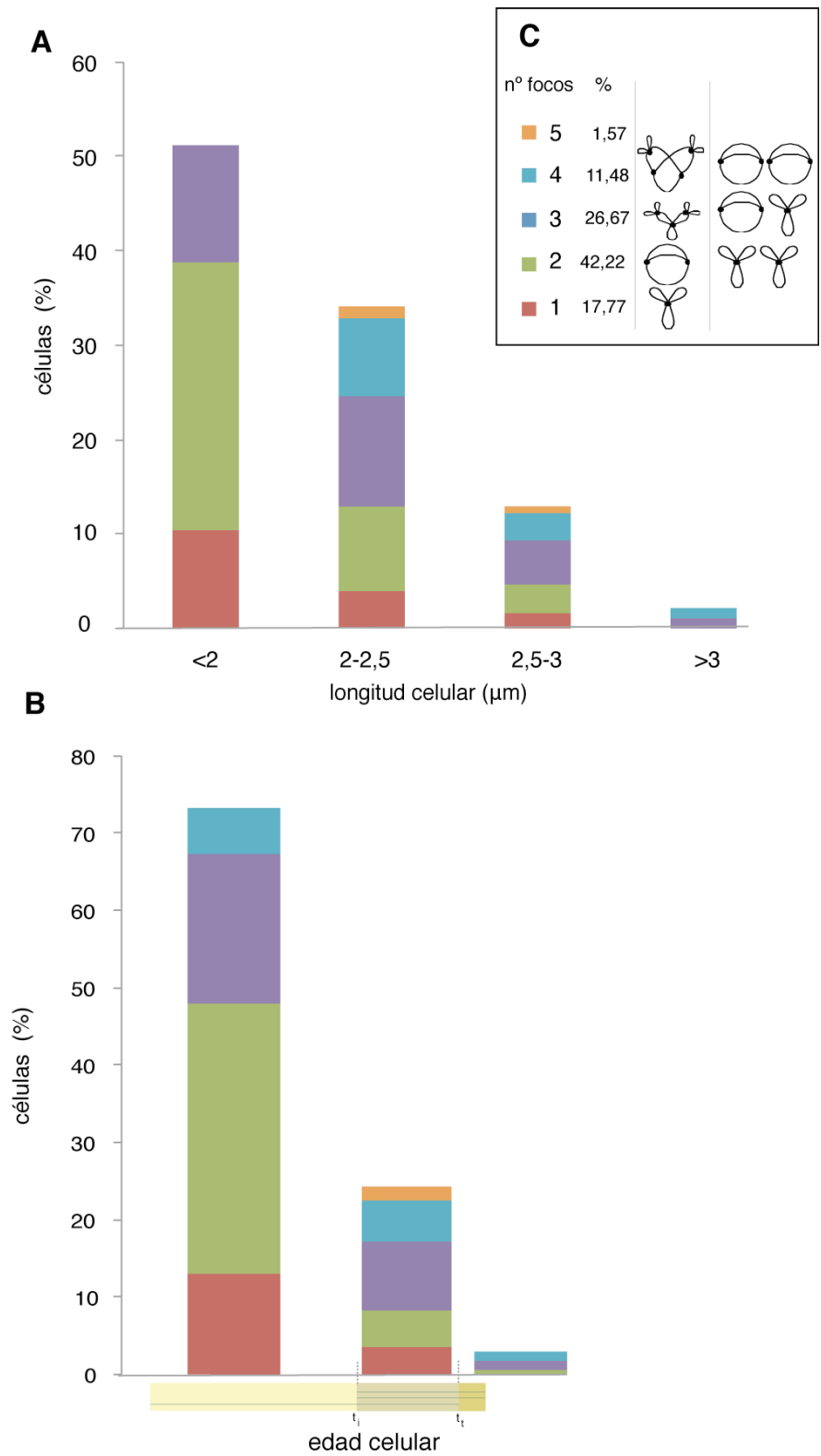
Las células con un foco, localizado preferentemente en posición central, presentan una longitud media de $1,96 \pm 0,27$ μm ; las células con dos focos, con una longitud media de $1,96 \pm 0,33$ μm , muestran a éstos situados a ambos lados del centro celular, posicionados, aproximadamente, en $1/4$ y $3/4$ de la célula ($0,25 \pm 0,15$ y $0,59 \pm 0,15$). En las células con tres focos, uno de ellos está situado cercano a la posición $1/4$ ($0,20 \pm 0,13$), el segundo en el centro ($0,48 \pm 0,12$) y el tercero en la posición $3/4$ ($0,73 \pm 0,14$) con una longitud celular media de $2,14 \pm 0,33$ μm . Las células con 4 focos tienen una longitud promedio de $2,38 \pm 0,36$ μm y se localizan en las posiciones relativas $0,12 \pm 0,09$, $0,39 \pm 0,11$, $0,54 \pm 0,15$ y $0,76 \pm 0,08$, que corresponderían con una distribución ordenada en las posiciones $1/8$, $3/8$, $5/8$ y $7/8$.

El análisis del número de focos en función del tamaño celular (Fig. 36.A) y del número de células en cada uno de los tres estadios del ciclo celular (Fig. 36.B) presentó una distribución similar a la de la proteína DnaX. Estos resultados indican que la helicasa DnaB, igual que la subunidad t, se asocia en focos que se distribuyen en la célula de manera similar a como lo hacen las horquillas de replicación durante la replicación cromosómica.

FIGURA 36. Distribución de la helicasa DnaB en función de la longitud celular (A) y de los grupos de células en distintas fases del ciclo (B).

En el panel C se muestra el porcentaje de células con diferente número de focos y un diagrama esquemático de la posible localización de los replisomas al principio y final del ciclo celular.

t_i es el momento en que se inicia la replicación y t_f cuando finaliza la replicación en cada ciclo celular.



2.3. Comparación de las proteínas DnaX y DnaB con la proteína SeqA

Para observar la relación que existe entre las proteínas de la maquinaria de replicación, DnaX y DnaB, y la proteína SeqA, marcamos las proteínas DnaX y DnaB con un fluoróforo diferente al empleado para SeqA y comparamos el número de focos obtenido de ambas proteínas (Fig. 37 y 38). El análisis del número de focos de SeqA relativo al de ambas proteínas del replisoma mostró un patrón similar. Aproximadamente la mitad de las células tienen el mismo número de focos SeqA que de DnaX o de DnaB, 57% y 41%, respectivamente, mientras que el resto de las células tienen menos focos SeqA que de proteínas del replisoma.

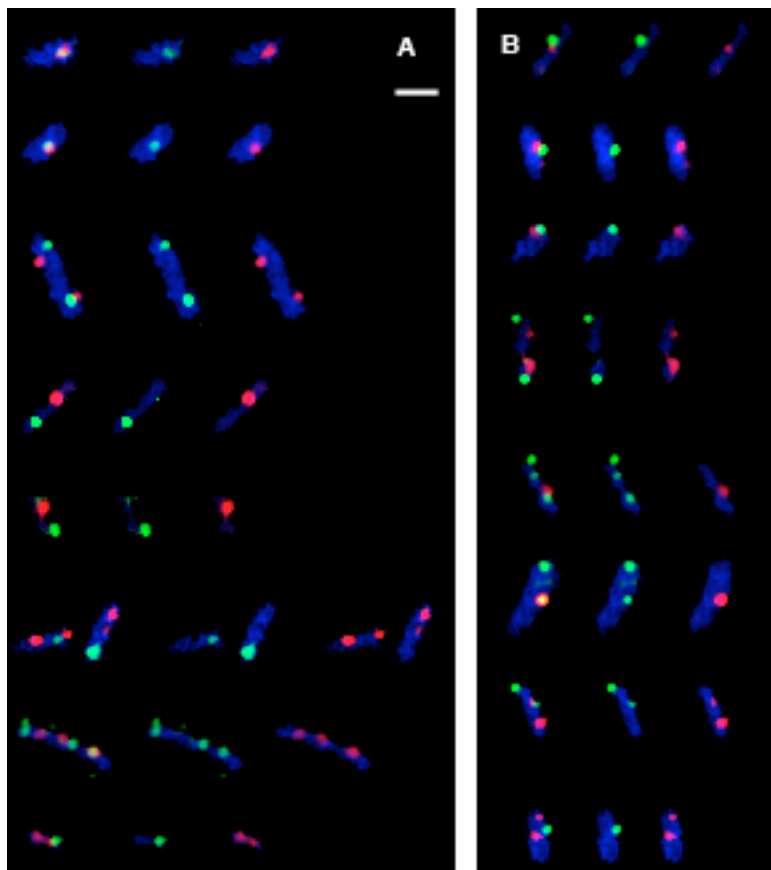


FIGURA 37. Doble inmunolocalización de la proteína SeqA con la subunidad τ de la DNA polimerasa III (A) y con la helicasa DnaB (B) en células de *E. coli* creciendo en glicerol.

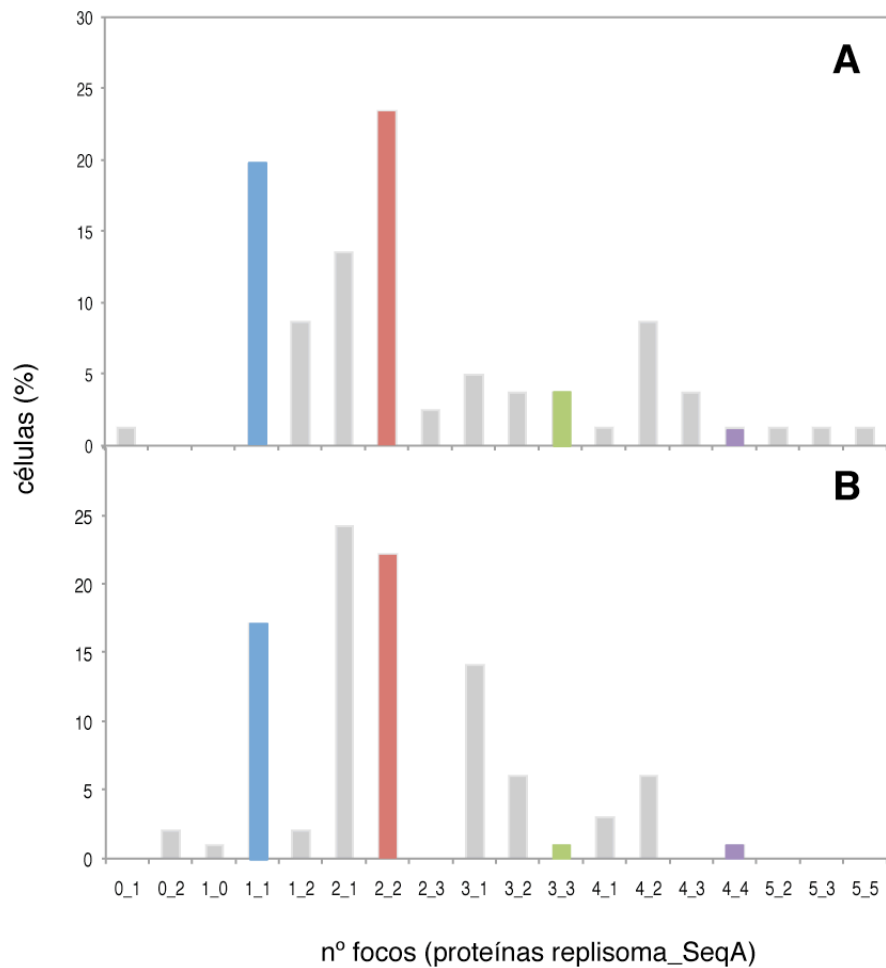
Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína DnaX y DnaB se marcan con los anticuerpos anti-HA y anti-ratón Alexa 488 (verde) y la proteína SeqA con el anticuerpo anti-SeqA y anti-conejo Alexa 594 (rojo).

El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).

FIGURA 38. Análisis comparativo del número de focos de la proteína SeqA con las proteínas DnaX (A) y DnaB (B).

En el eje de abscisas aparecen las posibles combinaciones de los focos DnaX o DnaB y



Dado que las proteínas DnaX y DnaB están marcadas con el mismo epítipo no podemos estudiarlas de forma conjunta en la misma célula, pero podemos comparar los distintos tipos de células obtenidas al estudiar ambas proteínas por separado. En la figura 39 se observa que los porcentajes de células con el mismo número de focos son similares para ambas proteínas, confirmando que representan la misma estructura. Los porcentajes de células son diferentes cuando las comparamos con las células marcadas con SeqA. En esta ocasión aparecen más células con 1 foco de SeqA que células con un foco de DnaB o DnaX, lo contrario ocurre cuando consideramos células con 3 y 4 focos.

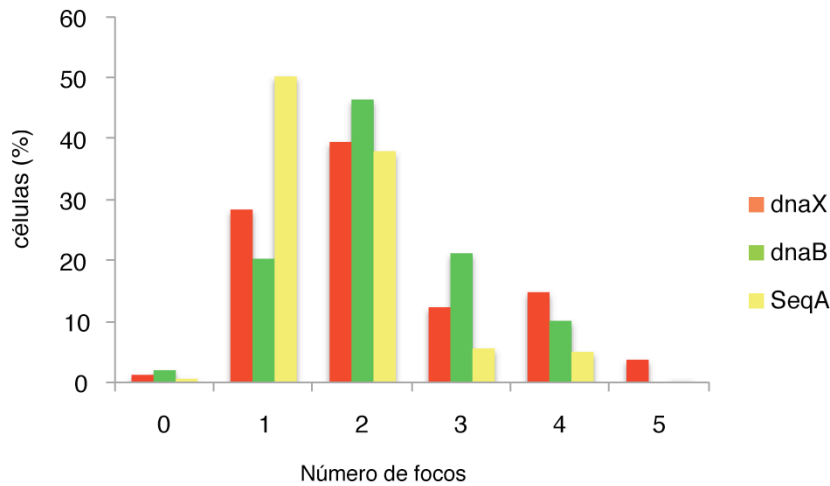
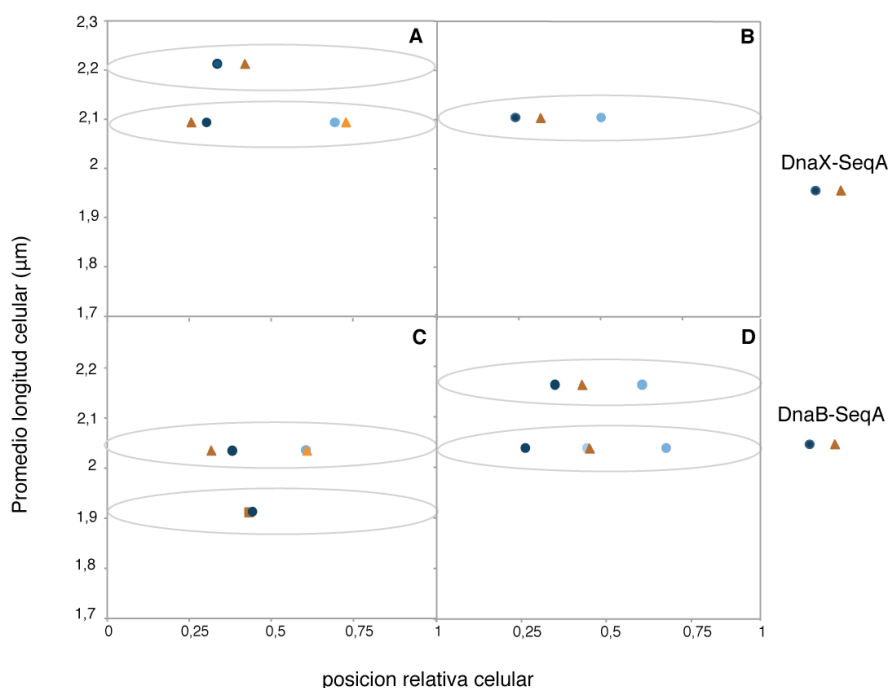


FIGURA 39. Comparación del porcentaje de células con 1, 2, 3 y 4 focos de la subunidad τ , de la helicasa DnaB y de la proteína SeqA en cultivos creciendo en glicerol a 37 °C.

Para conocer si los focos SeqA coinciden con las horquillas de replicación o son sólo indicativos de horquillas de replicación activas (Adachi *et al.*, 2005; Brendler *et al.*, 2000; Molina y Skarstad, 2004; Onogi *et al.*, 1999) estudiamos, en primer lugar, la relación espacial entre la proteína SeqA y las proteínas de la maquinaria de replicación, DnaX y DnaB, analizando las posiciones relativas de cada proteína en la misma célula. La figura 40 representa los promedios de dichas distancias para las células que presentan el mismo número de focos de SeqA que de DnaX y DnaB (Fig. 40.B y D, respectivamente) y para aquellas con menor número de focos SeqA que de DnaX y DnaB (Fig. 40.B y D, respectivamente). Los resultados muestran que cuando existe el mismo número de focos DnaX o DnaB que de SeqA, éstos se encuentran próximos. Cuando hay un foco SeqA y dos de DnaB o de DnaX, estos últimos están situados en las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ y el foco SeqA próximo a uno de ellos. De manera que existe un foco “extra” correspondiente a las proteínas de la maquinaria de replicación que podría corresponder a un preensamblaje de ésta en la zona donde se va a producir el inicio de la replicación.

FIGURA 40. Distribución espacial comparativa de la proteína SeqA frente a la subunidad τ de la DNA polimerasa III (con el mismo y diferente número de focos, A y B respectivamente) y a la DnaB helicasa (con el mismo y diferente número de focos, C y D respectivamente) en cultivos creciendo en medio mínimo con glicerol a 37°C.

Los círculos representan a la proteína DnaX (A y B) o DnaB (C y D) y los triángulos representan los focos SeqA con diferentes tonalidades cuando hay más de un foco. A y C muestran dos tipos de células con 1 y 2 focos de DnaX y SeqA y DnaB y SeqA, respectivamente. B y D representan células con distinto número de focos: en B 2 focos de DnaX con 1 foco de SeqA y en D dos tipos de células, una con 2 focos DnaB y 1 SeqA y otra con 3 focos DnaB y 1 SeqA.



Con objeto de analizar la proximidad de los focos, analizamos la distancia que los separa (distancia interfocal) en células que poseen el mismo número de focos de SeqA que de focos de DnaX y DnaB (Fig. 41 A y B respectivamente). Este análisis muestra que el 80% de los focos SeqA se localizan a una distancia menor de 0,27 μm (diámetro de un foco) de los focos de DnaX o de DnaB, lo que implica colocalización de la maquinaria de replicación y de las horquillas de replicación, a diferencia de lo que proponen otros autores que encuentran un porcentaje de colocalización del 10% entre las proteínas DnaB y SeqA (den Blaauwen *et al.*, 2006).

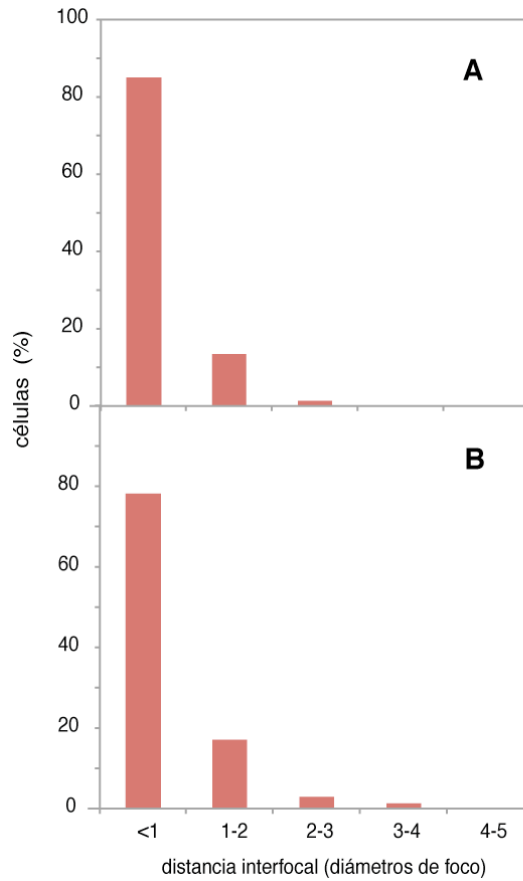


FIGURA 41. Análisis de la colocalización entre la proteína SeqA y las proteínas de la maquinaria de replicación, DnaX (A) y DnaB (B).

En el eje de abscisas aparece la distancia interfocal en diámetros de focos, siendo el diámetro medio de un foco $0,27 \mu\text{m}$.

Localización y organización de la RNR de *E.coli*

Resumen

Numerosas evidencias apoyan la idea de que la proteína RNR, que forma parte del complejo de síntesis de nucleótidos, está asociada a la maquinaria de replicación, pero nadie había encontrado pruebas directas de su localización subcelular en *E.coli*. El objetivo de este capítulo fue el estudio subcelular de dicha proteína mediante técnicas de inmunomicroscopía, así como analizar su relación con la maquinaria de replicación.

Las imágenes de inmunofluorescencia muestran que la subunidad R2 de la RNR forma focos discretos en la célula, que son dependientes de la replicación activa y que dichos focos están relacionados con los puntos de replicación de una forma dependiente del tipo de ciclo celular.

El análisis conjunto de las proteínas del replisoma y la proteína RNR indica que la mayoría de las células presentan el mismo número de focos con un alto porcentaje de colocalización entre ellos.

Estos resultados apoyan la organización de una estructura de orden superior, denominada hiperestructura de replicación, donde el complejo de síntesis de dNTP y el replisoma deben estar estrechamente asociados.

Abstract

A lot of previous evidences support the idea of a physical association between RNR protein and the replisome, but until now direct evidences have not been obtained of this association or close localization in *E. coli*. The aim of this chapter was the subcellular localization of this protein by immunomicroscopy to study its relationship with replication machinery.

The images show the R2 subunit of RNR protein in discrete foci, which are dependent on active replicating chromosome and replication pattern or the kind of cell cycle.

The analysis of fluorescent foci indicate that most of the cells have the same number of RNR foci as replication protein foci, and that the cells, which contain the same number of both kind of foci, show a high degree of colocalization.

These results support the organization of a high order structure, called replication hyperstructure, where the dNTP synthesis complex and the replisome should be closely related.

Capítulo 3 · Localización y organización de la ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) de *E. coli*

3.1. RNR está localizada en focos discretos que dependen de la replicación cromosómica

Aunque existen evidencias que apoyan la idea de que la RNR se encuentra asociada al complejo de síntesis de dNTP y que este complejo debe estar asociado a la maquinaria de replicación, hasta ahora nadie ha encontrado pruebas directas de su localización subcelular en *E. coli*. Varios autores han intentado localizar el complejo de síntesis de dNTP mediante el uso de anticuerpos específicos frente a la TMP sintetasa (den Blaauwen *et al.*, 2006) o utilizando proteínas de fusión de GFP con NrdB para localizar a la RNR (Watt *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos llevaron a la idea de que dichas proteínas están distribuidas por toda la célula sin formar ningún foco visible al microscopio.

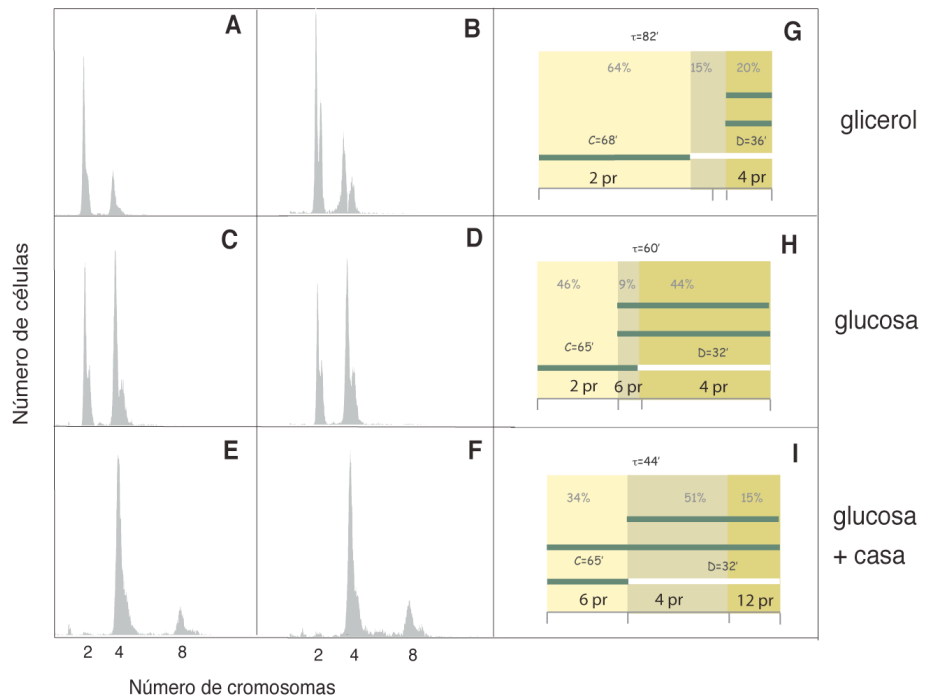
El objetivo de este apartado ha sido el estudio de la localización y organización de esta enzima, así como su relación con la maquinaria de replicación. Una vez estudiada la organización de la maquinaria y las horquillas de replicación, nuestro estudio se centra en el análisis de su relación con la enzima RNR.

En este trabajo hemos localizado a la proteína RNR mediante la unión del epítipo 3xFLAG al polipéptido NrdB y el uso de un anticuerpo específico para este antígeno. Los parámetros del ciclo celular de las estirpes CMT927, sin el epítipo, y CMT931 (*nrdB::3xFLAG*), con el epítipo 3xFLAG, creciendo en medio mínimo M9 con glicerol, glucosa o glucosa con casaminoácidos se obtuvieron de cultivos exponenciales y tratados con rifampicina y cefalexina, a partir del contenido de DNA/célula obtenido por citometría de flujo. Los histogramas de las estirpes CMT927 y CMT931 se mostraron muy similares en cada uno de los medios de cultivo utilizados (Fig. 42), lo que indica que la inserción del epítipo 3xFLAG en NrdB no afecta al ciclo celular.

FIGURA 42. Histogramas de DNA de cultivos tratados con rifampicina y cefalexina de la estirpe CMT927 (A, C y E) y de la estirpe CMT931 (B, D y F) creciendo en glicerol, medio mínimo con glucosa o glucosa con casaaminoácidos, respectivamente.

Ciclo celular de la estirpe CMT927 y CMT931 (*nrdB::3xFLAG*) creciendo en glicerol, medio mínimo con glucosa o glucosa con casaaminoácidos (A-C).

El valor de τ se determinó por densidad óptica y los valores C y D a partir de la citometría de cultivos exponenciales y tratados con rifampicina y cefalexina.



El análisis de la microscopía de fluorescencia mostró la presencia de focos discretos en las células crecidas en los tres medios de cultivo y, en ningún caso, se observó fluorescencia difusa (Fig. 43).

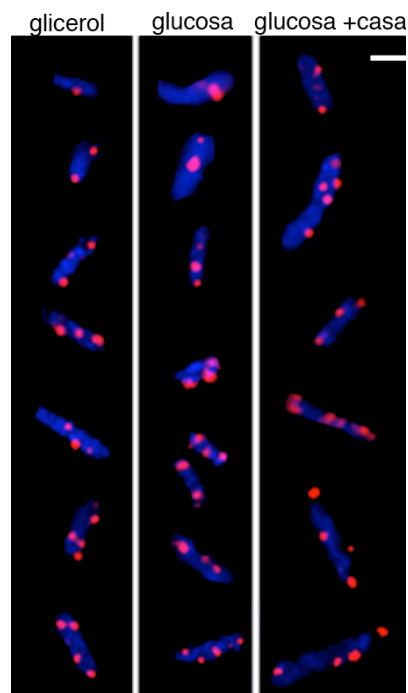


FIGURA 43. Inmunolocalización de la subunidad B2 de la proteína NrdB en células de *E. coli* creciendo en glicerol (A), glucosa (B) o glucosa con casaaminoácidos (C).

Las células se tiñeron con Hoestch (azul) para localizar los nucleoides. La proteína NrdB se marca con el anticuerpo 3XFLAG-Cy3 (rojo).

El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).

El recuento del número de focos se realizó en células creciendo en glicerol, glucosa y glucosa suplementada con casaminoácidos y sus medias se compararon con el número de puntos de replicación estimados por citometría de flujo (Fig. 44.A). El número medio de focos de NrdB aumenta a medida que se incrementa la velocidad de crecimiento. Esto indica que los focos de NrdB están, probablemente, asociados con los puntos de replicación activos.

El número de medio de focos por célula es similar al número de horquillas en células creciendo en medio mínimo con glicerol. Por el contrario, el número de focos por célula es más bajo que el número de horquillas en medios con velocidades de crecimiento superiores. Dado que las células creciendo en diferentes medios de cultivo presentan distintos tipos de ciclos celulares (Fig. 42), analizamos cómo varían el número de focos y las horquillas de replicación a lo largo del ciclo celular en medios lentos y rápidos, para ello asumimos que la longitud celular es un indicativo de la edad celular. En medio con glicerol, la media de las longitudes de las células con 1 y 2 focos son similares y ambas corresponderían al momento del ciclo celular en el que se estiman 2 puntos de replicación. Las células con 3 y 4 focos tienen también tamaños similares y coinciden con la etapa del ciclo en el que se estiman 4 puntos de replicación (Fig. 44.B). En las células con mayor velocidad de crecimiento se observó una mayor discrepancia entre el número de focos y el de puntos de replicación estimados (Fig. 44.C).

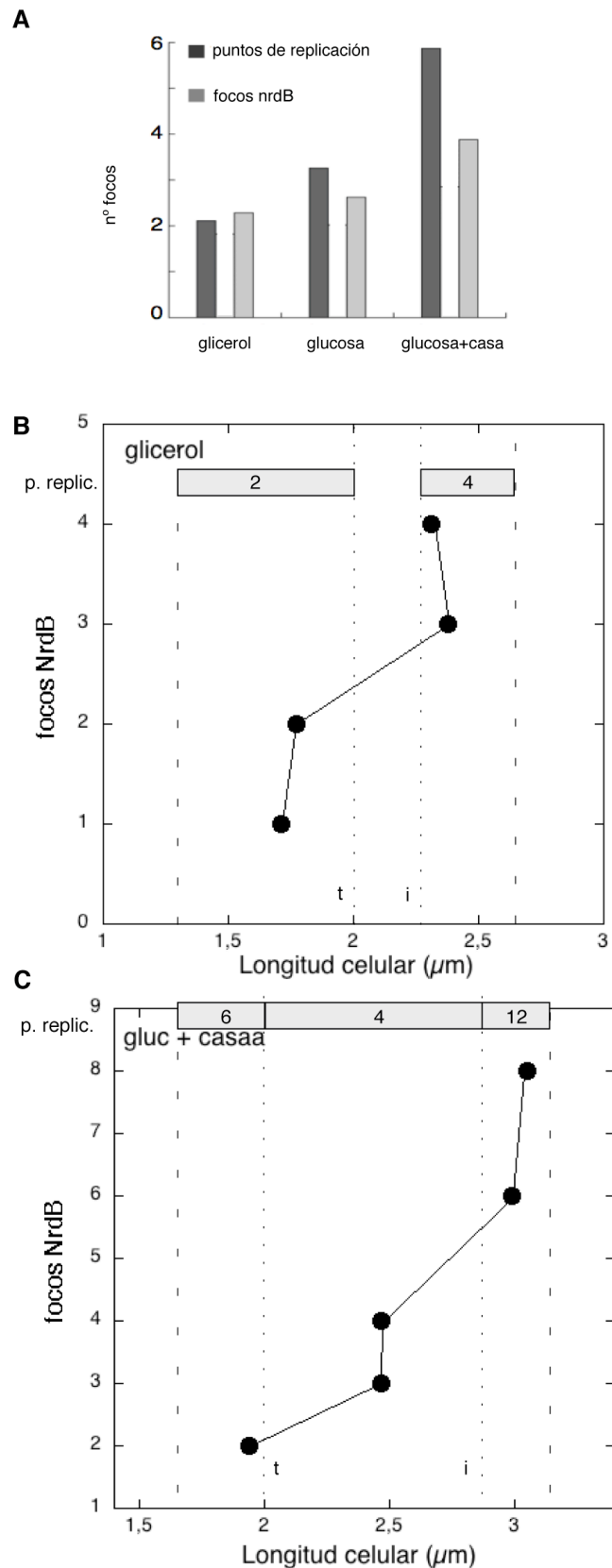
Estos resultados indican que, en células creciendo lentamente, la mayoría tienen el mismo número de focos de NrdB y, consecuentemente, de complejos de síntesis de dNTP, que de horquillas de replicación. En medios de crecimiento más ricos, las células muestran un número de focos de NrdB más bajo (un promedio de 4 focos en lugar de 6) que el número de puntos de replicación que pueden ser explicados por la agregación de los complejos, como ocurre con los focos de SeqA explicado en el capítulo 1. Estos resultados apoyan la idea de una organización dinámica no sólo de las horquillas de replicación, sino también de los complejos de síntesis de dNTP.

FIGURA 44. Focos de NrdB y puntos de replicación en células creciendo en diferentes medios.

(A) Número medio de puntos de replicación y de focos NrdB por célula en la estirpe CMT931 en células creciendo en medio mínimo con glicerol, glucosa o glucosa con casaaminoácidos.

(B) Número de focos de RNR relativo al tamaño celular en CMT931 creciendo exponencialmente en glicerol o en glucosa con casaminoácidos (C).

t: terminación de la replicación cromosómica;
i: inicio de la replicación cromosómica.



Dada la alta similitud entre el número de focos y el de puntos de

replicación en los cultivos más lentos, el trabajo posterior se llevó a cabo en células creciendo en medio mínimo con glicerol.

Para evaluar si la organización de la RNR, determinada por la presencia de los focos de NrdB, es dependiente de la replicación activa y, por consiguiente, desaparece cuando se termina la replicación, se determinó el número de dichos focos tras la finalización de la replicación en células sincronizadas. Un cultivo exponencial de la estirpe CMT934 (*dnaC2 nrdB::3xFLAG*) creciendo en glicerol a 30°C se incubó a temperatura no permisiva (42°C) durante 60 minutos para inhibir nuevas iniciaciones y permitir que se completasen las rondas de replicación en marcha. El cultivo se transfirió posteriormente a 30°C, para permitir el inicio de la replicación, y después de 6 min se pasó, de nuevo, a 42°C para inhibir nuevas rondas de replicación. La síntesis de DNA indica que bajo estas condiciones sólo se inició una ronda de replicación y que la replicación termina tras unos 40 a 50 minutos (Fig. 45.A). La determinación del número de focos de NrdB muestra que, tras 6 minutos a 30°C aparecen rápidamente los focos de NrdB con el 40% de células con 1 foco y otro 40% de células con 2 focos. Al avanzar la replicación disminuye el número de células con focos NrdB mientras aumenta el de células sin focos (Fig. 45.B). De estos resultados podemos concluir que la aparición de los focos NrdB depende de la replicación cromosómica en funcionamiento y que la mayoría de estos focos desaparecen cuando se termina la replicación del DNA.

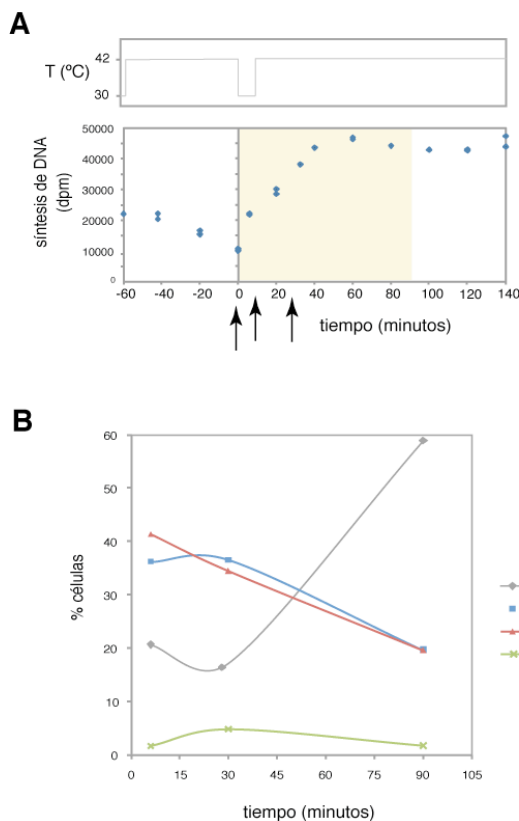


FIGURA 45. Estudio de la proteína NrdB en células sincronizadas.

(A) Síntesis relativa de la estirpe CMT934 (*dnaC2 nrdB::3xFLAG*).

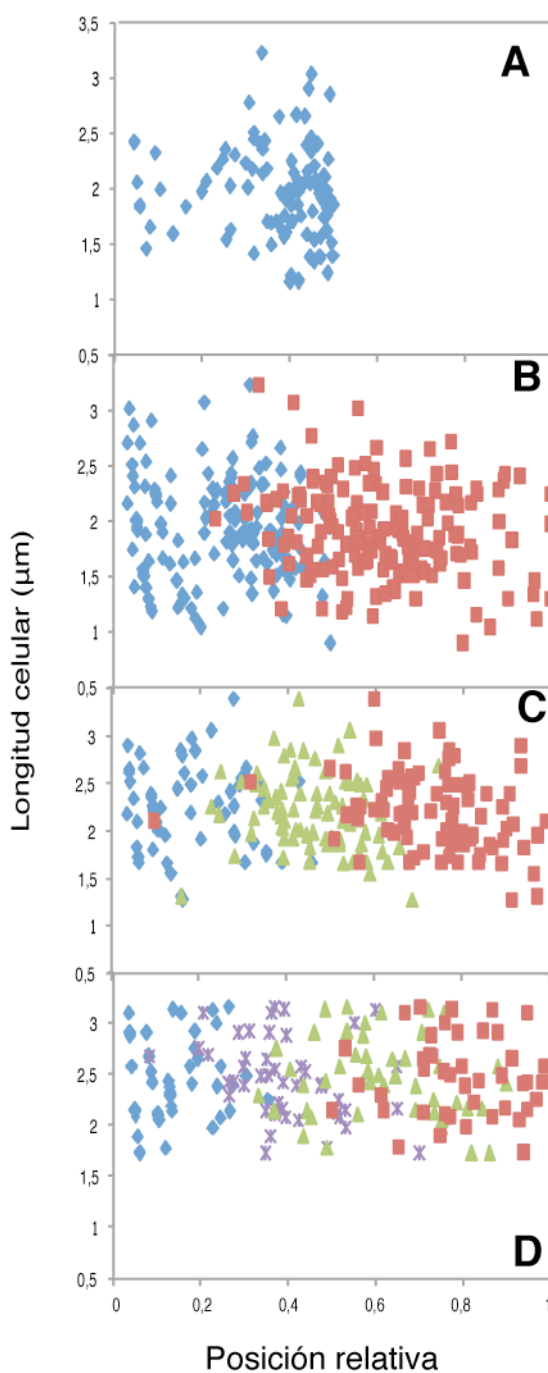
(B) Número de focos de la proteína NrdB en células sincronizadas a diferentes tiempos.

En la parte superior de la figura A aparece un diagrama esquemático del diseño del experimento para sincronizar las células. La zona sombreada representa el momento del cultivo (señalado por flechas) donde se analiza el número de focos de SeqA.

Para conocer la localización subcelular de los focos de NrdB se determinaron sus posiciones relativas (Fig. 46). Los datos muestran que las células más pequeñas tienen bien un foco en el medio celular ($0,36\pm 0,14$) o dos focos en posiciones $1/4$ y $3/4$ ($0,22\pm 0,13$ y $0,62\pm 0,16$). Las células más largas corresponden a células con 3 focos en las posiciones $1/4$, $1/2$ y $3/4$ ($0,16\pm 0,11$, $0,47\pm 0,11$ y $0,74\pm 0,15$) o cuatro focos en las posiciones $1/8$, $3/8$, $5/8$ y $7/8$ ($0,13\pm 0,09$, $0,40\pm 0,13$, $0,61\pm 0,15$ y $0,81\pm 0,13$). Estos resultados muestran una distribución subcelular similar a la de las proteínas SeqA, DnaX y DnaB, y reflejan la localización de los puntos de replicación.

FIGURA 46. Posiciones subcelulares de los focos de la subunidad B2 de la proteína RNR en cultivos creciendo en glicerol a 37°C .

El número de células analizadas fue 426. El 3,1% de las células presentaban 0 focos, el 25,6% con 1 foco (A), el 38,3% presentaban 2 focos (B), el 19,7% 3 focos (C), el 11,3% 4 focos (D) y el 1,9% tenían 5 focos.



3.2. Análisis comparativo con las proteínas DnaB, DnaX y SeqA

Para observar la relación espacial entre la RNR y las proteínas SeqA, DnaX y DnaB, las estirpes CMT931 (*nrdB::3XFLAG*), CMT935 (*nrdB::3XFLAG dnaB::HA*) y CMT936 (*nrdB::3XFLAG dnaX::HA*) se crecieron en medio mínimo con glicerol a 37°C y se analizaron mediante inmunomicroscopía de fluorescencia (Fig. 47). A partir de las imágenes se determinó el número de focos de cada proteína en cada célula (Fig. 48). El análisis de los resultados obtenidos mostró que la mayoría de las células presentaban el mismo número de focos de NrdB que de DnaX (20% con 1 foco de cada, 29% con 2, 7% con 3 y 5% con 4), DnaB (8% con 1 foco de cada, 23% con 2, 16% con 3 y 6% con 4) y SeqA (16% con 1 foco de cada, 31% con 2, 5% con 3 y 3% con 4). Igual que ocurriera en los casos estudiados anteriormente, la correlación con ésta última proteína no fue tan ajustada como lo fueron con las dos proteínas del replisoma.

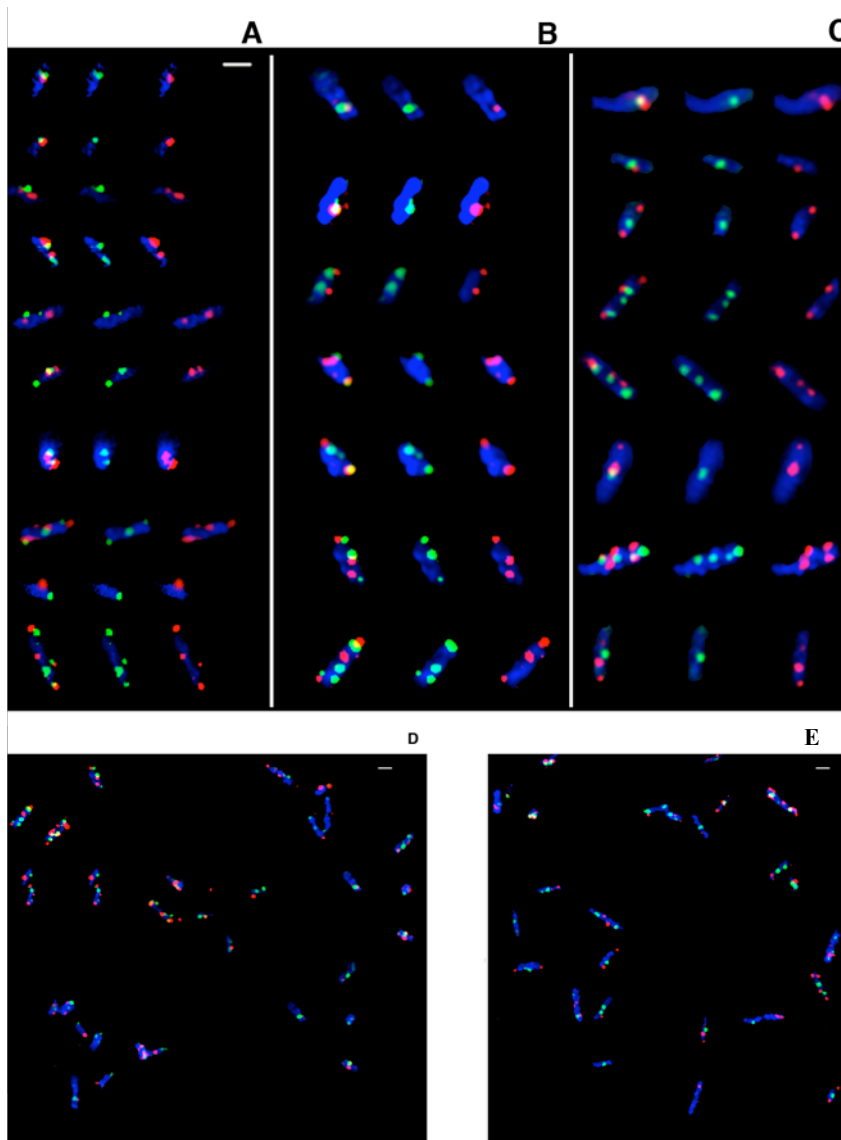


FIGURA 47. Doble inmunolocalización de la proteína NrdB con la subunidad τ de la DNA polimerasa III (A), con la helicasa DnaB (B y D) y con la proteína SeqA (C y E) en células de *E.coli* creciendo en glicerol.

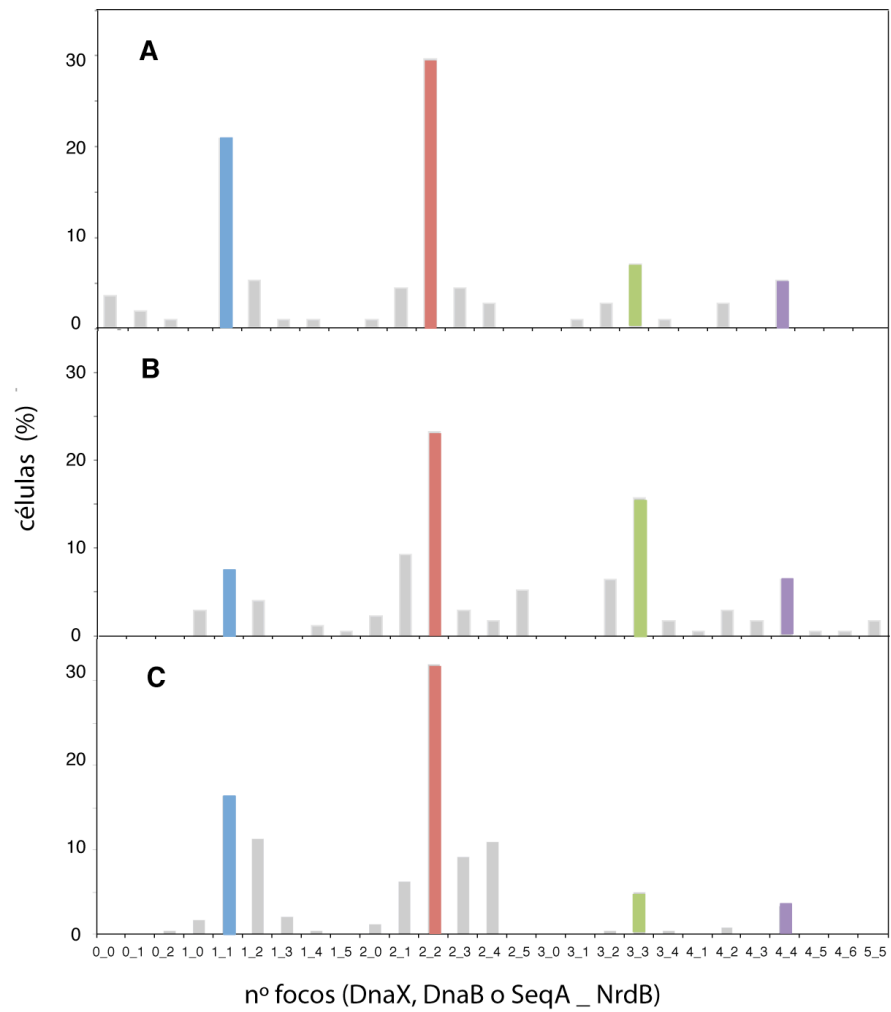
Las células se tiñeron con Hoescht (azul) para localizar los nucleoides. La proteína RNR se marcó con el anticuerpo 3xFLAG-Cy3 (rojo), las proteínas DnaX y DnaB con los anticuerpos anti-HA y anti-ratón FITC (verde) y la proteína SeqA con el anticuerpo anti-SeqA y anti-conejo FITC (verde).

El tamaño de la línea blanca representa un μm .

Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX70 (Delta Vision).

FIGURA 48. Análisis comparativo del número de focos de la proteína NrdB con las proteínas DnaX (A), DnaB (B) y SeqA (C).

En el eje de abscisas aparecen las posibles combinaciones de los focos DnaX, DnaB o SeqA y NrdB.



Para estudiar cómo varían los focos en función de la edad celular, se agruparon las células medidas por grupos de tamaños (Fig. 49). Los resultados mostraron una distribución acorde con lo esperado en las tres parejas de proteínas analizadas. De forma que las células más jóvenes presentan 1 y 2 focos cuya proporción disminuye al crecer las células para incrementarse las que contienen 3 y 4 focos y algunas hasta 5 focos. La comparación entre los números de focos de NrdB y el de las dos proteínas del replisoma muestra una coincidencia destacable con todas las longitudes celulares. Los focos de SeqA presentan, como ya se ha observado en los datos mostrados anteriormente en este trabajo, una mayor variación.

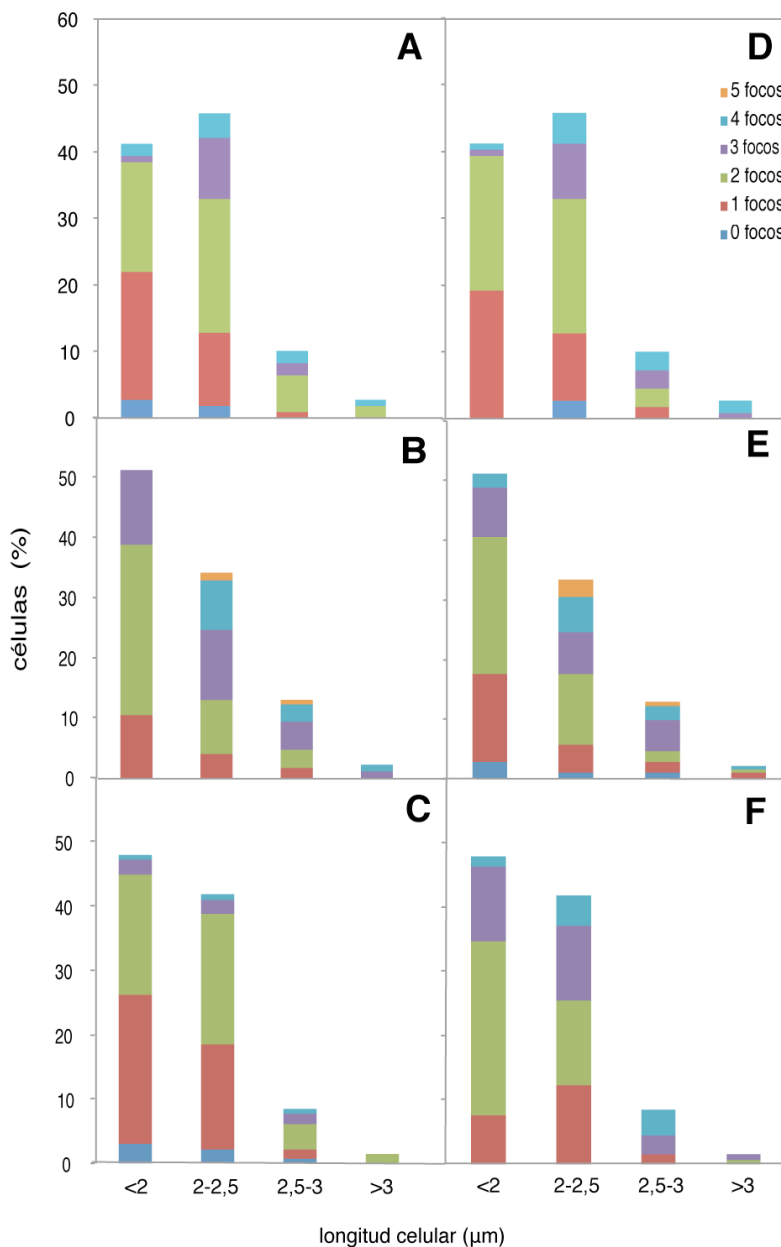
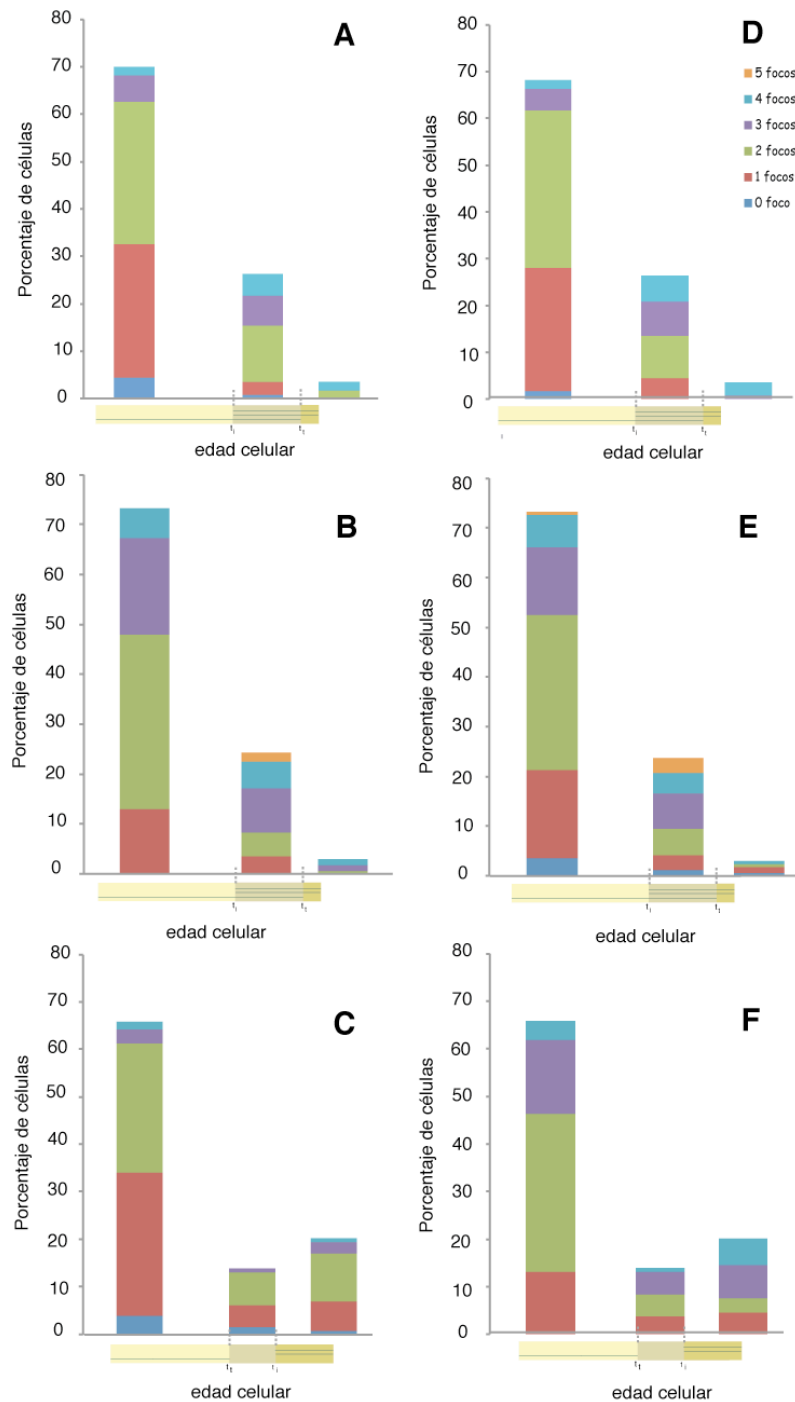


FIGURA 49. Distribución celular de las proteínas NrdB y DnaX (A y D), NrdB y DnaB (B y E) y NrdB y SeqA (C y F), analizadas conjuntamente en la misma célula, en función de la longitud celular.

Para analizar la evolución del número de focos a lo largo de las tres fases del ciclo celular, se agruparon las células en los tres intervalos determinados por las edades de inicio y terminación de la replicación (Fig. 50). Los resultados muestran las mismas coincidencias entre los focos de las proteínas del replisoma y de la RNR (Fig. 50 A, B, D y E), con algunas desviaciones entre NrdB y SeqA (Fig. 50. C y F).

FIGURA 50. Distribución celular de las proteínas NrdB y DnaX (A y D), NrdB y DnaB (B y E) y NrdB y SeqA (C y F), analizadas conjuntamente en la misma célula, en función de la edad celular.



El examen de las proteínas DnaX y DnaB junto a NrdB muestra que cuando las células tienen 2 puntos de replicación, mayoritariamente presentan 1 y 2 focos de las cuatro proteínas (existe una única ronda de replicación y los replisomas hermanos podrían estar colocalizando, 1 foco, o separados, 2 focos); cuando en la segunda fase tienen 6 puntos de replicación, o dos ciclos solapados, las células presentan en su mayoría 2, 3 y 4 focos (podrían existir replisomas unidas y separados en el mismo cromosoma correspondiendo con distintas rondas de replicación); al final del ciclo las células tienen dos cromosomas cada una con un ciclo de replicación y dos puntos de replicación, las células presentan 2 y 4 focos.

El análisis de los focos de las proteínas SeqA y NrdB presenta algunas diferencias. Existe una parte del ciclo celular en que las células tienen 2 puntos de replicación, un corto periodo en la que las células no presentan ninguna ronda de replicación en funcionamiento y células con 4 puntos de replicación con 2 cromosomas y rondas de replicación solapadas. El patrón que presenta la proteína SeqA difiere ligeramente del observado en la proteína NrdB (diferencia que no se detectaba al comparar las proteínas DnaB o DnaX con NrdB), principalmente, en el número de células con tres focos que es inferior al de NrdB en cualquier etapa del ciclo celular y en la parte final del ciclo, donde las células presentan 4 puntos de replicación, el número de focos es mayoritariamente 1 y 2, mientras que para la proteína NrdB es 2 y 4. Es destacable que cuando las células no están replicando presentan focos tanto de SeqA como de NrdB. En cualquier caso, y como ya se detalló en el capítulo 1, siempre podría existir una discrepancia entre los valores experimentales y los teóricos que podría explicar las diferentes clases de focos/células. Esta podría ser debida a la variación célula a célula, solapamientos de focos, al agrupamiento dinámico de las horquillas de replicación e incluso a un posible preensamblaje de las maquinarias de replicación y de síntesis antes del inicio de la replicación.

Como conclusión, estos resultados vuelven a mostrar una gran similitud entre los focos de las proteínas del replisoma y NrdB, lo que tiene importantes consecuencias para deducir la relación entre la maquinaria de replicación y la de síntesis de nucleótidos.

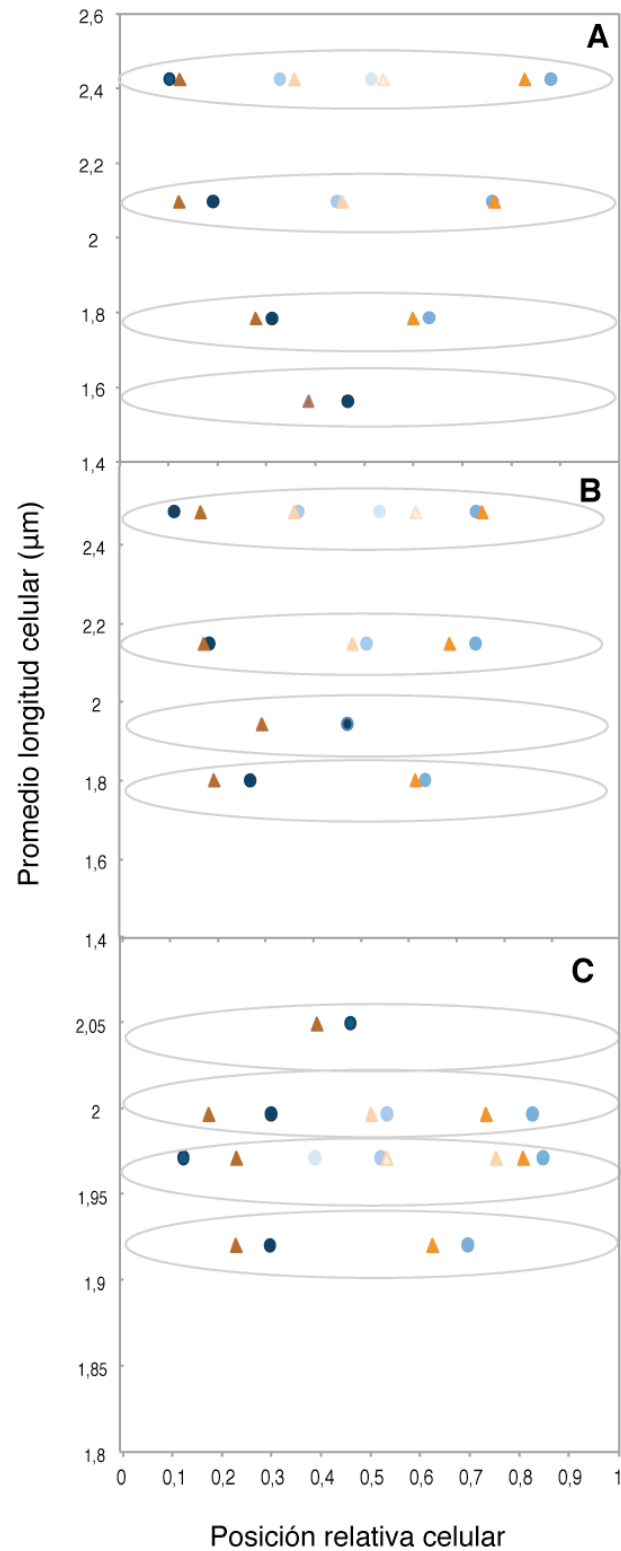
3.3. Distribución espacial de las proteínas DnaX, DnaB y SeqA con respecto a NrdB

Para conocer la organización intracelular de la proteína RNR, y compararla con la de DnaB, DnaX y SeqA, analizamos los promedios de la longitud celular frente a sus posiciones relativas (Fig. 51). Estos resultados muestran que las posiciones celulares de los focos de NrdB frente a DnaX y DnaB están íntimamente relacionados, mientras que

cuando observamos los focos NrdB y SeqA, aunque parece existir una relación entre ellos, no están tan próximos entre sí como lo están las proteínas de la maquinaria de replicación.

FIGURA 51. Distribución espacial comparativa de la proteína NrdB frente a las proteínas DnaX (A), DnaB (B) y SeqA (C) en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.

Los círculos representan a la proteína DnaX (A), DnaB (B) y SeqA (C) y los triángulos representan los focos de la proteína NrdB con diferentes tonalidades cuando hay más de un foco. En cada panel existen cuatro tipos de células que corresponden a aquellas con 1, 2, 3 o 4 focos de cada tipo de proteína.



Incluso si los focos de las proteínas analizadas estuviesen distribuidos en la célula de forma aleatoria, se podría encontrar cierta colocalización. Así, la distancia interfocal aleatoria depende de la longitud celular, del número de focos/célula y del área de los focos, esperándose una menor distancia interfocal cuanto mayor sea la fracción ocupada del nucleóide.

Si representamos la distancia interfocal frente a la fracción del nucleóide ocupada por los focos para cada una de las combinaciones posibles de células con el mismo número de focos por célula de la proteína Rnr frente a DnaX (Fig. 52.A), a DnaB (Fig. 52.B) o a SeqA (Fig. 52.C), se observa que no existe una correlación directa, sino que la distancia interfocal es independiente del número de focos y del tamaño celular, lo que favorece una organización espacial coordinada entre la maquinaria de replicación y la de síntesis de nucleótidos.

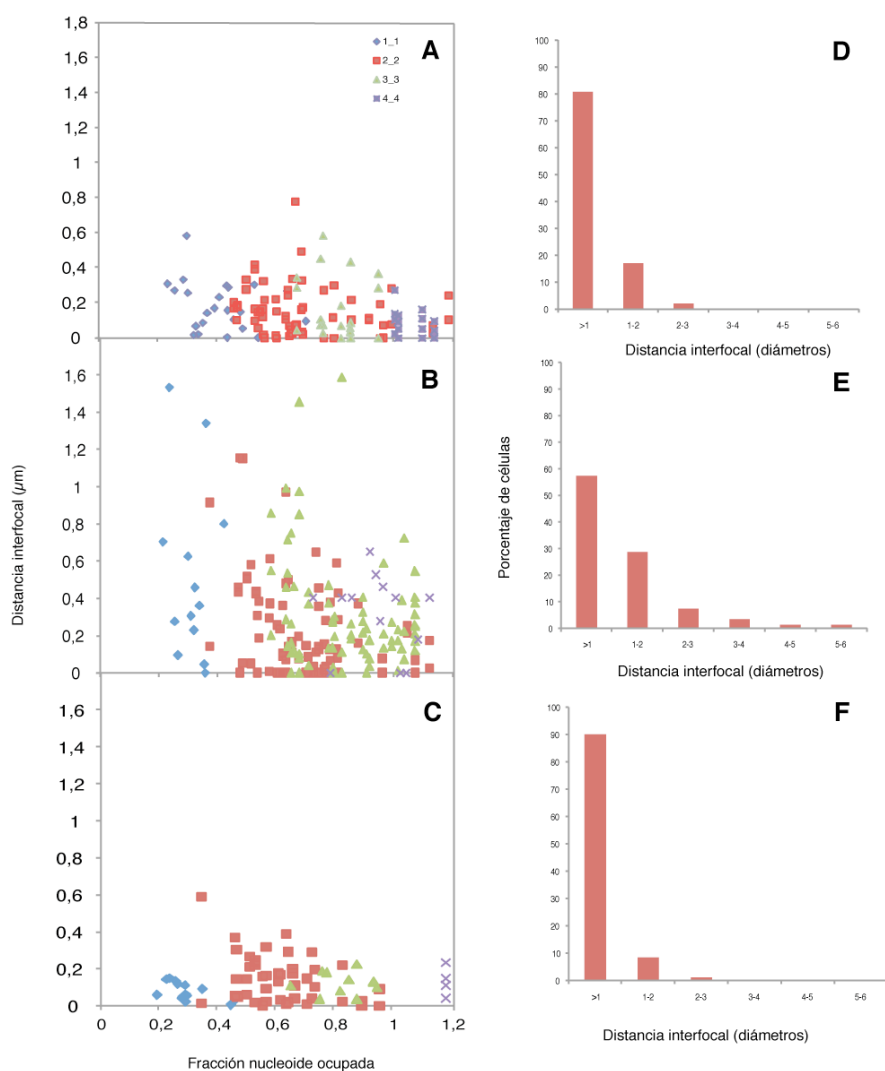


FIGURA 52. Análisis de la distancia interfocal frente a la fracción del nucleóide ocupada por los focos para las proteínas NrdB y DnaX (A), NrdB y DnaB (B) y NrdB y SeqA (C) y análisis de la colocalización entre la proteína NrdB y las proteínas DnaX (D), DnaB (E) y SeqA (F).

La fracción del nucleóide ocupada por los focos es igual al número de focos por el diámetro de cada foco relativo a la longitud del nucleóide.

En el eje de abscisas aparece la distancia interfocal en diámetros de focos, siendo el diámetro medio de un foco $0,27 \mu\text{m}$.

El color azul representa la combinación 1 foco de cada, el rojo la combinación 2 focos de cada, el verde 3 focos y el violeta 4 focos de cada combinación.

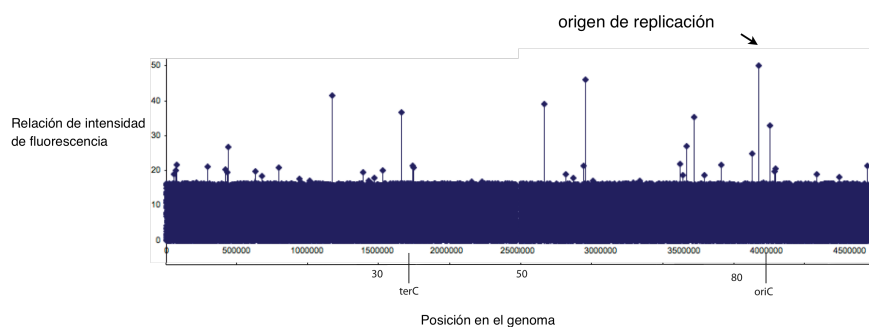
Las distancias entre los focos no son iguales entre las distintas parejas analizadas. Dado que el diámetro promedio de un foco es $0,27\ \mu\text{m}$ podemos observar que cuando comparamos la proteína DnaX con NrdB (Fig. 52.A y D), la mayor parte de las células (80,71%) tienen sus focos separados por una distancia menor a $0,27\ \mu\text{m}$, de igual forma ocurre con los focos de SeqA y NrdB en un 90,12% (Fig. 52.C y F). Esto implicaría que la mayoría de las células presentan un solapamiento de los focos o colocalización. La distancia interfocal de DnaB y NrdB muestra una mayor dispersión (Fig. 52.B y E), pero el 57,52% de los focos están colocalizados, porcentaje que indica que no podría deberse a una colocalización accidental.

3.4. Determinación de la interacción a nivel molecular de la RNR al DNA cromosómico

El análisis de una posible unión de la RNR al DNA cromosómico se llevó a cabo mediante la técnica de CHIP-on-chip en células sincronizadas. Un cultivo exponencial de la estirpe CMT933 (*dnaX:HA nrdB:3xFLAG dnaC2*) creciendo a 30°C en medio rico LB se incubó a temperatura no permisiva durante 60 minutos. El cultivo se transfirió posteriormente a 30°C durante 6 minutos y en este momento se tomaron las muestras para su análisis por CHIP-on-Chip usando el anticuerpo comercial anti-3xFLAG (Fig. 53). Los resultados mostraron la ausencia de unión de la RNR al DNA, lo que implica que la RNR no presenta una interacción directa con el DNA.

FIGURA 53. CHIP-on-chip de cultivos sincronizados con una sola ronda de replicación en funcionamiento para la proteína NrdB usando el anticuerpo comercial 3XFLAG.

La relación de intensidad de fluorescencia es la intensidad de la señal de la muestra analizada dividida por la del control (sin anticuerpo).





DISCUSIÓN

A lo largo de las últimas décadas han sido numerosos los estudios dedicados a desvelar los mecanismos moleculares responsables de la replicación del DNA en organismos procarióticos por lo que sus detalles moleculares son bastante conocidos (Baker y Wickner, 1992; Baker y Bell, 1998; Davey y O'Donnell, 2000; McHenry, 2003), pero esta información procede fundamentalmente de estudios *in vitro*. Los estudios realizados para entender los mecanismos esenciales en la célula viva, tales como el control del inicio, la localización y organización de los replisomas, la segregación y partición cromosómica, los movimientos del cromosoma durante la replicación, la interrelación entre la replicación, transcripción, reparación y recombinación, y otros, han tenido menos éxito y muchas son las controversias planteadas. La importancia de todos estos procesos para entender el funcionamiento íntegro de la célula hace que los esfuerzos actuales se dirijan cada vez más hacia estudios *in vivo* en los que los procesos estudiados son más complejos pero más cercanos a la realidad biológica.

La relación entre el tamaño celular y la longitud del cromosoma bacteriano crea un problema topológico: cómo compactar y organizar una molécula casi mil veces más grande que la célula que lo contiene y que dicha molécula sea replicada, transcrita, reparada, recombinada, reconocida por multitud de proteínas reguladoras, etc. Las bacterias resuelven este problema de compactación y organización mediante una combinación de proteínas que condensan la estructura del cromosoma y otras que están asociadas a él (Gierasch *et al.*, 2006; Woldringh y Nanninga, 2006). Dado que múltiples funciones se realizan simultáneamente es importante conocer cómo la maquinaria de replicación está localizada y organizada dentro del nucleoide compacto.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la organización de la maquinaria de replicación en *E. coli* con un énfasis especial en la relación entre dicha maquinaria y la de síntesis de los desoxinucleótidos, utilizando la microscopía de fluorescencia, junto con otras técnicas, como la citometría de flujo y el ChIP-on-chip.

Localización y organización de las horquillas de replicación

El genoma de *E. coli* presenta aproximadamente 19.000 secuencias GATC no uniformemente distribuidas por todo el cromosoma (Henaut *et al.*, 1996). La proteína SeqA se une cooperativamente a las secuencias GATC hemimetiladas formadas cuando el DNA es replicado (Brendler y Austin, 1999; Kang *et al.*, 2003). De este modo, la progresión de los replisomas origina una ola transitoria de hemimetilación que explica la formación de focos SeqA observados al microscopio de fluorescencia. Nuestros resultados indican, que tal y como era esperable, SeqA forma focos discretos en posiciones específicas de la célula (Fig. 21 y 22) que son similares a las de las horquillas de replicación observadas por la incorporación de BrdU (Molina y Skarstad, 2004) Por lo tanto, la localización y el número de focos de SeqA pueden ser utilizados para entender la organización y localización de las horquillas de replicación.

Para estudiar la relación entre la aparición de los focos SeqA y el tiempo de replicación del DNA se analizó el número de focos en células sincronizadas para el inicio de la replicación (Fig. 23). El análisis indica que la aparición de dichos focos depende de la replicación cromosómica en funcionamiento ya que la mayoría de los focos de la proteína SeqA aparecen cuando se inicia la replicación y desaparecen cuando se termina. Estudios anteriores ya habían analizado la desaparición de los focos en cultivos con rifampicina (Molina y Skarstad, 2004), pero dado que la rifampicina afecta a la transcripción y a la estructura cromosómica, la disminución de los focos SeqA podría estar causada por la inhibición de la síntesis de la proteína Dam metilasa o, debido a que la rifampicina afecta a la condensación del nucleoide y al superenrollamiento, por la inhibición del desensamblaje de los grupos cooperativos de SeqA. Por este motivo, resulta más correcto y apropiado estudiar la desaparición de los focos SeqA en células sincronizadas mediante el alelo *dnaC2*.

En este trabajo se ha analizado la unión de la proteína SeqA a lo largo del cromosoma utilizando una técnica ampliamente utilizada en eucariontes, pero aún sin explorar en procariontes. La técnica ChiP-on-chip en cultivos sincronizados nos permitió detectar las horquillas de replicación activas y cómo éstas aparecen rápidamente tras iniciarse la replicación. Los resultados mostrados en la figura 24 abre todo un campo de posibilidades de estudios para conocer la posición exacta y el movimiento de cada punto de replicación a lo largo del cromosoma bacteriano y nos permite confirmar que todas las regiones del cromosoma dan lugar a focos SeqA detectables por microscopía.

Existe un gran número de estudios que analizan los focos SeqA. Algunos de ellos encuentran que el número de focos de SeqA en cultivos exponenciales de estirpes silvestres es aproximadamente igual a

la mitad del número de horquillas (Bach *et al.*, 2003; Fossum *et al.*, 2003; Hiraga *et al.*, 1998), mientras que otros proponen que la correspondencia entre el número de focos y de horquillas es 1:1 (Brendler *et al.*, 2000). Sin embargo, en la mayoría de los estudios, el periodo de replicación y el número de horquillas no fue medido experimentalmente sino que se asumió de datos pre-existentes (Cooper y Helmstetter, 1968). Basados en la distribución y localización de los focos, se han propuesto diferentes modelos referentes a la organización del replisoma. Unos proponen que las horquillas de replicación se alejan unas de otras a lo largo del cromosoma; otros sugieren que las horquillas están unidas durante el primer tercio de la replicación y después migran abruptamente hacia direcciones opuestas (Bates y Kleckner, 2005; Niki *et al.*, 2000b; Sunako *et al.*, 2001); otros proponen que las parejas de horquillas se encuentran acopladas durante toda la replicación (Berkmen y Grossman, 2006; Lemon y Grossman, 2001; Nielsen *et al.*, 2007; Wang, 2005) y un último modelo basado en el anterior, sugiere que los orígenes hermanos están acoplados en el inicio de manera que 2 o 4 horquillas están unidas en las nuevas fábricas de replicación recién formadas (Molina y Skarstad, 2004). En definitiva, todos los modelos propuestos asumen que los replisomas están organizados independientemente del solapamiento de ciclos, difiriendo en la cohesión propuesta de las horquillas de replicación.

En este trabajo se ha evaluado si el ensamblaje de las horquillas de replicación es dependiente del ciclo celular, comparando la distribución de los puntos de replicación, obtenida por citometría de flujo, con la de los focos de SeqA, obtenidos por microscopía de inmunofluorescencia, en bacterias creciendo en diferentes medios de cultivo (Fig. 25). La relación puntos de replicación/foco se ha utilizado para entender la organización de la maquinaria de replicación. Los resultados indican, en primer lugar, que el número de focos de SeqA es menor que el número de puntos de replicación en todos los cultivos analizados lo que supone que las horquillas hermanas colocalizan durante una parte del ciclo celular y, en segundo lugar, los puntos de replicación y los focos SeqA no aumentan de la misma forma al aumentar el solapamiento de ciclos (Fig. 25) lo que demuestra que el tiempo durante el que las horquillas de replicación están cohesionadas aumenta con la velocidad de crecimiento. Debido a que todos los modelos propuestos proponen una correlación lineal entre el número de focos y el de horquillas, estos resultados no están de acuerdo con ninguno. Como se observa en la figura 27, los resultados sugieren una relación puntos de replicación/foco variable e indica que existe una organización dinámica de las replisomas. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan una compatibilidad de los diferentes modelos propuestos, contraria a la idea previa que los suponía excluyentes entre sí.

La organización espacial del cromosoma y la maquinaria de replicación están necesariamente coordinados durante el inicio y la

elongación de la replicación. La iniciación de la replicación ocurre en un momento determinado del ciclo celular, lo que implica que todos los participantes deben estar presentes y organizados. La localización del origen en la iniciación determina la organización de las horquillas en este periodo. Recientemente se ha publicado que la organización del origen es dependiente del crecimiento (Adachi *et al.*, 2008; Fossum *et al.*, 2003): en células creciendo rápidamente los orígenes formados a partir de un inicio colocalizan durante una generación entera, mientras que en células creciendo lentamente la cohesión de los orígenes se limita a la décima parte de una generación. Por lo tanto, la cohesión variable de los orígenes, apoya nuestros resultados que muestran una organización dinámica de las horquillas.

Las células creciendo rápida y lentamente se enfrentan a necesidades de organización diferentes durante la replicación y la segregación. Los cultivos creciendo lentamente, con una sola ronda de replicación y 1-2 orígenes por célula, no pueden mostrar asincronía en la iniciación de los distingos orígenes, puesto que sólo tienen un origen. En cualquier caso la asincronía aumentaría con el solapamiento de ciclos, así como multitud de parámetros, tales como el número de nucleoides/célula, horquillas/nucleoide, DNA/nucleoide, orígenes/nucleoide, horquillas/septosoma,...), esencialmente porque las células siempre se dividen por bipartición. De este modo, las células con mayor solapamiento de ciclos necesitan más mecanismos de control que aseguren que las dos ..células hijas sean iguales. Por lo tanto, solamente las células creciendo rápidamente necesitan mecanismos estrictos para organizar la sincronización de la iniciación en todos los orígenes. Estas diferencias en cuanto a los requerimientos de la organización, podrían explicar la cohesión variable de las horquillas encontradas.

Localización y organización de la maquinaria de replicación

Dado que las células creciendo lentamente tienen menor solapamiento de ciclos que las que crecen en medios ricos y el número de focos esperado es menor, estudiamos la localización y organización de la maquinaria de replicación en las primeras.

El análisis de la microscopía de fluorescencia de las estirpes CMT936 (*dnaX::HA nrdB::3xFLAG*) y CMT937 (*dnaB::HA nrdB::3xFLAG*) muestran que la subunidad τ de la DNA polimerasa III y la helicasa DnaB, dos componentes del replisoma, se localizan en posiciones discretas (Fig. 30 y 34) de manera similar a las horquillas de replicación analizadas con pulsos de BrdU por Adachi y colaboradores y a algunas proteínas del replisoma, como la subunidad β de la DNA polimerasa III (Onogi *et al.*, 2002).

El análisis del número de focos observados mostró una similitud entre ambas proteínas, existiendo células con 1, 2, 3, 4 y 5 focos, siendo mayoritarias las células con 2 focos (Fig. 31 y 35). Los focos se encuentran localizados de una manera ordenada en la célula, en la posición central cuando existe un solo foco, en las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ cuando hay dos focos, cuando existen tres focos, uno se sitúa en el medio y los otros a ambos lados y cuando existen cuatro focos éstos se distribuyen uniformemente a lo largo de la célula. La dispersión de los focos en cuanto a sus posiciones relativas está de acuerdo con la idea de que en una célula creciendo exponencialmente, las posiciones de los focos son más dinámicas que estáticas y pueden oscilar alrededor de una posición media (Reyes-Lamothe et al, 2008).

Aunque las proteínas DnaB y DnaX están etiquetadas con el mismo epítipo y no podemos compararlas en la misma célula, los porcentajes de células con diferente número de focos para cada proteína (Fig. 39), así como sus posiciones subcelulares (Fig 31 y 35), son muy similares, lo que sugiere que están marcando la misma estructura, el replisoma. Estos datos están en consonancia con la relación estructural mostrada por estudios entre la helicasa DnaB y la DNA polimerasa III. Ambas proteínas están funcionalmente acopladas por una interacción directa y aunque la helicasa DnaB continúa abriendo la estructura del DNA antes y después de la síntesis de cebador en el origen, no se mueve muy lejos de la DNA polimerasa III mientras progresa la elongación (Kim *et al.*, 1996).

Dado que la replicación es bidireccional, un inicio de replicación genera dos puntos de replicación, por lo que toda célula en replicación debería tener, al menos, dos replisomas. Por ello, las células con un único foco de DnaB y DnaX indican que los dos puntos de replicación están colocalizados o asociados durante, al menos, una parte del periodo de replicación, en una única estructura. Si tenemos en cuenta que los orígenes hermanos permanece colocalizados durante una fase del ciclo antes de que sean separadas y segregadas en las células hijas (Fossum *et al.*, 2007), la cohesión de las horquillas de replicación aquí encontradas podría coincidir con la de orígenes previamente descrita.

Diversas evidencias sugieren que la replicación se lleva a cabo en las posiciones centrales de la célula: *oriC* está localizado en el punto medio durante el inicio de la replicación y dentro de una distancia de 0,3 μm desde el foco de DnaX (Bates y Kleckner, 2005), además los focos de los replisomas colocalizan con orígenes que han sido deslocalizados, por ejemplo, por crecimiento de estirpes *mukB* que exhiben deslocalización de orígenes (Reyes-Lamothe et al, 2008).

La organización de las maquinarias de replicación en una estructura, denominada fábrica de replicación, que contiene los dos puntos de replicación originados en un mismo inicio, fue originalmente propuesto por Dingman (1979) (Dingman *et al.*, 1974) y

posteriormente demostrado citológicamente (Fossum *et al.*, 2003; Hiraga *et al.*, 1998; Lemon y Grossman, 1998, 2000; Molina y Skarstad, 2004). Aunque la existencia de fábricas de replicación no está aceptada de forma general, puesto que hay autores que no han encontrado evidencias de las horquillas de replicación asociadas (Brendler *et al.*, 2000), los resultados presentados en este trabajo con las proteínas DnaB y DnaX apoyan la existencia de una fábrica de replicación durante la fase inicial de la replicación.

Los datos de citometría muestran que la mayoría de las células tienen 2 puntos de replicación, alrededor de un 25% tienen 6 puntos de replicación y dos ciclos de replicación solapados y un 3% de células tienen 2 cromosomas con 2 puntos de replicación cada uno (Fig. 29). El número de focos esperados para cada uno de estos tipos de células sería 1 o 2 focos para aquellas con 2 puntos de replicación, 3 o 4 focos para las que presentan 6 puntos de replicación, dependiendo de si los replisomas de los puntos más viejos están acoplados o no, y 2 o 4 focos en aquellas con 4 puntos de replicación (Fig. 33 y 36). Las células ordenadas en función de su tamaño, como indicativo de la edad celular, y observadas por microscopía de fluorescencia muestran que las células con dos puntos de replicación tienen 1 y 2 focos de DnaX y DnaB, de manera que los replisomas hermanos estarían unidos dando lugar a un foco en una fase inicial y dos focos en una fase posterior. Las células con 6 puntos de replicación presentan mayoritariamente 2, 3 y 4 focos y las que tienen 4 puntos de replicación tienen 2 y 4 focos (Fig. 33 y 36). La explicación más sencilla para estos resultados es considerar que las maquinarias de replicación se mantienen juntas durante una parte inicial de la replicación y después migran en direcciones opuestas en una fase posterior.

Mientras la presencia de la asociación de las maquinarias de replicación en una factoría de replicación parece bastante aceptada por la mayoría de los autores, hay controversia sobre si ese macrocomplejo es fijo o dinámico durante la replicación, en otras palabras, si el aparato de replicación está estacionario y localizado en el centro de la célula hasta que la replicación acaba (Berkmen y Grossman, 2006; Lemon y Grossman, 2001; Nielsen *et al.*, 2007; Wang, 2005) o, por el contrario, las maquinarias de replicación se mantienen unidas durante una parte del periodo de replicación y después se separan en direcciones opuestas de una forma coordinada (Bates y Kleckner, 2005; Niki *et al.*, 2000b; Sunako *et al.*, 2001). Los resultados presentados en este trabajo apoyan un modelo de fábricas de replicación dinámico, dado el alto porcentaje de células con la misma edad celular y focos que podrían estar acoplados o separados.

El mecanismo que permite a la maquinaria de replicación migrar no es conocido, pero el movimiento parece ser rápido en las direcciones opuestas hasta las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ durante la replicación cromosómica (Bates y Kleckner, 2005; Brendler *et al.*, 2000; Hiraga,

2000). Esta migración puede ser mediada por el mecanismo de segregación cromosómica o por proteínas específicas, tales como MukBEF, que han sido localizadas en las posiciones $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ (Ohsumi *et al.*, 2001) y que podrían jugar un papel importante en el correcto posicionamiento de las horquillas de replicación y además en la separación y reorganización de los cromosomas hermanos para formar un nucleoide compacto separado (Adachi *et al.*, 2005; Danilova *et al.*, 2007; Draper y Gober, 2002; Hiraga, 2000; Ohsumi *et al.*, 2001; Yamazoe *et al.*, 2005). Este tipo de proteínas formarían fibras contráctiles como requerimiento para generar una zona libre de nucleoide en el centro celular para la formación del septo para la división celular (King *et al.*, 2000; Sun y Margolin, 2004)

La maquinaria de replicación y los focos SeqA: idea del preensamblaje

Aunque es conocido que los focos de la proteína SeqA marcan las horquillas de replicación, existe bastante controversia sobre cómo se organizan durante la replicación cromosómica. Para conocer la relación con las proteínas de la maquinaria de replicación estudiamos la relación entre ambas.

Aproximadamente la mitad de las células tienen el mismo número de focos de SeqA que de DnaX (57%) y de DnaB (41%), el resto de las células tienen un número de focos de SeqA menor que los de las otras dos proteínas estudiadas. Las células que tienen el mismo número de focos de SeqA que de las otras proteínas, colocan (es decir, se encuentran a una distancia menor que el diámetro de un foco) en el 80% de los casos con DnaB y DnaX, lo que indica una buena colocalización de estas proteínas (Fig. 41). Estos resultados contradicen los datos previos que no encuentran una localización superior al 10% entre la proteína DnaB y SeqA (den Blaauwen *et al.*, 2006) cuando ambas proteínas representan estructuras similares y próximas.

Aproximadamente la mitad de las células tienen más focos de las proteínas DnaB y DnaX que de SeqA. Una explicación de estos focos “extras” podría ser un marcaje inespecífico de las proteínas. Para descartar esta posibilidad se comprobó la especificidad del anticuerpo comercial por Western blot (Fig. 20) y el uso de estirpes sin el epítipo incubadas con el anticuerpo en las que se comprobó la ausencia de señal fluorescente.

La observación de las células con un foco más de las dos proteínas replicativas que de SeqA muestra a uno de los focos SeqA localizado próximo a un foco DnaB o DnaX y al otro foco en una posición central (Fig. 40 2.12). Dado que la siguiente ronda de replicación iniciará en dicha posición, podemos interpretar que el foco “solitario” podría indicar el lugar donde las proteínas del replisoma son

prerreclutadas antes de la iniciación (den Blaauwen *et al.*, 2006). Esta interpretación está en consonancia con la observación de los focos de DnaX-GFP encontrados en el centro celular antes de la llegada de *oriC* (Bates y Kleckner, 2005).

NrdB se localiza en focos discretos, en igual número que los de las proteínas del replisoma y a distancias muy cercanas de ellas

El modelo de la hiperestructura de replicación propone que el complejo de síntesis de nucleótidos debería estar localizado en focos discretos y cercanos a las proteínas implicadas en la replicación (Guzmán *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 1999; Norris *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 2007).

En este trabajo mostramos que la subunidad R2 de la RNR aparece en focos discretos (Fig. 43), contradiciendo resultados previos que proponían que esta proteína se encontraba distribuida por toda la célula (den Blaauwen *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2007).

El análisis de los focos por microscopía de fluorescencia muestra que el número de focos de NrdB y, por tanto, de la maquinaria de síntesis de nucleótidos está relacionada con las horquillas de replicación de una forma dependiente del tipo de ciclo celular (Fig. 44.A). La relación media de puntos de replicación/foco de la proteína NrdB no permanece constante a diferentes velocidades de crecimiento, de forma que, en medio rico hay menos número de focos NrdB que de horquillas que podría ser explicado por la agregación de complejos. Se demuestra así que existe una organización dinámica no sólo de las horquillas de replicación y de los replisomas sino también de los complejos de síntesis de dNTP. Si centramos el análisis en cultivos creciendo lentamente, el número de focos de NrdB está relacionado con los puntos de replicación, de manera que las células con 1 y 2 focos presentan longitudes similares y corresponden a células con 2 puntos de replicación, que indican complejos de síntesis de nucleótidos acoplados o separados, y células con 3 y 4 focos correspondiente a células con 4 puntos de replicación (Fig. 44.B). La explicación más sencilla para entender por qué células con el mismo número de puntos de replicación presentan diferente número de focos es que las dos maquinarias de síntesis de nucleótidos permanecen acopladas durante un tiempo de la replicación para después separarse.

Los diferentes tipos de células encontradas muestran entre 1 y 4 focos de NrdB localizados subcelularmente de manera ordenada (Fig. 46) y muy similar a la de los focos de SeqA (Fig. 22), DnaX y DnaB (Fig. 31 y 35).

El análisis del número de focos de NrdB comparado con el número de focos de las proteínas del replisoma muestra que la mayoría

de las células presentan el mismo número de focos de NrdB que de focos de DnaB y de DnaX (55% y 65%, respectivamente).

Además de esta similitud en el número de focos, existe una organización espacial coordinada de ambos complejos (Fig. 51 y 52), ya que encontramos un foco NrdB dentro de una distancia inferior al diámetro de un foco DnaX en el 80% de los casos y de un foco DnaB en un 57%.

La posibilidad de que los focos colocalicen de forma aleatoria se analizó estudiando la distancia interfocal frente a la fracción del nucleoide ocupada. Estos resultados indican que la distancia entre los focos es independiente del número de focos y del tamaño celular, por lo que se puede excluir que la colocalización observada pueda ser debida al azar.

La existencia de una relación entre la maquinaria de replicación y la de síntesis de nucleótidos parece evidente con los resultados presentados. Esta relación puede ser además comprobada mediante la observación del número de focos a lo largo del ciclo celular. El número de focos de las proteínas DnaB y DnaX observado en las diferentes etapas del ciclo celular, con diferentes números de puntos de replicación, es muy similar al observado para la proteína NrdB (Fig. 49 y 50). La interpretación más sencilla para estos resultados nos lleva a proponer que el replisoma y el complejo de síntesis de dNTP están agrupados formando parte de un complejo superior o hiperestructura encargada de la replicación.

El análisis de los focos NrdB en células sincronizadas para el inicio de la replicación muestra que sólo aparecen focos mientras hay replicación y que éstos desaparecen cuando la replicación termina (Fig. 45).

La comparación del número de focos NrdB y SeqA muestra resultados similares a los obtenidos con las proteínas del replisoma, DnaB y DnaX, es decir, la mitad de las células presentan el mismo número de focos de SeqA que de NrdB (56%), el resto de células tienen menor número de focos SeqA. De la misma forma que ocurría con las proteínas DnaB y DnaX, existe una muy buena colocalización entre focos NrdB y SeqA (próxima al 90%) cuando se analizan células con el mismo número de focos de ambas proteínas. Así mismo, al igual que ocurría con los focos de DnaB y DnaX, existen más focos NrdB que de SeqA. Al analizar su localización subcelular uno de ellos se encuentra próximo al foco SeqA y el otro foco se encuentra también localizado en las posiciones centrales de la célula, el lugar donde se piensa que se va a iniciar la replicación cromosómica. De estos resultados podemos concluir que las proteínas NrdB, y consecuentemente RNR y el complejo de síntesis de dNTP, son prerreclutados antes de que comience la replicación cromosómica (den Blaauwen *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos resultados son una evidencia

más de que el complejo de síntesis de nucleótidos y la maquinaria de replicación deben formar una única estructura que se organiza, probablemente, antes del inicio de la replicación y se mantiene estable durante toda la elongación. La organización de las horquillas de replicación en un mutante con la proteína RNR termosensible se pierde a la temperatura restrictiva (focos de SeqA no se forman a 42°C) y la segregación cromosómica y la división celular se retrasan o se inhiben (Fig. 28). Estos resultados sugieren que además de la necesidad de una organización correcta de la hiperestructura de replicación, una correcta hiperestructura debe ser requerida para la segregación cromosómica y la división celular, corroborando los resultados obtenidos por Riola y col (Riola *et al.*, 2007).

Los experimentos de ChIP-on-chip para comprobar si existe una interacción molecular entre enzima RNR y el DNA no muestran una interacción directa con el DNA, lo que nos lleva a proponer que la unión de esta enzima al replisoma debe hacerse, muy probablemente, a través de una interacción proteína-proteína.

Los resultados presentados en este trabajo nos llevan a concluir que la subunidad R1, codificada por el gen *nrdB*, y, por tanto, la enzima RNR y el complejo de síntesis de dNTP, están unidos a la maquinaria de replicación y que la unión de ambos complejos, unidos a la membrana y, probablemente, la inclusión de la maquinaria de segregación, deben formar una estructura de orden superior sólo presente durante el periodo de replicación a la que se denomina hiperestructura de replicación (Guzmán *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 1999; Norris *et al.*, 2002; Norris *et al.*, 2007; Riola *et al.*, 2007).

La organización y colocación de ambos complejos presenta innumerables ventajas para la célula por lo que no es sorprendente que exista esta relación. Dicha hiperestructura permitiría, como ya fue propuesto por Mathews y col. (Ji y Mathews, 1991; Kim *et al.*, 2005a; Mathews, 1976; Mathews y Sinha, 1982; Shen *et al.*, 2006), la canalización y concentración de los precursores de la replicación en un espacio reducido para conseguir elevadas concentraciones justo en el sitio donde son requeridos y permitir con pocas cantidades tener la regulación alostérica tan fina que presenta la proteína RNR. Esta canalización de la síntesis de los dNTP hacia un pequeño espacio cerrado daría, así mismo, explicación a los bajos niveles de estos nucleótidos encontrados en las células (Bianchi *et al.*, 1993; Mathews y Sinha, 1982; Werner, 1971), a la necesidad de defosforilación de los dNTP añadidos a un cultivo para que sean incorporados en el DNA (Reddy y Mathews, 1978) y a la observación de que los rNDP se incorporan al DNA más rápidamente que los dNTP (Allen *et al.*, 1980). Mientras las bacterias deben adaptarse a la diversidad de condiciones de crecimiento, la organización dinámica de los replisomas asociada con las enzimas de la síntesis de DNA y coordinadas con la

división celular, optimizaría la replicación cromosómica y, probablemente, la segregación y la división celular, facilitando la capacidad de supervivencia de las células a los cambios ambientales. Todos estos procesos estarían temporalmente englobados en una hiperestructura que controlaría que los distintos eventos tengan lugar en el sitio, tiempo y orden correctos.



CONCLUSIONES

1. La proteína SeqA se localiza en posiciones discretas dentro de la célula y la formación de los focos SeqA depende de la replicación cromosómica. Por lo tanto, la localización y el número de focos de SeqA pueden ser utilizados para analizar la organización y localización de las horquillas de replicación.

1. The SeqA protein is located in discrete foci that depend on replicating chromosomes. Consequently, the number and localization of SeqA foci may be used as a means to understand the organization and localization of replication forks.

2. El ChIP-on-chip de cultivos sincronizados identifica la posición exacta del cromosoma donde está unida la proteína SeqA en cualquier momento del ciclo celular y permite detectar las horquillas de replicación activas y validar los resultados obtenidos por microscopía.

2. ChIP-on-chip technique using synchronized cultures permits the recognition of the localization of active replication forks upon DNA molecule all along the replication period and it validates the microscopy obtained results..

3. Las horquillas de replicación presentan una organización dinámica dependiente del ciclo celular, aumentando la cohesión de las horquillas con el solapamiento de rondas de replicación. Esto resuelve la controversia planteada entre los diferentes modelos de organización de la maquinaria de replicación propuestos y establece una compatibilidad entre ellos.

3. Replication forks show a dynamic organization which were found to be dependent on the cell cycle, with a higher fork association the higher the overlapping replication cycles. The dynamic organization of replisomes reported here, may allow ending the controversy among the alternative models of the organization of the replication machinery.

4. La subunidad τ de la DNA polimerasa III y la helicasa DnaB, dos componentes del replisoma, están localizadas en focos discretos en la célula y presentan una distribución ordenada en la célula similar a las horquillas de replicación durante la replicación cromosómica.

4. The τ subunit of DNA polymerase III holoenzyme and DnaB helicase, two components of the replisome, are located in discrete foci and reflect an ordered distribution similar to that of the replication forks during DNA replication.

5. La subunidad R2 de la RNR, proteína que forma parte del complejo de síntesis de nucleótidos, aparece en focos discretos en la célula que son dependientes de la replicación activa y desaparecen cuando se termina la replicación. El número y localización subcelular de estos focos es altamente similar a los de las horquillas de replicación y las proteínas del replisoma y depende del tipo de ciclo celular.

5. The R2 subunit of the RNR protein, a member of the dNTP synthesis complex, is located in discrete foci that depend on an active replicating chromosome and disappear when replication ends. Number and subcellular localization of these foci were demonstrated to be very similar to that of fork and replisome proteins, and all of them related to the type of cell cycle.

6. La proteína RNR no presenta una interacción directa con el DNA.

6. The RNR protein does not show a direct interaction with chromosomal DNA.

7. La mayoría de las células presentan el mismo número de focos de NrdB que de las proteínas del replisoma. La relación espacial entre ambos complejos, analizada mediante las distancias interfocales, muestra un alto porcentaje de colocalización entre ellos.

7. Most of the cells have the same number of NrdB foci than replisome proteins foci. The distance analysis between both type of foci shows a high degree of colocalization.

8. La correlación entre el número de puntos de replicación, el de focos de las proteínas del replisoma y de la proteína RNR varía a lo largo del ciclo, lo que apoya la existencia de una asociación dinámica de las maquinarias de replicación. Los datos presentados indican que las dos maquinarias de replicación, así como las de síntesis de nucleótidos, organizadas en un inicio de replicación, se mantienen unidas durante una parte inicial de la replicación y después migran en direcciones opuestas.

8. The number of forks, related to that of RNR and replisome proteins foci, changes along the cell cycle which suggests a dynamic association of replication machineries. These results reveal the dNTP synthesis complex, as well as the replication machinery, organized at

one initiation event, are associated during a fraction of the replication period to migrate in opposite directions after a period of time.

9. La relación espacial y numérica entre la proteína SeqA, las del replisoma y la proteína RNR, sugiere la idea de un prerreclutamiento anterior al comienzo de la replicación en las posiciones centrales de la célula.

9. The numerical and spatial relationship among replisome, SeqA and RNR proteins suggests a preassembly of the replication proteins near the midcell before replication starts.

10. La coincidencia en número y localización de la RNR y las proteínas del replisoma apoya la unión del complejo de síntesis de nucleótidos y la maquinaria de replicación y sugiere la formación de una estructura de orden superior denominada hiperestructura de replicación.

10. The similarity in the number and localization of RNR and replication proteins supports the association between the dNTP synthesis and replication complex and suggests the involvement of a higher order structure, called replication hyperstructure.

11. El análisis de un mutante con la proteína RNR termosensible sugiere que una organización correcta de la hiperestructura de replicación debe ser requerida, además de para la replicación, para la segregación cromosómica e, indirectamente, para la división celular, lo que unificaría los controles de las fases del ciclo celular bacteriano.

11. A mutante carrying a thermosensitive RNR requires a suitable integrity of the replication hyperstructure for chromosome replication, segregation and, indirectly, cell division. In this way, the different periods of the cell cycle would be jointly regulated.



AGRADECIMIENTOS

Aunque una tesis se escribe en soledad y, en algunas ocasiones, desde la distancia, el autor jamás está solo. Por ello, quiero agradecer a todas las personas que, de una u otra manera, ayudaron a encauzar, desarrollar y finalizar este trabajo.

Gracias

A mis directores. A Alfonso por contagiarme su ilusión, entusiasmo y fanatismo por una tal *coli*. Gracias por todo tu tiempo y por darme la simplicidad y tranquilidad necesaria para no perderme. A Felipe por intentar enseñarme a pensar como científico. Sus charlas, consejos y comentarios me serán útiles para toda mi vida profesional y personal. Gracias por todo tu esfuerzo.

A Encarna, por todo lo que aprendí de ella y por nuestros “momentazos” entre pipetas. Gracias por acompañarme, experimento tras experimento, día tras día, en momentos de calma y de tormenta...Nada de esto hubiera sido posible sin su ayuda.

A mis compañeros de laboratorio (Jose, Estrella, Isra, Rocío, Emilia, Elena, Jose Emilio y Belén) por todo lo que me enseñaron y por todos los grandes instantes que pasamos juntos en el laboratorio y fuera de él. Gracias a Isra y Estrella, ellos me han dado fuerza para seguir adelante en esto.

A Juan Jiménez, Rafa Daga, Silvia y Kathy del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo en Sevilla que me ofrecieron generosamente su laboratorio y microscopios. Una mención especial para Rafa Daga por mostrarme algunos de los secretos que esconde la microscopía, gracias por su conocimiento y amabilidad. Agradecer también a todos los miembros de su grupo de investigación.

A Steve Busby, Dave Grainger y David Lee de School of BioScience en Birmingham, mi primer contacto con el mundo científico exterior. Ellos me enseñaron el ChIP-on-chip y el *pull down* de proteínas haciéndome sentir como en casa. Dar las gracias también a todos los miembros de su grupo por su paciencia con mi inglés.

A Pepe Casadesús y a su grupo de investigación en la Universidad de Sevilla por su amabilidad a la hora de proporcionarnos plásmidos y estirpes bacterianas.

Al Área de Bioquímica y Biología Molecular de la UEx. Gracias a todos los que amablemente me ayudaron en algún momento, gracias especialmente a Pedro Macías y Jaime Merino que ayudaron a agilizar toda la documentación. Al grupo de investigación de Ana Mata; a Chary, que me ha demostrado el valor de la amistad, y a Dani, siempre dispuesto a compartir material y protocolos conmigo. También agradecer a Gervasio Martín, a Manolo Ramírez y Pedro Casero que me cedieron sus microscopios en mis inicios con la microscopía de fluorescencia.

A mis amigos de todas partes, especialmente los biólogos, con quienes compartí una gran parte de mis experiencias genéticas. A Maribel, su entusiasmo por mi trabajo me han hecho creer que éste es importante. A Mayca, mi *María Moliner* particular, siempre preocupada porque utilizara correctamente el léxico. A Coro, dispuesta, en cualquier momento, a escuchar cada una de mis ideas. A Lupe, juntas iniciamos este camino. A Lola, un apoyo cercano durante estos años. A Javi, a veces en el mismo lugar, a veces lejos, pero siempre me mostró su apoyo y ayuda. A Inma, que aún no siendo bióloga, se ha esforzado siempre en entender a una genética. Y a todos los que han ayudado a hacer más fácil el tiempo invertido.

A mi familia, el punto clave en este trabajo. A mi padre, que a pesar de no estar siempre convencido de que mis decisiones fueran acertadas, siempre me ha hecho sentir que está muy orgulloso de mí y dispuesto a hacer cualquier cosa para ayudarme. A mi madre por darme la fuerza, su apoyo es imprescindible en mi vida. A mi hermano Javi porque siempre ha estado ahí, aportando tranquilidad y pendiente de que no perdiera tiempo en la cocina (aunque, a veces, le ayudaba Esther, gracias). A Leo, que aún siendo mi niña “pequeña”, ni se imagina lo que he aprendido de ella. A mi abuela por intentar entender el trabajo de su nieta.

Y por último, a la Junta de Extremadura por la concesión de la beca y contrato en práctica para la formación predoctoral del personal investigador que ha permitido realizar este trabajo. Tampoco hubiera sido posible sin la ayuda a grupos de investigación de la Junta de Extremadura (GRU08032) y el proyecto del MEC BFU2007-63942



BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, S., Kohiyama, M., Onogi, T., y Hiraga, S. (2005) Localization of replication forks in wild-type and mukB mutant cells of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* 274: 264-271.
- Adachi, S., Fukushima, T., y Hiraga, S. (2008) Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* 13: 181-197.
- Ahmad, S.I., Kirk, S.H., y Eisenstark, A. (1998) Thymine metabolism y thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol* 52: 591-625.
- Alberts, B.M., Barry, J., Bedinger, P., Formosa, T., Jongeneel, C.V., y Kreuzer, K.N. (1983) Studies on DNA replication in the bacteriophage T4 in vitro system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2: 655-668.
- Allen, J.R., Reddy, G.P., Lasser, G.W., y Mathews, C.K. (1980) T4 ribonucleotide reductase. Physical and kinetic linkage to other enzymes of deoxyribonucleotide biosynthesis. *J Biol Chem* 255: 7583-7588.
- Augustin, L.B., Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1994) *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the nrd promoter region and affect expression of an nrd-lac fusion. *J Bacteriol* 176: 378-387.
- Bach, T., Krekling, M.A., y Skarstad, K. (2003) Excess SeqA prolongs sequestration of oriC and delays nucleoid segregation and cell division. *Embo J* 22: 315-323.
- Baer, A., y Bode, J. (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotechnol* 12: 473-480.
- Bahloul, A., Boubrik, F., y Rouviere-Yaniv, J. (2001) Roles of *Escherichia coli* histone-like protein HU in DNA replication: HU-beta suppresses the thermosensitivity of dnaA46ts. *Biochimie* 83: 219-229.
- Baker, T.A., y Wickner, S.H. (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 26: 447-477.
- Baker, T.A., y Bell, S.P. (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* 92: 295-305.
- Bates, D., y Kleckner, N. (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* 121: 899-911.

- Berkmen, M.B., y Grossman, A.D. (2006) Spatial and temporal organization of the *Bacillus subtilis* replication cycle. *Mol Microbiol* 62: 57-71.
- Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jornvall, H., y Haggard-Ljungquist, E. (1993) *Escherichia coli* ferredoxin NADP⁺ reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein. *J Bacteriol* 175: 1590-1595.
- Bird, R.E., Louarn, J., Martuscelli, J., y Caro, L. (1972) Origin and sequence of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 70: 549-566.
- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M., y Sherratt, D. (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 3: 789-798.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T., y Sherratt, D.J. (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75: 351-361.
- Blinkova, A., Hervas, C., Stukenberg, P.T., Onrust, R., O'Donnell, M.E., y Walker, J.R. (1993) The *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme contains both products of the *dnaX* gene, tau and gamma, but only tau is essential. *J Bacteriol* 175: 6018-6027.
- Boeneman, K., y Crooke, E. (2005) Chromosomal replication and the cell membrane. *Curr Opin Microbiol* 8: 143-148.
- Bogan, J.A., y Helmstetter, C.E. (1996) *mioC* transcription, initiation of replication, and the eclipse in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 3201-3206.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Yanku, M., Schreiber, R., Gust, B., Chater, K., Aharonowitz, Y., y Cohen, G. (2004) Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* 54: 1022-1035.
- Boye, E., Lobner-Olesen, A., y Skarstad, K. (2000) Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep* 1: 479-483.
- Bramhill, D., y Kornberg, A. (1988) Duplex opening by *dnaA* protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell* 52: 743-755.
- Bremer, H. (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by grow rate. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. 2 edit. F. C. Neidhardt et al. (eds) ASM, Washington, D. C.: 1553-1569.

- Brendler, T., y Austin, S. (1999) Binding of SeqA protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences. *Embo J* 18: 2304-2310.
- Brendler, T., Sawitzke, J., Sergueev, K., y Austin, S. (2000) A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *Embo J* 19: 6249-6258.
- Brown, N.C., y Reichard, P. (1969) Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* 46: 39-55.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.
- Bussiere, D.E., y Bastia, D. (1999) Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes. *Mol Microbiol* 31: 1611-1618.
- Cadman, C.J., y McGlynn, P. (2004) PriA helicase and SSB interact physically and functionally. *Nucleic Acids Res* 32: 6378-6387.
- Campbell, J.L., y Kleckner, N. (1990) E. coli oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell* 62: 967-979.
- Cassler, M.R., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (1995) Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *Embo J* 14: 5833-5841.
- Castuma, C.E., Crooke, E., y Kornberg, A. (1993) Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator protein of replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 24665-24668.
- Cherepanov, P.P., y Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158: 9-14.
- Colloms, S.D., Sykora, P., Szatmari, G., y Sherratt, D.J. (1990) Recombination at ColE1 cer requires the *Escherichia coli* xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* 172: 6973-6980.
- Cooper, S., y Helmstetter, C.E. (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* 31: 519-540.

- Cornet, F., Louarn, J., Patte, J., y Louarn, J.M. (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10: 1152-1161.
- Courcelle, J., y Hanawalt, P.C. (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet* 37: 611-646.
- Cui, T., Moro-oka, N., Ohsumi, K., Kodama, K., Ohshima, T., Ogasawara, N., Mori, H., Wanner, B., Niki, H., y Horiuchi, T. (2007) *Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO Rep* 8: 181-187.
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R., y Wuite, G.J. (2005) DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *J Bacteriol* 187: 1845-1848.
- Danilova, O., Reyes-Lamothe, R., Pinskaya, M., Sherratt, D., y Possoz, C. (2007) MukB colocalizes with the oriC region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* 65: 1485-1492.
- Datsenko, K.A., y Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
- Davey, M.J., y O'Donnell, M. (2000) Mechanisms of DNA replication. *Curr Opin Chem Biol* 4: 581-586.
- den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Wheeler, L.J., y Nanninga, N. (2006) Pre-replication assembly of *E. coli* replisome components. *Mol Microbiol* 62: 695-708.
- Dingman, C.W., Fisher, M.P., y Ishizawa, M. (1974) DNA replication in *Escherichia coli*: physical and kinetic studies of the replication point. *J Mol Biol* 84: 275-295.
- Donachie, W.D., Begg, K.J., Lutkenhaus, J.F., Salmond, G.P., Martinez-Salas, E., y Vincente, M. (1979) Role of the ftsA gene product in control of *Escherichia coli* cell division. *J Bacteriol* 140: 388-394.
- Donachie, W.D. (1992) What is the minimum number of dedicated functions required for a basic cell cycle? *Curr Opin Genet Dev* 2: 792-798.
- Donachie, W.D. (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 47: 199-230.
- Dower, W.J., Miller, J.F., y Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Draper, G.C., y Gober, J.W. (2002) Bacterial chromosome segregation. *Annu Rev Microbiol* 56: 567-597.

- Ekberg, M., Birgander, P., y Sjöberg, B.M. (2003) In vivo assay for low-activity mutant forms of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J Bacteriol* 185: 1167-1173.
- Eklund, H., Uhlin, U., Farnegårdh, M., Logan, D.T., y Nordlund, P. (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* 77: 177-268.
- Elledge, S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672.
- Espeli, O., Lee, C., y Marians, K.J. (2003) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278: 44639-44644.
- Firshein, W. (1989) Role of the DNA/membrane complex in prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Microbiol* 43: 89-120.
- Flower, A.M., y McHenry, C.S. (1986) The adjacent dnaZ and dnaX genes of *Escherichia coli* are contained within one continuous open reading frame. *Nucleic Acids Res* 14: 8091-8101.
- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H., y Reichard, P. (1992) The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65: 147-183.
- Fossum, S., Soreide, S., y Skarstad, K. (2003) Lack of SeqA focus formation, specific DNA binding and proper protein multimerization in the *Escherichia coli* sequestration mutant seqA2. *Mol Microbiol* 47: 619-632.
- Fossum, S., Crooke, E., y Skarstad, K. (2007) Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* 26: 4514-4522.
- Fradkin, L.G., y Kornberg, A. (1992) Prereplicative complexes of components of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267: 10318-10322.
- Funnell, B.E., Baker, T.A., y Kornberg, A. (1987) In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* 262: 10327-10334.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001a) tau binds and organizes *Escherichia coli* replication proteins through distinct domains. Domain IV, located within the unique C terminus of tau, binds the replication fork, helicase, DnaB. *J Biol Chem* 276: 4441-4446.
- Gao, D., y McHenry, C.S. (2001b) tau binds and organizes *Escherichia coli* replication through distinct domains. Partial proteolysis of terminally tagged tau to determine candidate domains and to assign domain V as the alpha binding domain. *J Biol Chem* 276: 4433-4440.

- Garriga, X., Eliasson, R., Torrents, E., Jordan, A., Barbe, J., Gibert, I., y Reichard, P. (1996) *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 189-192.
- Gierasch, W.W., Zimmerman, D.L., Ward, S.L., Vanheyningen, T.K., Romine, J.D., y Leib, D.A. (2006) Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *J Virol Methods* 135: 197-206.
- Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) The DnaX-binding subunits delta' and psi are bound to gamma and not tau in the DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 275: 3017-3020.
- Gon, S., Camara, J.E., Klungsoyr, H.K., Crooke, E., Skarstad, K., y Beckwith, J. (2006) A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *Embo J* 25: 1137-1147.
- Gordon, D.M. (1997) The genetic structure of *Escherichia coli* populations in feral house mice. *Microbiology* 143 (Pt 6): 2039-2046.
- Grompone, G., Ehrlich, S.D., y Michel, B. (2003) Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* 48: 845-854.
- Guarino, E., Jimenez-Sanchez, A., y Guzman, E.C. (2007a) Defective ribonucleoside diphosphate reductase impairs replication fork progression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 3496-3501.
- Guarino, E., Salguero, I., Jimenez-Sanchez, A., y Guzman, E.C. (2007b) Double-strand break generation under deoxyribonucleotide starvation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 5782-5786.
- Guarne, A., Brendler, T., Zhao, Q., Ghirlando, R., Austin, S., y Yang, W. (2005) Crystal structure of a SeqA-N filament: implications for DNA replication and chromosome organization. *Embo J* 24: 1502-1511.
- Guijo, M.I., Patte, J., del Mar Campos, M., Louarn, J.M., y Rebollo, J.E. (2001) Localized remodeling of the *Escherichia coli* chromosome: the patchwork of segments refractory and tolerant to inversion near the replication terminus. *Genetics* 157: 1413-1423.
- Guzmán, E.C., Caballero, J.L., y Jimenez-Sanchez, A. (2002) Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43: 487-495.
- Haber, J.E. (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24: 271-275.

- Han, J.S., Kwon, H.S., Yim, J.B., y Hwang, D.S. (1998) Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*. *Mol Gen Genet* 259: 610-614.
- Hanke, P.D., y Fuchs, J.A. (1983) Characterization of the mRNA coding for ribonucleoside diphosphate reductase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 156: 1192-1197.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., y Murray, A.W. (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* 402: C47-52.
- Henaut, A., Rouxel, T., Gleizes, A., Moszer, I., y Danchin, A. (1996) Uneven distribution of GATC motifs in the *Escherichia coli* chromosome, its plasmids and its phages. *J Mol Biol* 257: 574-585.
- Herrick, J., y Sclavi, B. (2007) Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* 63: 22-34.
- Hiasa, H., y Marians, K.J. (1994) Tus prevents overreplication of oriC plasmid DNA. *J Biol Chem* 269: 26959-26968.
- Higuchi, K., Katayama, T., Iwai, S., Hidaka, M., Horiuchi, T., y Maki, H. (2003) Fate of DNA replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication in vitro. *Genes Cells* 8: 437-449.
- Hingorani, M.M., y O'Donnell, M. (1998) ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 273: 24550-24563.
- Hiraga, S., Ichinose, C., Niki, H., y Yamazoe, M. (1998) Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E. coli*. *Mol Cell* 1: 381-387.
- Hiraga, S. (2000) Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu Rev Genet* 34: 21-59.
- Hiraga, S., Ichinose, C., Onogi, T., Niki, H., y Yamazoe, M. (2000) Bidirectional migration of SeqA-bound hemimethylated DNA clusters and pairing of oriC copies in *Escherichia coli*. *Genes Cells* 5: 327-341.
- Holmgren, A., y Bjornstedt, M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252: 199-208.
- Hwang, D.S., Crooke, E., y Kornberg, A. (1990) Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein. *J Biol Chem* 265: 19244-19248.

- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., y Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* 21: 526-531.
- Jacobson, B.A., y Fuchs, J.A. (1998) Multiple cis-acting sites positively regulate *Escherichia coli* nrd expression. *Mol Microbiol* 28: 1315-1322.
- Jensen, R.B., y Shapiro, L. (1999) Chromosome segregation during the prokaryotic cell division cycle. *Curr Opin Cell Biol* 11: 726-731.
- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2001) Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* 106: 417-428.
- Ji, J.P., y Mathews, C.K. (1991) Analysis of mutagenesis induced by a thermolabile T4 phage deoxycytidylate hydroxymethylase suggests localized deoxyribonucleotide pool imbalance. *Mol Gen Genet* 226: 257-264.
- Jiménez-Sánchez, A., y Jiménez-Martínez, J. (1998) Genética Microbiana. Serie Genética, ed. Síntesis, Madrid
- Johnson, A., y O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* 74: 283-315.
- Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbe, J., y Reichard, P. (1994) A second class I ribonucleotide reductase in Enterobacteriaceae: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12892-12896.
- Jordan, A., Pontis, E., Aslund, F., Hellman, U., Gibert, I., y Reichard, P. (1996) The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. Characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J Biol Chem* 271: 8779-8785.
- Jordan, A., y Reichard, P. (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 67: 71-98.
- Kaguni, J.M. (1997) *Escherichia coli* DnaA protein: the replication initiator. *Mol Cells* 7: 145-157.
- Kang, S., Han, J.S., Park, J.H., Skarstad, K., y Hwang, D.S. (2003) SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278: 48779-48785.
- Katayama, T., Kubota, T., Kurokawa, K., Crooke, E., y Sekimizu, K. (1998) The initiator function of DnaA protein is negatively

- regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94: 61-71.
- Kato, J., y Katayama, T. (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *Embo J* 20: 4253-4262.
- Kawakami, H., Su'etsugu, M., y Katayama, T. (2006) An isolated Hda-clamp complex is functional in the regulatory inactivation of DnaA and DNA replication. *J Struct Biol* 156: 220-229.
- Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* 64: 171-200.
- Keyamura, K., Fujikawa, N., Ishida, T., Ozaki, S., Su'etsugu, M., Fujimitsu, K., Kagawa, W., Yokoyama, S., Kurumizaka, H., y Katayama, T. (2007) The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP DnaA-specific initiation complexes. *Genes Dev* 21: 2083-2099.
- Kim, J., Wheeler, L.J., Shen, R., y Mathews, C.K. (2005a) Protein-DNA interactions in the T4 dNTP synthetase complex dependent on gene 32 single-stranded DNA-binding protein. *Mol Microbiol* 55: 1502-1514.
- Kim, M.S., Bae, S.H., Yun, S.H., Lee, H.J., Ji, S.C., Lee, J.H., Srivastava, P., Lee, S.H., Chae, H., Lee, Y., Choi, B.S., Chatteraj, D.K., y Lim, H.M. (2005b) Cnu, a novel oriC-binding protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 6998-7008.
- Kim, S., Dallmann, H.G., McHenry, C.S., y Marians, K.J. (1996) tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork. *J Biol Chem* 271: 21406-21412.
- King, G.F., Shih, Y.L., Maciejewski, M.W., Bains, N.P., Pan, B., Rowland, S.L., Mullen, G.P., y Rothfield, L.I. (2000) Structural basis for the topological specificity function of MinE. *Nat Struct Biol* 7: 1013-1017.
- Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P., y Andersson, K.K. (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* 1699: 1-34.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69: 425-437.
- Koppes, L.H., Woldringh, C.L., y Nanninga, N. (1978) Size variations and correlation of different cell cycle events in slow-growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 134: 423-433.

- Koppes, L.J., y Nanninga, N. (1980) Positive correlation between size at initiation of chromosome replication in *Escherichia coli* and size at initiation of cell constriction. *J Bacteriol* 143: 89-99.
- Kornberg, A. (1991) Control of initiation of the *Escherichia coli* chromosome. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 56: 275-278.
- Krause, M., y Messer, W. (1999) DnaA proteins of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: coordinate actions with single-stranded DNA-binding protein and interspecies inhibition during open complex formation at the replication origins. *Gene* 228: 123-132.
- Kuempel, P.L., Henson, J.M., Dircks, L., Tecklenburg, M., y Lim, D.F. (1991) dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol* 3: 799-811.
- Kuo, M.H., y Allis, C.D. (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19: 425-433.
- LaDuca, R.J., Crute, J.J., McHenry, C.S., y Bambara, R.A. (1986) The beta subunit of the *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme interacts functionally with the catalytic core in the absence of other subunits. *J Biol Chem* 261: 7550-7557.
- Langer, U., Richter, S., Roth, A., Weigel, C., y Messer, W. (1996) A comprehensive set of DnaA-box mutations in the replication origin, oriC, of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 301-311.
- Lau, I.F., Filipe, S.R., Soballe, B., Okstad, O.A., Barre, F.X., y Sherratt, D.J. (2003) Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* 49: 731-743.
- Lemon, K.P., y Grossman, A.D. (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* 282: 1516-1519.
- Lemon, K.P., y Grossman, A.D. (2000) Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol Cell* 6: 1321-1330.
- Lemon, K.P., y Grossman, A.D. (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev* 15: 2031-2041.
- Leonard, A.C., y Grimwade, J.E. (2005) Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol* 55: 978-985.
- Li, Y., y Austin, S. (2002) The P1 plasmid in action: time-lapse photomicroscopy reveals some unexpected aspects of plasmid partition. *Plasmid* 48: 174-178.

- Li, Z., Kitchen, J.L., Boeneman, K., Anand, P., y Crooke, E. (2005) Restoration of growth to acidic phospholipid-deficient cells by DnaA(L366K) is independent of its capacity for nucleotide binding and exchange and requires DnaA. *J Biol Chem* 280: 9796-9801.
- Lothar, H., Lurz, R., y Orr, E. (1984) DNA binding and antigenic specifications of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res* 12: 901-914.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., y Kleckner, N. (1994) SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77: 413-426.
- Mahaffy, J.M., y Zyskind, J.W. (1989) A model for the initiation of replication in *Escherichia coli*. *J Theor Biol* 140: 453-477.
- Maki, H., Horiuchi, T., y Kornberg, A. (1985) The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. I. Amplification of the dnaE gene product and polymerase activity of the alpha subunit. *J Biol Chem* 260: 12982-12986.
- Manwaring, J.D., y Fuchs, J.A. (1979) Relationship between deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in an nrdA mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 138: 245-248.
- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61: 673-719.
- Marians, K.J. (1995) Phi X174-type primosomal proteins: purification and assay. *Methods Enzymol* 262: 507-521.
- Mathews, C.K. (1976) Biochemistry of DNA-defective mutants of bacteriophage T4. Thymine nucleotide pool dynamics. *Arch Biochem Biophys* 172: 178-187.
- Mathews, C.K., y Sinha, N.K. (1982) Are DNA precursors concentrated at replication sites? *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 302-306.
- McGarry, K.C., Ryan, V.T., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (2004) Two discriminatory binding sites in the *Escherichia coli* replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2811-2816.
- McHenry, C.S., y Crow, W. (1979) DNA polymerase III of *Escherichia coli*. Purification and identification of subunits. *J Biol Chem* 254: 1748-1753.
- McHenry, C.S. (1988) DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 57: 519-550.
- McHenry, C.S. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol* 49: 1157-1165.

- McInerney, P., Johnson, A., Katz, F., y O'Donnell, M. (2007) Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Mol Cell* 27: 527-538.
- Meijer, M., Beck, E., Hansen, F.G., Bergmans, H.E., Messer, W., von Meyenburg, K., y Schaller, H. (1979) Nucleotide sequence of the origin of replication of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 580-584.
- Messer, W., Meijer, M., Bergmans, H.E., Hansen, F.G., von Meyenburg, K., Beck, E., y Schaller, H. (1979) Origin of replication, oriC, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 1: 139-145.
- Messer, W. (2002) The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* 26: 355-374.
- Migocki, M.D., Lewis, P.J., Wake, R.G., y Harry, E.J. (2004) The midcell replication factory in *Bacillus subtilis* is highly mobile: implications for coordinating chromosome replication with other cell cycle events. *Mol Microbiol* 54: 452-463.
- Miller, J.F. (1992) A short course in bacterial genetics. Cold spring Harb. Press.
- Mizushima, T., Tanino, J., Miki, T., y Sekimizu, K. (1996) Decrease in the linking number of plasmid DNA in dnaA mutants of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 137-141.
- Molina, F., Jimenez-Sanchez, A., y Guzman, E.C. (1998) Determining the optimal thymidine concentration for growing Thy- *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 180: 2992-2994.
- Molina, F., y Skarstad, K. (2004) Replication fork and SeqA focus distributions in *Escherichia coli* suggest a replication hyperstructure dependent on nucleotide metabolism. *Mol Microbiol* 52: 1597-1612.
- Molina, F., Sánchez Romero, M.A., y Jiménez-Sánchez, A. (2008) Dynamic organization of replication forks into factories in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 43: 7.
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D.R., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., y Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* 9: 23-30.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Alamo, M.J., Holmgren, A., y Pueyo, C. (2001) Expression analysis of the nrdHIEF operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo. *J Biol Chem* 276: 18031-18037.

- Mott, M.L., and Berger, J.M. (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 5: 343-354.
- Mulugu, S., Potnis, A., Shamsuzzaman, Taylor, J., Alexander, K., y Bastia, D. (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9569-9574.
- Neylon, C., Kralicek, A.V., Hill, T.M., y Dixon, N.E. (2005) Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 501-526.
- Nielsen, H.J., Youngren, B., Hansen, F.G., y Austin, S. (2007) Dynamics of *Escherichia coli* chromosome segregation during multifork replication. *J Bacteriol* 189: 8660-8666.
- Nielsen, O., and Lobner-Olesen, A. (2008) Once in a lifetime: strategies for preventing re-replication in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO Rep* 9: 151-156.
- Nievera, C., Torgue, J.J., Grimwade, J.E., y Leonard, A.C. (2006) SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the E. coli pre-RC. *Mol Cell* 24: 581-592.
- Niki, H., Hiraga, S., y Moriya, S. (2000a) [Progressing molecular cell biology in bacteria: chromosome partitioning and cell division]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45: 153-163.
- Niki, H., Yamaichi, Y., y Hiraga, S. (2000b) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 14: 212-223.
- Nollmann, M., Stone, M.D., Bryant, Z., Gore, J., Crisona, N.J., Hong, S.C., Mittelheiser, S., Maxwell, A., Bustamante, C., y Cozzarelli, N.R. (2007) Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol* 14: 264-271.
- Nordlund, P., y Eklund, H. (1993) Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J Mol Biol* 232: 123-164.
- Nordlund, P., y Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 75: 681-706.
- Norris, V., Ayala, J.A., Begg, K., Bouche, J.P., Bouloc, P., Boye, E., Canvin, J., Casaregola, S., Cozzone, A.J., Crooke, E., y et al. (1994) Cell cycle control: prokaryotic solutions to eukaryotic problems? *J Theor Biol* 168: 227-230.
- Norris, V. (1995) Hypotheses and the regulation of the bacterial cell cycle. *Mol Microbiol* 15: 785-787.

- Norris, V., Alexandre, S., Bouligand, Y., Cellier, D., Demarty, M., Grehan, G., Gouesbet, G., Guespin, J., Insinna, E., Le Sceller, L., Maheu, B., Monnier, C., Grant, N., Onoda, T., Orange, N., Oshima, A., Picton, L., Polaert, H., Ripoll, C., Thellier, M., Valleton, J.M., Verdus, M.C., Vincent, J.C., White, G., y Wiggins, P. (1999) Hypothesis: hyperstructures regulate bacterial structure and the cell cycle. *Biochimie* 81: 915-920.
- Norris, V., Fralick, J., y Danchin, A. (2000) A SeqA hyperstructure and its interactions direct the replication and sequestration of DNA. *Mol Microbiol* 37: 696-702.
- Norris, V., Demarty, M., Raine, D., Cabin-Flaman, A., y Le Sceller, L. (2002) Hypothesis: hyperstructures regulate initiation in *Escherichia coli* and other bacteria. *Biochimie* 84: 341-347.
- Norris, V., den Blaauwen, T., Doi, R.H., Harshey, R.M., Janniere, L., Jimenez-Sanchez, A., Jin, D.J., Levin, P.A., Mileykovskaya, E., Minsky, A., Misevic, G., Ripoll, C., Saier, M., Jr., Skarstad, K., y Thellier, M. (2007) Toward a hyperstructure taxonomy. *Annu Rev Microbiol* 61: 309-329.
- Ogawa, T., Pickett, G.G., Kogoma, T., y Kornberg, A. (1984) RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1040-1044.
- Ohsumi, K., Yamazoe, M., y Hiraga, S. (2001) Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. *Mol Microbiol* 40: 835-845.
- Okazaki, T. (2002) [Okazaki furagments and discontinuous replication]. *Seikagaku* 74: 103-117.
- Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M., y Reichard, P. (1996) The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J Biol Chem* 271: 9410-9416.
- Onogi, T., Niki, H., Yamazoe, M., y Hiraga, S. (1999) The assembly and migration of SeqA-Gfp fusion in living cells of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31: 1775-1782.
- Onogi, T., Ohsumi, K., Katayama, T., y Hiraga, S. (2002) Replication-dependent recruitment of the beta-subunit of DNA polymerase III from cytosolic spaces to replication forks in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 867-870.
- Onrust, R., Finkelstein, J., Turner, J., Naktinis, V., y O'Donnell, M. (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one

- holoenzyme particle. III. Interface between two polymerases and the clamp loader. *J Biol Chem* 270: 13366-13377.
- Pages, V., y Fuchs, R.P. (2003) Uncoupling of leading- and lagging-strand DNA replication during lesion bypass in vivo. *Science* 300: 1300-1303.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R., y Blakley, R.L. (1972) A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemistry* 11: 2378-2388.
- Perals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., y Louarn, J.M. (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* 36: 33-43.
- Perals, K., Capiiaux, H., Vincourt, J.B., Louarn, J.M., Sherratt, D.J., y Cornet, F. (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39: 904-913.
- Platz, A., y Sjoberg, B.M. (1980) Construction and characterization of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli* nrd region. *J Bacteriol* 143: 561-568.
- Polaczek, P. (1998) Is the dnaA promoter region in *Escherichia coli* an evolutionary junkyard of physiologically insignificant regulatory elements? *Mol Microbiol* 27: 1089-1090.
- Polaczek, P., Kwan, K., y Campbell, J.L. (1998) GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and N6-adenine methylation status: possible implications for DNA-protein recognition. *Mol Gen Genet* 258: 488-493.
- Pomerantz, R.T., and O'Donnell, M. (2007) Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol* 15: 156-164.
- Pritchard, A.E., Dallmann, H.G., Glover, B.P., y McHenry, C.S. (2000) A novel assembly mechanism for the DNA polymerase III holoenzyme DnaX complex: association of delta-delta' with DnaX(4) forms DnaX(3)delta-delta'. *Embo J* 19: 6536-6545.
- Pritchard, R.H., y Zaritsky, A. (1970) Effect of thymine concentration on the replication velocity of DNA in a thymineless mutant of *Escherichia coli*. *Nature* 226: 126-131.
- Recchia, G.D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G., y Sherratt, D.J. (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *Embo J* 18: 5724-5734.

- Reddy, G.P., y Mathews, C.K. (1978) Functional compartmentation of DNA precursors in T4 phage-infected bacteria. *J Biol Chem* 253: 3461-3467.
- Reems, J.A., Wood, S., y McHenry, C.S. (1995) *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme subunits alpha, beta, and gamma directly contact the primer-template. *J Biol Chem* 270: 5606-5613.
- Reichard, P., y Ehrenberg, A. (1983) Ribonucleotide reductase--a radical enzyme. *Science* 221: 514-519.
- Reichard, P. (1993) The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268: 8383-8386.
- Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Trends Biochem Sci* 22: 81-85.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O., y Sherratt, D.J. (2008) Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* 133: 90-102.
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K., y Nash, H.A. (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87: 1295-1306.
- Riola, J., Guarino, E., Guzman, E.C., y Jimenez-Sanchez, A. (2007) Differences in the degree of inhibition of NDP reductase by chemical inactivation and by the thermosensitive mutation *nrdA101* in *Escherichia coli* suggest an effect on chromosome segregation. *Cell Mol Biol Lett* 12: 70-81.
- Rodionov, D.A., y Gelfand, M.S. (2005) Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* 21: 385-389.
- Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Nievera, C.J., y Leonard, A.C. (2002) IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli* *oriC* by two different mechanisms. *Mol Microbiol* 46: 113-124.
- Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Camara, J.E., Crooke, E., y Leonard, A.C. (2004) *Escherichia coli* prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol* 51: 1347-1359.
- Ryter, A., y Jacob, F. (1966) [Morphologic study of the relationship of the membrane wall in *E. coli* and the protoplasts of *B. subtilis*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 110: 801-812.
- Schaper, S., y Messer, W. (1995) Interaction of the initiator protein DnaA of *Escherichia coli* with its DNA target. *J Biol Chem* 270: 17622-17626.

- Sciochetti, S.A., Piggot, P.J., Sherratt, D.J., y Blakely, G. (1999) The ripX locus of *Bacillus subtilis* encodes a site-specific recombinase involved in proper chromosome partitioning. *J Bacteriol* 181: 6053-6062.
- Sharma, B., y Hill, T.M. (1992) TerF, the sixth identified replication arrest site in *Escherichia coli*, is located within the rcsC gene. *J Bacteriol* 174: 7854-7858.
- Sharma, B., y Hill, T.M. (1995) Insertion of inverted Ter sites into the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome delays completion of DNA replication and disrupts the cell cycle. *Mol Microbiol* 18: 45-61.
- Shen, R., Wheeler, L.J., y Mathews, C.K. (2006) Molecular interactions involving *Escherichia coli* nucleoside diphosphate kinase. *J Bioenerg Biomembr* 38: 255-259.
- Shigekawa, K., y Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 6: 742-751.
- Skarstad, K., Steen, H.B., y Boye, E. (1983) Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry. *J Bacteriol* 154: 656-662.
- Skarstad, K., Steen, H.B., y Boye, E. (1985) *Escherichia coli* DNA distributions measured by flow cytometry and compared with theoretical computer simulations. *J Bacteriol* 163: 661-668.
- Skarstad, K., y Boye, E. (1993) Degradation of individual chromosomes in recA mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 5505-5509.
- Skarstad, K., y Boye, E. (1994) The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. *Biochim Biophys Acta* 1217: 111-130.
- Slater, S., Wold, S., Lu, M., Boye, E., Skarstad, K., y Kleckner, N. (1995) *E. coli* SeqA protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* 82: 927-936.
- Slater, S.C., Lifshics, M.R., O'Donnell, M., y Maurer, R. (1994) holE, the gene coding for the theta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*: characterization of a holE mutant and comparison with a dnaQ (epsilon-subunit) mutant. *J Bacteriol* 176: 815-821.
- Steiner, W.W., y Kuempel, P.L. (1998) Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J Bacteriol* 180: 6269-6275.
- Stubbe, J. (2000) Ribonucleotide reductases: the link between an RNA and a DNA world? *Curr Opin Struct Biol* 10: 731-736.

- Stubbe, J., Ge, J., y Yee, C.S. (2001) The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Trends Biochem Sci* 26: 93-99.
- Studwell, P.S., y O'Donnell, M. (1990) Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 265: 1171-1178.
- Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1993) DNA polymerase III accessory proteins. V. Theta encoded by holE. *J Biol Chem* 268: 11785-11791.
- Stukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S., y O'Donnell, M. (1991) Mechanism of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 266: 11328-11334.
- Su'etsugu, M., Takata, M., Kubota, T., Matsuda, Y., y Katayama, T. (2004) Molecular mechanism of DNA replication-coupled inactivation of the initiator protein in *Escherichia coli*: interaction of DnaA with the sliding clamp-loaded DNA and the sliding clamp-Hda complex. *Genes Cells* 9: 509-522.
- Sugimoto, K., Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., Nishimura, A., Yasuda, Y., y Hirota, Y. (1979) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* K-12 replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 575-579.
- Sun, L., y Fuchs, J.A. (1992) *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell* 3: 1095-1105.
- Sun, L., y Fuchs, J.A. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* nrd operon: role of DNA supercoiling. *J Bacteriol* 176: 4617-4626.
- Sun, Q., y Margolin, W. (2004) Effects of perturbing nucleoid structure on nucleoid occlusion-mediated toporegulation of FtsZ ring assembly. *J Bacteriol* 186: 3951-3959.
- Sun, X., Ollagnier, S., Schmidt, P.P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliasson, R., Graslund, A., Fontecave, M., Reichard, P., y Sjoberg, B.M. (1996) The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. *J Biol Chem* 271: 6827-6831.
- Sunako, Y., Onogi, T., y Hiraga, S. (2001) Sister chromosome cohesion of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 42: 1233-1241.
- Thelander, L., and Reichard, P. (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* 48: 133-158.
- Torheim, N.K., Boye, E., Lobner-Olesen, A., Stokke, T., y Skarstad, K. (2000) The *Escherichia coli* SeqA protein destabilizes mutant DnaA204 protein. *Mol Microbiol* 37: 629-638.
- Torrents, E., Buist, G., Liu, A., Eliasson, R., Kok, J., Gibert, I., Graslund, A., y Reichard, P. (2000) The anaerobic (class III) ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Catalytic

- properties and allosteric regulation of the pure enzyme system. *J Biol Chem* 275: 2463-2471.
- Tougu, K., Peng, H., y Marians, K.J. (1994) Identification of a domain of *Escherichia coli* primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J Biol Chem* 269: 4675-4682.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
- Trueba, F.J., y Koppes, L.J. (1998) Exponential growth of *Escherichia coli* B/r during its division cycle is demonstrated by the size distribution in liquid culture. *Arch Microbiol* 169: 491-496.
- Tsai, P.K., y Hogenkamp, H.P. (1980) The purification and characterization of an adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside diphosphate reductase from *Corynebacterium nephridii*. *J Biol Chem* 255: 1273-1278.
- Tsuchihashi, Z., y Kornberg, A. (1990) Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2516-2520.
- Turner, J., Hingorani, M.M., Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1999) The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *Embo J* 18: 771-783.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., y Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15264-15269.
- von Freiesleben, U., Krekling, M.A., Hansen, F.G., y Lobner-Olesen, A. (2000) The eclipse period of *Escherichia coli*. *Embo J* 19: 6240-6248.
- Wang, T.C. (2005) Discontinuous or semi-discontinuous DNA replication in *Escherichia coli*? *Bioessays* 27: 633-636.
- Watt, R.M., Wang, J., Leong, M., Kung, H.F., Cheah, K.S., Liu, D., Danchin, A., y Huang, J.D. (2007) Visualizing the proteome of *Escherichia coli*: an efficient and versatile method for labeling chromosomal coding DNA sequences (CDSs) with fluorescent protein genes. *Nucleic Acids Res* 35: e37.
- Weigel, C., y Seitz, H. (2002) Strand-specific loading of DnaB helicase by DnaA to a substrate mimicking unwound oriC. *Mol Microbiol* 46: 1149-1156.
- Weinberger, M., y Helmstetter, C.E. (1979) Chromosome replication and cell division in plasmid-containing *Escherichia coli* B/r. *J Bacteriol* 137: 1151-1157.

- Weiss, D.S. (2004) Bacterial cell division and the septal ring. *Mol Microbiol* 54: 588-597.
- Werner, R. (1971) Mechanism of DNA replication. *Nature* 230: 570-572.
- Wold, S., Skarstad, K., Steen, H.B., Stokke, T., y Boye, E. (1994) The initiation mass for DNA replication in *Escherichia coli* K-12 is dependent on growth rate. *Embo J* 13: 2097-2102.
- Woldringh, C.L., y Nanninga, N. (2006) Structural and physical aspects of bacterial chromosome segregation. *J Struct Biol* 156: 273-283.
- Yamazoe, M., Adachi, S., Kanaya, S., Ohsumi, K., y Hiraga, S. (2005) Sequential binding of SeqA protein to nascent DNA segments at replication forks in synchronized cultures of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55: 289-298.
- Yao, N., Hurwitz, J., y O'Donnell, M. (2000) Dynamics of beta and proliferating cell nuclear antigen sliding clamps in traversing DNA secondary structure. *J Biol Chem* 275: 1421-1432.
- Yasuda, S., y Hirota, Y. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5458-5462.
- Yee, C.S., Seyedsayamdost, M.R., Chang, M.C., Nocera, D.G., y Stubbe, J. (2003) Generation of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by intein chemistry: insertion of 3-nitrotyrosine at residue 356 as a probe of the radical initiation process. *Biochemistry* 42: 14541-14552.
- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992a) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. II. Frequency of primer synthesis and efficiency of primer utilization control Okazaki fragment size. *J Biol Chem* 267: 4045-4053.
- Zechner, E.L., Wu, C.A., y Marians, K.J. (1992b) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the *Escherichia coli* DNA replication fork. III. A polymerase-primase interaction governs primer size. *J Biol Chem* 267: 4054-4063.



ÍNDICE DE FIGURAS Y
TABLAS

Índice de figuras



Introducción

Figura 1. El ciclo celular bacteriano.....	11
Figura 2. Puntos de replicación y número de orígenes por célula en función de la edad celular. Fases del ciclo celular en cultivos creciendo lentamente y rápidamente (modificado Jiménez-Sánchez, 1998).....	13
Figura 3. Secuencia de <i>oriC</i> (modificado de Jiménez-Sánchez, 1998).....	15
Figura 4. Remodelación de <i>oriC</i> mediado por la proteína DnaA (modificado de Mott y Berger, 2007).....	17
Figura 5. Mecanismo de iniciación de la replicación y la prevención de la re-replicación en <i>E. coli</i> (modificado de Nielsen & Lobner-Olesen).....	19
Figura 6. Organización del replisoma de <i>E.coli</i> (modificado de Pomerantz y O'Donnel, 2007).....	20
Figura 7. Modelos de partición o migración cromosómica en <i>E.coli</i>	25
Figura 8. Modelos de organización de la replicación del DNA (modificado de Hiraga, 2000)	28
Figura 9. Esquema de la enzima RNR (propuesto por Thelander y Reichard, 1979).	30
Figura 10. Promotor del gen <i>nrdAB</i> (modificado de Herrick y Sclavi, 2006).	32
Figura 11. Modelo para explicar la relación entre la síntesis de dNTP y la replicación del DNA mediada por el factor de iniciación DnaA.....	33

Materiales

Figura 12. Esquema representativo del plásmido pKD46.....	1
--	---

Figura 13. Esquema representativo del plásmido pSUB11 con la secuencia completa del epítipo 3xFLAG.....	2
Figura 14. Esquema representativo del plásmido pSU314 con la secuencia completa del epítipo HA (proteína hemaglutinina influenza humana).....	2
Figura 15. Esquema representativo del plásmido pCP20.	3
Figura 16. Esquema representativo del plásmido pPS2.....	43

Métodos

Figura 17. Protocolo para el etiquetado de genes basado en la recombinación homóloga.....	62
Figura 18. Electroforesis para comprobar si la amplificación de la secuencia que se va a insertar tiene el tamaño adecuado.....	63
Figura 19. Electroforesis para comprobar si la inserción se ha producido en el lugar correcto.	65
Figura 20. Western Blot para comprobar la especificidad de los anticuerpos en un gel al 12%.....	66

Resultados

Capítulo 1. Localización y organización de las horquillas de replicación

Figura 21. Inmunolocalización de la proteína SeqA en la estirpe CMT931 (nrdB::3xFLAG).....	82
Figura 22. Posiciones subcelulares de los focos de la proteína SeqA en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.....	83
Figura 23. Estudio de la proteína SeqA en cultivos sincronizados.....	84
Figura 24. ChIP-on-chip en células sincronizadas a diferentes tiempos con el anticuerpo anti-SeqA.....	

Figura 25. Organización de las horquillas de replicación en células creciendo exponencialmente de la estirpe CMT931..... 88

Figura 26. Fracción del nucleoide ocupada por las horquillas de replicación..... 89

Figura 27. Análisis de la cohesión de las horquillas de replicación: comparación de las relaciones horquillas/focos y puntos de replicación/células..... 93

Figura 28. Inmunolocalización de la proteína SeqA y análisis del número de focos en células de las estirpes JK607 (nrdA+) y JS1018 (nrdA101). Distribución del contenido de DNA y masa por célula de las estirpes JK607 y JS1018 (D-F y J-L, respectivamente). 95

Capítulo 2. Localización y organización de la maquinaria de replicación: subunidad τ de la DNA polimerasa III y helicasa DnaB

Figura 29. Ciclo celular de la estirpe CMT927, CMT936 y CMT937. 98

Figura 30. Inmunolocalización de la subunidad τ de la DNA polimerasa III en la estirpe CMT936 (dnaX::HA nrdB::3xFLAG)..... 98

Figura 31. Posiciones subcelulares de los focos de la subunidad τ en cultivos creciendo en medio mínimo con glicerol a 37°C. 99

Figura 32. Longitud celular promedio de células con 1, 2, 3 y 4 focos de la subunidad τ de la DNA polimerasa III y de la helicasa DnaB en cultivos creciendo en glicerol a 37°C..... 100

Figura 33. Distribución de la subunidad τ en función de la longitud celular y de los grupos de células en distintas fases del ciclo..... 102

Figura 34. Inmunolocalización de la helicasa DnaB en células de *E.coli* creciendo en glicerol. 103

Figura 35. Posiciones subcelulares de los focos de la subunidad τ en cultivos creciendo con glicerol a 37°C..... 104

Figura 36. Distribución celular de la helicasa DnaB en función de la longitud celular y de las edades celulares..... 106

Figura 37. Doble inmunolocalización de la proteína SeqA con la subunidad τ de la DNA polimerasa III y con la helicasa DnaB en células de <i>E. coli</i> creciendo en glicerol.....	107
Figura 38. Análisis comparativo del número de focos de SeqA con DnaX y DnaB (B).....	108
Figura 39. Comparación del porcentaje de células con 1, 2, 3 y 4 focos de la subunidad τ , de la helicasa DnaB y de la proteína SeqA en cultivos creciendo en glicerol a 37°C.	109
Figura 40. Distribución espacial comparativa de la proteína SeqA frente a la subunidad τ de la DNA polimerasa III y a la DnaB helicasa en cultivos creciendo en medio mínimo con glicerol a 37°C.....	110
Figura 41. Análisis de la colocalización entre la proteína SeqA y las proteínas de la maquinaria de replicación, DnaX y DnaB.....	111

Capítulo 3. Localización y organización de la ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) aeróbica de *E. coli*

Figura 42. Ciclo celular de la estirpe CMT927 y CMT931 creciendo en glicerol, medio mínimo con glucosa o glucosa con casaaminoácidos.	114
Figura 43. Inmunolocalización de la subunidad B2 de la proteína NrdB en células de <i>E. coli</i> creciendo en glicerol, glucosa o glucosa con casaaminoácidos.....	114
Figura 44. Número medio de puntos de replicación y de focos NrdB por célula en la estirpe CMT931 en células creciendo en medio mínimo con glicerol, glucosa o glucosa con casaaminoácidos. Número de focos de RNR relativo al tamaño celular en CMT931 creciendo exponencialmente en glicerol o en glucosa con casaaminoácidos	116
Figura 45. Síntesis relativa de DNA de cultivos sincronizados de la estirpe CMT931. Porcentaje de células con diferente número de focos NrdB en células sincronizados con el alelo <i>dnaC2</i>	117
Figura 46. Posiciones subcelulares de los focos de la proteína NrdB en cultivos creciendo con glicerol a 37°C.....	118

Figura 47. Doble inmunolocalización de la proteína NrdB con la subunidad τ de la DNA polimerasa III, con la helicasa DnaB y con la proteína SeqA en células de *E.coli* creciendo en glicerol..... 119

Figura 48. Análisis comparativo del número de focos de la proteína NrdB con las proteínas DnaX, DnaB y SeqA..... 120

Figura 49. Distribución celular de las proteínas NrdB y DnaX, NrdB y DnaB y NrdB y SeqA, analizadas conjuntamente en la misma célula, en función de la longitud celular.... 121

Figura 50. Distribución celular de las proteínas NrdB y DnaX, NrdB y DnaB y NrdB y SeqA, analizadas conjuntamente en la misma célula, en función de la edad celular..... 122

Figura 51. Distribución espacial comparativa de la proteína NrdB frente a las proteínas DnaX, DnaB y SeqA en cultivos creciendo en glicerol a 37°C..... 124

Figura 52. Análisis de la distancia interfocal frente a la fracción del nucleoide ocupada por los focos para las proteínas NrdB y DnaX, NrdB y DnaB y NrdB y SeqA y análisis de la colocalización entre la proteína NrdB y las proteínas DnaX , DnaB y SeqA. 125

Figura 53. ChIP-on-chip de cultivos sincronizados con una sola ronda de replicación en funcionamiento para la proteína NrdB usando el anticuerpo comercial 3XFLAG..... 126

Índice de tablas



Tabla 1. Estirpes de *E. coli* K-12 empleadas en este trabajo. 39

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados, objetivo del cebador y producto de PCR. 50

Tabla 3. Número medio de focos de replicación en 16 cultivos seleccionados 91

