

Tesis de Posgrado

Replicación de plásmidos en *Escherichia coli* recBC sbcBC

Bellani, Marina

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bellani, Marina. (2002). Replicación de plásmidos en *Escherichia coli* recBC sbcBC. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3454_Bellani.pdf

Cita tipo Chicago:

Bellani, Marina. "Replicación de plásmidos en *Escherichia coli* recBC sbcBC". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3454_Bellani.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Replicación de plásmidos en *Escherichia coli* recBC sbcBC

Trabajo presentado para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

Tesista: Bioquímica Marina Bellani.

Director: Dra. Carmen Sánchez Rivas.

Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Nº 3 4 5 4

Buenos Aires, 2002

A Damián, por impulsarme a completar este ciclo, a pesar de todo.
Por iluminar mi vida con sonrisas y la certeza de amar y sentirme amada.

A mis padres por enseñarme a amar y procurar dar lo mejor de mí
en todo lo que emprenda, ¡ Forza !

a Fla, Luchi y Flor, por regalarme tantos preciosos momentos
que ni el tiempo ni las circunstancias podrán deslucir jamás.

A la familia Cairatti, por adoptarme como una Cairatti más
por la calidez con la que me reciben siempre y el cariño que me brindan,
a Jose y Florencio, por esos bracitos que se extienden y lo dicen todo.

A los amigos que me han ido adoptando a lo largo de estos años,
por ese cariño incondicional,
por estar en las buenas y en las malas,
por tantos momentos memorables.

Quisiera agradecer a todas las personas que contribuyeron de algún modo a que este trabajo pudiera concretarse:

la Dra. Rivas, directora de esta tesis, por iniciarme en la investigación dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su estímulo y apoyo,

Adri, Ale, Clau y Leo, por convertir todas las penurias compartidas en el *calidarium* 'la esporita' en motivo de ironía y sonrisas, tengo la certeza de extrañarlos siempre,

Marian y Sandra, por tantos momentos compartidos y palabras de aliento cuando más las necesitaba,

mis vecinos de laboratorio: Luciano, Nancy, Julia y Ximena, por charlas de pasillo memorables y por sacarme de apuro más de una vez en horarios estrambóticos, sábados, domingos,

Eduardo, Ceci, Julieta y Mariela por recibirme siempre con una sonrisa y facilitarme tantas cosas incondicionalmente.

Silvia y Paula por esa visceralidad para hacerse cargo de las cosas, en un lugar en el que los problemas comunes parecen no competerle a nadie, y por la solidaridad con la que me ayudaron a resolver tantos imprevistos de último momento,

la Dra. Moreno, por la generosidad con la que comparte su biblioteca a puertas abiertas,

a todos los que contribuyen a hacer de este ámbito un lugar habitable, con sonrisas, gestos y palabras,

a todos los investigadores que me facilitaron cepas y enriquecieron el trabajo con discusiones interesantes, ya sea personalmente o por correo electrónico, en particular los doctores B. Michel, A. Kuzminov, H. Masai, S. Sandler y A.J. Clark,

finalmente quisiera agradecer a la gente de Edenor y al Arquitecto por forjar mi voluntad, a fuerza de tantos cortes de luz y la negativa recurrente de prender el grupo electrógeno.

Resumen

Este trabajo estudia la replicación de plásmidos en *Escherichia coli* *recBC sbcB sbcCD*, un contexto Rec⁺, en el cual se amplifican procesos de recombinación que involucran intermediarios conteniendo extremos doble cadena (en función de la deficiencia en RecBCD). En este contexto genético, plásmidos con diversos orígenes de replicación acumulan multímeros lineales de muy alto peso molecular denominados HMW. Se re-evaluó el proceso de generación de multímeros HMW en el contexto *recBC sbcBC*, a la luz de los nuevos conceptos vigentes acerca de la interrelación replicación / recombinación.

Durante la primer etapa del trabajo, se utilizó el sistema de recombinación específico-de-sitio del transposón $\gamma\delta$ para poner a punto un sistema de complementación regulable, que permitiera generar células conteniendo un mínimo porcentaje de multímeros, para analizar luego la síntesis de HMW a lo largo de la curva de crecimiento. Utilizando este sistema, se demostró que las células *recBC sbcBCD* pueden sintetizar multímeros del plásmido descontroladamente, durante las primeras horas de la fase estacionaria. La capacidad de replicar descontroladamente el plásmido durante la fase estacionaria está determinada por las condiciones de cultivo y depende en parte de la respuesta de fase estacionaria, gobernada por el regulador de la respuesta general al estrés σ^S .

Una vez establecida la cinética de acumulación de HMW, se realizó un análisis genético para individualizar las funciones celulares involucradas en la síntesis de estos multímeros. Se analizó la incidencia de anular funciones de recombinación (RecA, RecF, RecR, LexA) y funciones involucradas en el re-inicio de la replicación sobre una horquilla restaurada (PriA, PriC, Rep), sobre la capacidad de las células de sintetizar HMW. La comprobación de que PriA resulta indispensable para la generación de HMW en un contexto RecBC⁻ SbcBC⁻, constituye una evidencia de que la generación de HMW involucra el colapso de intermediarios normales de replicación del plásmido y el reinicio de la replicación por un mecanismo alternativo.

En base a los resultados reportados, se proponen dos modelos para explicar el mecanismo de generación de HMW, que involucran el colapso de un intermediario de replicación y el restablecimiento de la replicación por un mecanismo de invasión/replicación entre multímeros lineales (similar al que utiliza T4 en su etapa tardía de replicación) o por un mecanismo de tipo círculo rodante (equivalente al utilizado por el fago λ para generar concatémeros).

palabras clave: *Escherichia coli* , replicación, recombinación, plásmido, multímeros, PriA , $\gamma\delta$

Abstract

This work studies plasmid replication in *Escherichia coli* *recBC sbcBC*, a Rec⁺ background, in which recombination processes involving linear DNA (or DNA molecules containing a double strand end) are amplified, given the deficiency in RecBCD characteristic of this genetic context. In *recBC sbcBC* cells, plasmids with diverse replication origins, were reported to accumulate high molecular weight linear multimers (HMW). During the course of this work we have re-evaluated the phenomenon of HMW synthesis, in terms of the current understanding of the link between replication, recombination and repair.

A complementation system was designed, based on the site-specific recombination system from transposon $\gamma\delta$, which permitted the reduction of the percentage of HMW in the culture to a minimum, in order to analyze the kinetics of HMW accumulation along the growth curve. This system allowed us to demonstrate that *recBC sbcBC* cells can synthesize plasmid multimers in an unregulated manner, during the first hours of stationary phase. The ability of non-growing cells to replicate the plasmid in an uncontrolled manner during stationary phase is determined by growth conditions and depends in part on the stationary phase response, which is regulated by σ^S (the regulator of the general stress response).

A genetic analysis was performed in order to characterize the cellular functions involved in HMW synthesis. We analyzed the effect of inactivating recombination functions (RecA, RecF, RecR, LexA) or genes involved in re-initiating replication upon replication fork repair (PriA, PriC, Rep), on the ability of the cells to synthesize HMW. PriA proved to be essential for HMW synthesis in a *RecBC⁻ SbcBC⁻* strain, providing strong evidence for a model for HMW synthesis involving replication fork collapse and re-initiation of plasmid replication through an alternative mechanism. We postulate two models to explain the alternative mechanisms to initiate the synthesis of HMW in a *recBC sbcBC* context.

Keywords: *Escherichia coli* , replication, recombination, plasmid, multimers, PriA, $\gamma\delta$

Abreviaturas

μCi.	microcurie
μg.	microgramos
μl.	microlitros
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNdc	ADN doble cadena
ADNsc	ADN simple cadena
Ap	ampicilina
ara	arabinosa
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ccc	ADN circular covalentemente cerrado
Ci.	curie
Cm	cloranfenicol
CR	círculo rodante
cSDR	replicación estable del ADN, constitutiva
D-loop	displacement loop (rulo de desplazamiento)
dNTP	desoxinucleótido 5'-fosfato
DO	densidad óptica
DOi	densidad óptica inicial
DSB	corte doble cadena
DSBR	reparación de cortes doble cadena
DSE	extremo doble cadena
DTT	di-tiotreitol
Edc	extremo doble cadena
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
FE	fase estacionaria
glu	glucosa
hs.	horas
iSDR	replicación estable del ADN, inducible
Km	kanamicina
Kpb.	kilopares de bases
LB	caldo LB (Luria Broth)
min.	minutos
ml.	mililitros
nm.	nanómetros
nt.	nucleótidos
ON	cultivo de 16 horas (durante la noche)
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PAS	sitio de ensamblaje de primosoma
pb.	pares de bases
Pol	ADN polimerasa
R-loop	estructura generada cuando una molécula de ARN invade un dúplex de ADN
RNAse	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDR	replicación estable del ADN (stable DNA replication)
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sm	estreptomycin
Sp	espectinomycin
SSC	tampón citrato de sodio-cloruro de sodio
SSG	brecha simple cadena (single stranded gap)
Tc	tetraciclina
TCA	ácido tricloro acético
Tris	tris hidroximetil-aminometano
ufc	unidades formadoras de colonias
ufp	unidades formadoras de placas de lisis
UV	ultravioleta
viab.	viabilidad (estimada como ufc/ml por unidad de DO)

Indice

Introducción

Prólogo	14
1 Replicación	
1.1 Replicación del genoma bacteriano	15
1.1.1. Inicio: ensamblaje del primosoma en oriC.	16
1.1.2 Elongación: el replisoma.	17
1.1.3 Localización de la maquinaria de replicación: replication factory.	18
1.1.4 Existencia de un primosoma alternativo: el primosoma Φ X174	19
1.2 Replicación de plásmidos	19
1.2.1 Plásmido ColE1: inicio de la replicación dependiente del primosoma Φ X174.	19
1.2.2 Regulación del inicio de la replicación:	20
1.2.3 Plásmido R1: inicio de la replicación independiente de PriA	20
1.3. Replicación de bacteriófagos: estrategias alternativas para iniciar la replicación	21
1.3.1 Fago Mu: Replicación por transposición. Inicio de la replicación sobre una estructura en Y.	21
1.3.2 Fago T4: Inicio de la replicación sobre un D-loop.	23
1.4 Sinopsis: mecanismos de inicio de la replicación en bacterias	25
2 Reparación	
2.1 Tipos de lesiones al ADN	27
2.2 Reparación de lesiones simple cadena [LSC]	27
2.2.1 BER [Base Excision Repair]: reparación por escisión de la base dañada.	29
2.2.2 NER [Nucleotide Excision Repair]: reparación por escisión de nucleótidos.	29
2.2.3 MMR [Methyl directed Mismatch Repair]:	29
2.3 Reparación de Lesiones doble cadena [LDC]	30
2.3.1 ¿ Qué ocurre cuando las dos cadenas están dañadas ?	30
2.3.2 ¿En qué circunstancias se generan LDC ?	30
3 Recombinación	
3.1 Modelo general de recombinación homóloga	32
3.2 Las dos vías de recombinación: RecB y RecF	34
4 Reparación de horquillas de replicación mediada por recombinación	
4.1 Procesamiento de la horquilla dañada	38
4.2 Reinicio de la replicación sobre la horquilla reparada: PriA y el primosoma de reparación.	40
4.3 Múltiples vías para ensamblar el primosoma de reparación.	44
4.4. Inducibilidad de los sistemas de reparación: la respuesta SOS.	45
5 Problemas que surgen al replicar y reparar por recombinación un genoma circular	
5.1 Resolución de `catenanes` y dímeros cromosómicos: Topo IV y el sistema Xer.	49
5.2 Resolución de dímeros plasmídicos.	52
5.3 Transposón $\gamma\delta$: sistema <i>res</i> -TnpR	53

6 El contexto <i>recBC sbcBC</i>	56
7 Replicación de plásmidos en el contexto <i>recBC sbcBC</i>: modelo en vigencia.	59
Hipótesis de trabajo y objetivos planteados	63
Resultados - Capítulo 1	64
1. Caracterización del fenómeno de acumulación de HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	
1.1. Puesta a punto de un sistema de complementación basado en el sistema de resolución <i>res-TnpR</i> .	67
1.1.1. <i>res-TnpR</i> es capaz de evitar que un plásmido acumule HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	67
1.1.2 Puesta a punto de un sistema de complementación para estudiar el fenómeno de acumulación de HMW	68
1.1.2.a El plásmido reporter pUC::res	68
1.1.2.b Complementación con pACYC::tnpR: expresión constitutiva de TnpR.	69
1.1.2.c Complementación con pGH156: expresión inducible de TnpR [promotor P _{lacUV5}]	69
1.1.2.d Complementación con pBAD::tnpR: expresión regulable de TnpR [promotor P _{BAD}]	70
1.1.2.e Ensayo de complementación con el plásmido pBADtnpR	72
1.2 Análisis de la cinética de acumulación de HMW utilizando el sistema de complementación pUCres/pBADtnpR	73
1.2.1 Cinética de acumulación de HMW durante la fase exponencial	73
1.2.2 Cinética de acumulación de HMW durante la fase estacionaria.	74
1.2.3. Evidencias de actividad replicativa durante la fase estacionaria	75
1.2.4. ¿ Un sistema de resolución activo evita que se dispare la actividad replicativa de FE ?	76
1.3. Cinética de acumulación de HMW de los plásmidos pUCres y pUCrestnpR	78
1.3.1. Efecto glucosa	78
1.3.2. ¿Qué ocurre en LB?	81
1.3.3. Subcultivos sucesivos en LB no logran erradicar el HMW por segregación.	84
1.3.4. Efecto glucosa y daño oxidativo	85
1.4. Sinopsis	88
Resultados- Capítulo 2	90
1. Requerimientos genéticos I:	
Funciones de recombinación involucradas en el procesamiento de un horquilla de replicación dañada.	
1.1 RecA y proteínas pre-sinápticas de la vía recF	94
1.2 ¿Se requiere RecA por su actividad recombinasa o como disparador de la respuesta SOS ?	97
1.3 RpoS: Fase estacionaria y 'Respuesta general al estrés'	98

2. Requerimientos genéticos II:

Funciones involucradas en el ensamblaje de un primosoma de reparación y el reinicio de la replicación.

2.1 Funciones que intervienen en el ensamblaje de un primosoma de reparación	103
2.1.1. PriA: el nexo entre la recombinación y la replicación.	103
2.1.2. Sobre-expresar PriA a partir de un plásmido incrementa la acumulación de HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i> .	104
2.1.3. ¿Puede generarse HMW en ausencia de PriA funcional ?	106
2.1.3.1 No es posible introducir la mutación $\Delta priA$ en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	106
2.1.3.2 Generación de un fenotipo transiente <i>RecBCD</i> ⁻ en el contexto $\Delta priA sbcBC sbcCD$	112
2.1.4. Las vías alternativas para generar un primosoma de reparación: mutantes <i>priC</i> y <i>rep</i> .	115
2.1.4.1 La vía independiente de PriA: mutantes <i>rep</i> .	115
2.1.4.2. La vía PriA/PriC: mutantes <i>priC</i> .	118
2.2 Vía RecB vs. Vía RecF: mutantes <i>recC</i> ₁₀₁₀	118
2.3 Reinicio de la replicación: Pol III sintetiza los multímeros HMW.	119
3. Discusión	121

Discusión	125
-----------	-----

Materiales y métodos	140
----------------------	-----

1. Materiales

1.1 Medios	142
1.2. Cepas	143
1.3. Plásmidos	144
1.3.1 Vectores y plásmidos provistos por otros laborator	144
1.3.2 Plásmidos construidos durante este trabajo	145
1.3.2.1 pUC $\gamma\delta$:	145
1.3.2.3 pUCres- <i>tnpR</i> :	145
1.3.2.4 pBAD- <i>tnpR</i> :	145
1.3.2.5 pGB ₂ - <i>priA</i> :	145
1.3.2.6 pWSK-117 y pWSK-119:	146
1.4 Cebadores	146

2. Metodología

2.1. Southern para analizar las formas del plásmido	148
2.1.1 Preparación de lisados totales de ADN:	148
2.1.2 Cuantificación:	148
2.1.3 Digestión con enzima de restricción:	148
2.1.4 Southern	148

2.1.4.a Gel y transferencia :	148
2.1.4.b Hibridación:	148
2.1.4.c Lavados:	148
5.1.4.d Detección y revelado:	148
2.1.4.e Densitometría:	149
2.2. Preparación de sondas biotiniladas por PCR	149
2.3. Western-blot para detectar TnpR	149
2.3.1 Preparación de extractos crudos de proteínas:	149
2.3.2 PAGE 15% y detección de TnpR por western-blot:	149
2.4. Ensayo de resolución in vivo, utilizando el plásmido pGH436	150
2.5. Estimación de la viabilidad de un cultivo	150
2.6. Actividad replicativa	150
2.7. Construcción de cepas por transducción con el fago P1 _{vir} .	150
2.8. Screening por colony-PCR [PCR a partir de colonia]	151
2.9 Obtención y transformación de células competentes:	151
2.10. Determinación de la sensibilidad a la luz ultravioleta (UV ^R)	152
2.11. Ensayo de segregación del plásmido pGB ₂ -priA	152
2.12. Generación de un fenotipo transiente RecBC ⁻ en el contexto $\Delta priA$ <i>sbcBC sbcCD</i>	152
2.13. Mantenimiento de las cepas	153
Bibliografía	154

Introducción

....Por qué nos hemos quedado ciegos, No lo sé, quizá algún día lleguemos a saber la razón, Quieres que te diga lo que estoy pensando, Dime, Creo que no nos quedamos ciegos, creo que estamos ciegos, Ciegos que ven, Ciegos que, viendo, no ven.

J. Saramago, Ensayo sobre la ceguera.

Prólogo	14
1 Replicación	
1.1 Replicación del genoma bacteriano	15
1.1.1 Inicio: ensamblaje del primosoma en oriC.	16
1.1.2 Elongación: el replisoma.	17
1.1.3 Localización de la maquinaria de replicación: replication factory.	18
1.1.4 Existencia de un primosoma alternativo: el primosoma Φ X174	19
1.2 Replicación de plásmidos	19
1.2.1 Plásmido ColE1: inicio de la replicación dependiente del primosoma Φ X174.	19
1.2.2 Regulación del inicio de la replicación:	20
1.2.3 Plásmido R1: inicio de la replicación independiente de PriA	20
1.3. Replicación de bacteriófagos: estrategias alternativas para iniciar la replicación	21
1.3.1 Fago Mu: Replicación por transposición. Inicio de la replicación sobre una estructura en Y.	21
1.3.2 Fago T4: Inicio de la replicación sobre un D-loop.	23
1.4 Sinopsis: mecanismos de inicio de la replicación en bacterias	25
2 Reparación	
2.1 Tipos de lesiones al ADN	27
2.2 Reparación de lesiones simple cadena [LSC]	27
2.2.1 BER [Base Excision Repair]: reparación por escisión de la base dañada.	29
2.2.2 NER [Nucleotide Excision Repair]: reparación por escisión de nucleótidos.	29
2.2.3 MMR [Methyl directed Mismatch Repair]:	29
2.3 Reparación de Lesiones doble cadena [LDC]	30
2.3.1 ¿Qué ocurre cuando las dos cadenas están dañadas ?	30
2.3.2 ¿En qué circunstancias se generan LDC ?	30
3 Recombinación	
3.1 Modelo general de recombinación homóloga	32
3.2 Las dos vías de recombinación: RecB y RecF	34
4 Reparación de horquillas de replicación mediada por recombinación	
4.1 Procesamiento de la horquilla dañada	38
4.2 Reinicio de la replicación sobre la horquilla reparada: PriA y el primosoma de reparación.	40
4.3 Múltiples vías para ensamblar el primosoma de reparación.	44
4.4. Inducibilidad de los sistemas de reparación: la respuesta SOS.	45
5 Problemas que surgen al replicar y reparar por recombinación un genoma circular	
5.1 Resolución de catenanes y dímeros cromosómicos: Topo IV y el sistema Xer.	49
5.2 Resolución de dímeros plásmídicos.	52
5.3 Transposon $\gamma\delta$: sistema res-TnpR	53
6 El contexto <i>recBC sbcBC</i>	56
7 Replicación de plásmidos en el contexto <i>recBC sbcBC</i>: modelo en vigencia.	59

Figuras

Figura 1 Replicación del genoma en <i>Escherichia coli</i> .	15
Figura 2 Ensamblaje del primosoma en <i>oriC</i>	16
Figura 3 Elongación catalizada por el replisoma	17
Figura 4 Inicio de la replicación del plásmido ColE1.	20
Figura 5 Inicio de la replicación del plásmido R1	21
Figura 6 Fago MU: replicación mediada por transposición	21
Figura 7 Fago Mu: Replicación a partir de una estructura en Y.	22
Figura 8 Genoma del fago T4: permutación circular y redundancia terminal.	23
Figura 9 Fago T4: Replicación dependiente de recombinación (RDR) a partir de un D-loop.	24
Figura 10 Establecimiento de replicación UNI o BI-direccional a partir del D-loop	25
Figura 11 BER: reparación por escisión de bases	26
Figura 12 NER: reparación por escisión de nucleótidos	28
Figura 13 MMR: reparación de mismatches dirigida por el patrón de metilación	29
Figura 14 Fundamento de la reparación de LDC.	30
Figura 15 Generación de LDC: cortes doble cadena (DSBreaks) y brechas simple cadena (SSGaps).	31
Figura 16 Recombinación homóloga en bacterias: modelo de reparación de cortes doble cadena.	33
Figura 17 Resoluciones posibles de un intermediario de recombinación conteniendo dos Estructuras de Holliday	35
Figura 18 Procesamiento de DSE por RecBCD.	36
Figura 19 Reparación de horquillas de replicación bloqueadas o colapsadas.	39
Figura 20 Ensamblaje de un primosoma de reparación sobre un D-loop.	43
Figura 21 Vías alternativas para ensamblar un primosoma de reparación.	44
Figura 22 Regulón SOS: detección del daño y transducción de la señal mediada por RecA/ADNsc	46
Figura 23 Cinética de inducción de los cuatro grupos de genes controlados por LexA	47
Figura 24 Formas topológicas y rol de las topoisomerasas celulares.	49
Figura 25 Recombinación específica de sitio catalizada por Integrasas y Resolvasas.	50
Figura 26 Resolución de dímeros cromosómicos por el sistema XerCD-FtsK	51
Figura 27 Interrelación existente entre la replicación, la recombinación y la segregación cromosómica.	52
Figura 28 Transposón $\gamma\delta$.	53
Figura 29 Transposición replicativa del transposón $\gamma\delta$	53
Figura 30 Resolución catalizada por el sistema <i>res-TnpR</i> . Restricciones topológicas.	53
Figura 32 Acumulación de HMW en <i>E.coli recBC sbcBC</i>	59
Figura 33 Análisis por P.F.G.E.	60
Figura 34 Modelo propuesto por A.J. Clark para explicar la generación de HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i> .	61

Tablas

Tabla 1 Proteínas del fago T4 involucradas en la replicación mediada por recombinación	25
Tabla 2 Funciones celulares que se inducen durante la respuesta SOS.	47

Prólogo

A mediados de la década del 60, Clark y Margulies reportaron que la proteína RecA era un factor necesario para la generación de recombinantes en ensayos de conjugación, inaugurando la extensa lista de funciones celulares involucradas en el proceso de recombinación homóloga. El año siguiente a su descubrimiento, se comprobó que las mutantes *recA* presentaban una marcada sensibilidad a la luz UV y los rayos X. De este modo, se puso en evidencia la estrecha relación existente entre los procesos de reparación y recombinación, prácticamente desde el descubrimiento de las funciones celulares involucradas en recombinación homóloga.

En 1984, durante su discurso de cierre del congreso sobre recombinación genética, que se llevó a cabo en Cold Spring Harbor, Alan Campbell resaltó que a pesar de los avances sustanciales en materia de la caracterización de los mecanismos de recombinación homóloga, se continuaba ignorando cuál era la función fisiológica de la maquinaria de recombinación celular. A continuación, se transcribe parte de ese discurso:

.....The function of general recombination has hardly surfaced at this symposium. Perhaps there was nothing constructive to say on the subject. I am left uncertain as to how many investigators in that area consider that the function is too obvious to require discussion, how many think that general recombination serves no useful function, and how many consider the question uninteresting or intractable.

But there is a real question that needs to be answered some time. Our immediate interest in learning that new recombination deficient mutants have been characterized (etc.) . . . derives from our interest in recombinational mechanisms. But we all know that the immediate selective value of those genes and products does not depend on their role in reshuffling genes in natural populations. The typical mutant deficient in general recombination is either sick or dead. Many recombination proteins play essential roles in replication or repair. Even in the case of the highly ordered process of recombination at meiosis, prevention of nondisjunction may be a more direct advantage than recombination itself.....

Pasaron diez años más hasta que se logró recabar las evidencias genéticas y bioquímicas que permitieron develar el rol esencial que cumple la maquinaria de recombinación en la fisiología bacteriana: la reparación de horquillas de replicación dañadas.

En los últimos años se ha puesto en evidencia que durante el crecimiento normal en condiciones aeróbicas, la gran mayoría de las horquillas de replicación sufre un bloqueo o colapso y debe ser reparada por recombinación para que logre completar el ciclo de replicación. El procesamiento de horquillas de replicación dañadas o colapsadas involucra a la maquinaria de recombinación y reparación en el proceso de replicación del genoma bacteriano.

Este trabajo estudia la replicación de plásmidos en el contexto *recBC sbcB sbcCD*, en el marco del modelo vigente de replicación mediada por recombinación en bacterias. Dado que la hipótesis de trabajo utilizada para plantear esta Tesis se basa en la reparación de horquillas de replicación mediada por recombinación, se ha sintetizado en la Introducción el estado actual del conocimiento en los tres temas: replicación, reparación y recombinación, para luego hacer converger estos tres procesos en el modelo de reparación de horquillas de replicación dañadas, mediada por recombinación.

1 Replicación

1.1 Replicación del genoma bacteriano

Escherichia coli inicia la replicación de su genoma en forma bidireccional, a partir de un único origen de replicación denominado *oriC*. Las dos horquillas de replicación progresan en direcciones opuestas, duplicando el genoma, hasta encontrarse en una región del cromosoma diametralmente opuesta al origen, que se denomina *terminus* [Figura 1A]. El *terminus* está delineado por dos grupos de sitios de terminación (*ter*) que en función de su polaridad conforman una trampa para la maquinaria de replicación, asegurando que ninguna de las dos horquillas pueda proseguir más allá del *terminus* (Bussiere DE & Bastia D. 1999).

El proceso de replicación del genoma puede subdividirse en tres etapas: inicio, elongación y terminación. El inicio de la replicación involucra un primer

paso de desnaturalización del dúplex en la región del origen. Esta desnaturalización permite el cargado de la maquinaria replicativa sobre las cadenas que servirán de molde para la síntesis del ADN. Uno de los dos componentes de la maquinaria replicativa es el **primosoma**, que está compuesto por la helicasa DnaB y primasa DnaG y se encarga de desenrollar el dúplex de cadenas parentales y sintetizar los primers para iniciar los fragmentos de Okazaki que conforman la cadena retrasada. El primosoma a su vez, forma parte de otro complejo proteico, el **replisoma** que es el encargado de la síntesis coordinada de las dos cadenas. El replisoma está compuesto por el primosoma y la holoenzima Polimerasa III, un complejo proteico compuesto por diez subunidades que cataliza la síntesis de ADN.

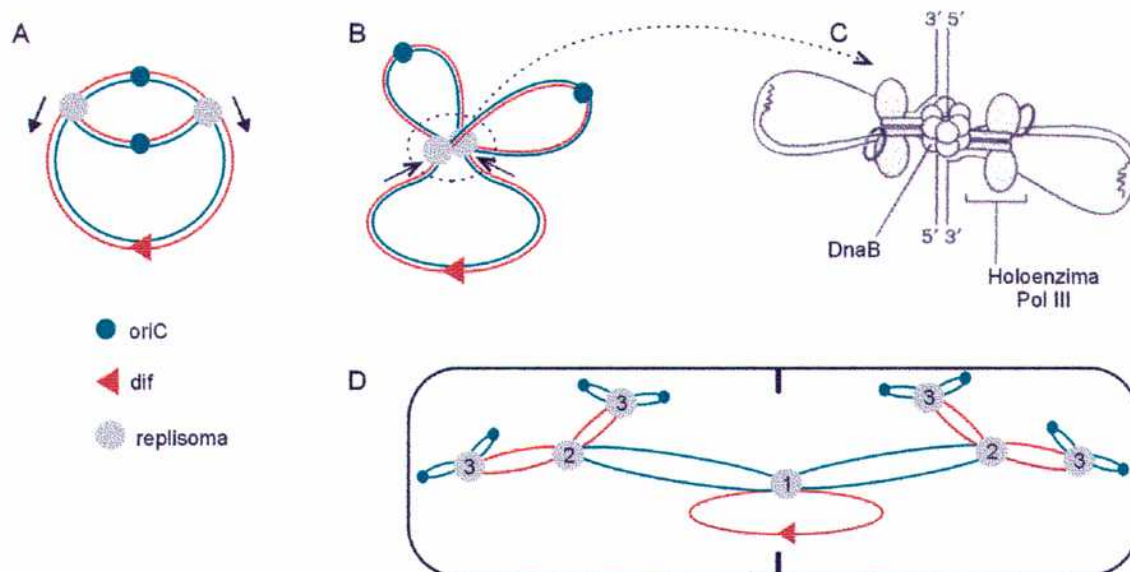


Figura 1 Replicación del genoma en *Escherichia coli*.

En A y B, los orígenes se han representado como círculos verdes; mientras que la secuencia *dif*, que está localizada en el *terminus*, se presenta como un triángulo rojo. Las horquillas de replicación y el replisoma asociado se han representado con un círculo gris.

[A] Representación clásica de la replicación bidireccional de un cromosoma circular: estructura de Cairns o forma theta (θ) de replicación. Las flechas indican el sentido en el que avanza cada replisoma. [B] Replicación a través de la 'replication factory' o fábrica de replicación, que contiene los dos replisomas en estrecho contacto. La localización central de la fábrica de replicación a lo largo de todo el ciclo celular, permite que los dos cromosomas hijos vayan migrando hacia los polos opuestos de la célula a medida que son sintetizados. [C] Se ha esquematizado en más detalle la 'fábrica de replicación' conteniendo los dos replisomas muy cercanos entre sí. Por una cuestión de simplicidad se ha representado los replisomas antes del inicio de la cadena retrasada. [D] Una célula creciendo rápidamente, debe iniciar múltiples ciclos de replicación para lograr completar la replicación de su genoma antes de concluir cada ciclo. Cada círculo gris representa una 'replication factory', que está localizada en sitios específicos dentro de la célula, $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ y así sucesivamente. Esta figura ha sido adaptada a partir de Sherratt D.J., 2001 y Davey M.J. et al. 2000.

1.1.1. Inicio: ensamblaje del primosoma en *oriC*.

La apertura o desnaturalización del dúplex es efectuada por la unión de la proteína iniciadora DnaA a sus sitios de reconocimiento o 'secuencias-DnaA' (DnaA boxes) en *oriC*. La unión de 10 a 20 monómeros de DnaA a este cluster de secuencias-DnaA conduce a la apertura del dúplex en una región cercana. *In vivo*, SSB (Single Strand Binding protein: proteína de unión a ADNsc) se une inmediatamente al ADNsc, evitando que otras proteínas puedan unirse al mismo. La proteína DnaA permanece unida a la región adyacente, facilitando el cargado de las proteínas de replicación sobre el ADNsc protegido por SSB (Hwang D.S. & Kornberg A., 1992). Para que la Polimerasa III pueda iniciar la síntesis de ADN se requiere la síntesis previa de un ARN-primer por parte de la primasa DnaG. La primasa, a su vez, trabaja en conjunto con la helicasa DnaB (Hiasa H. & Mariani K.J., 1999). Por lo tanto, es necesario ensamblar el primosoma (compuesto por DnaB y DnaG) para poder reclutar a la Polimerasa III y comenzar el ciclo de replicación.

El mecanismo de ensamblaje del primosoma en *oriC* es el siguiente: la helicasa DnaB se encuentra en solución formando un complejo con DnaC. La interacción proteína-proteína entre DnaB y DnaA unida-a-ADN permite el cargado de un hexámero de DnaB sobre cada cadena molde, a partir del complejo DnaB-DnaC. Una vez cargada sobre el ADN, la helicasa DnaB recluta a la primasa DnaG, que sintetizará el primer cebador (primer). La constitución de las horquillas de replicación requiere de la unión de la holoenzima Pol III al primer, mediada por interacción entre una de las subunidades de la polimerasa (subunidad τ) y la helicasa DnaB [Figura 2]. Se cree que el primer cebador sintetizado por un primosoma DnaB-DnaG, que avanza en una determinada dirección, es utilizado por el replisoma que se mueve en la dirección opuesta para iniciar la cadena líder (Fang L. et al., 1999). Luego, el primosoma asociado a cada

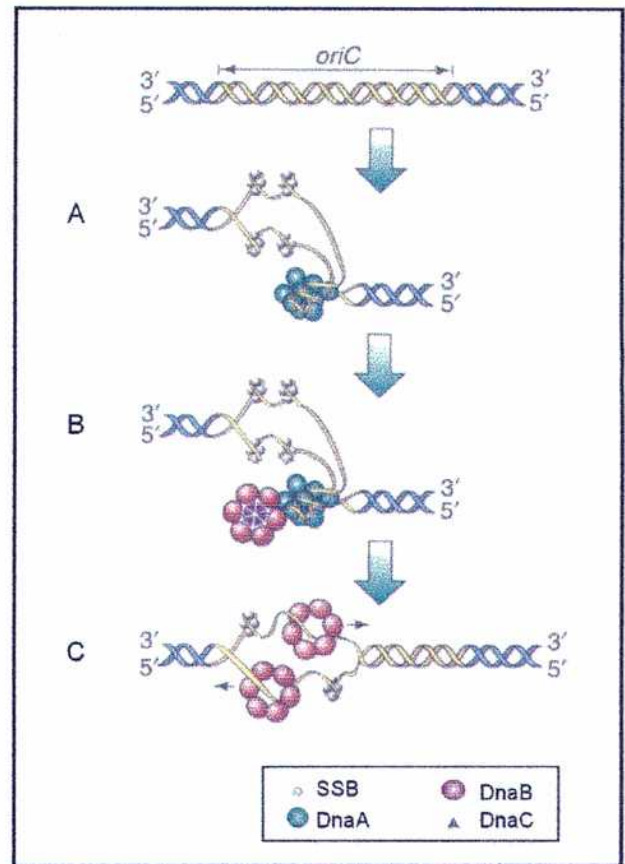


Figura 2 Ensamblaje del primosoma en *oriC*

[A] DnaA se une a sus sitios de unión en *oriC* generando un gran complejo proteína-ADN. La interacción entre DnaA y una serie de secuencias ricas en AT localizadas río arriba de los sitios de unión a DnaA, resulta en la desnaturalización de esta región rica en AT. El ADNsc es protegido por SSB. [B y C] Interacciones entre el complejo DnaB-DnaC y el complejo DnaA-ADN permiten cargar dos hexámeros de DnaB, uno sobre cada cadena del dúplex desnaturalizado. Cada helicasa DnaB cargada sobre ADNsc, reclutará una primasa DnaG, completando el primosoma. Figura adaptada a partir de Mariani K.J. 2001.

replisoma, que va avanzando sobre el molde de la cadena retrasada, va sintetizando los cebadores necesarios para comenzar cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada (Mariani K.J., 2000).

En síntesis, en *E. coli* el inicio de la replicación se realiza en una región fija del cromosoma, denominada *oriC*. El ensamblaje del primosoma en esta región depende de la proteína DnaA para desnaturalizar el dúplex y de la proteína DnaC para facilitar el cargado de dos hexámeros de la helicasa DnaB, uno sobre cada cadena molde. Cada helicasa recluta luego a la primasa DnaG que sintetiza el primer que dará inicio a la cadena líder de cada horquilla de replicación. Una vez sintetizados los dos primeros cebadores, ganan

acceso al ADN dos holoenzimas Pol III, que interactúan con la helicasa correspondiente. Cada replisoma, compuesto por Holoenzima Pol III, DnaB y DnaG (que se va uniendo con cierta frecuencia para sintetizar el primer necesario para cada fragmento de Okazaki) establece una horquilla de replicación, iniciándose de esta manera la replicación bidireccional del genoma.

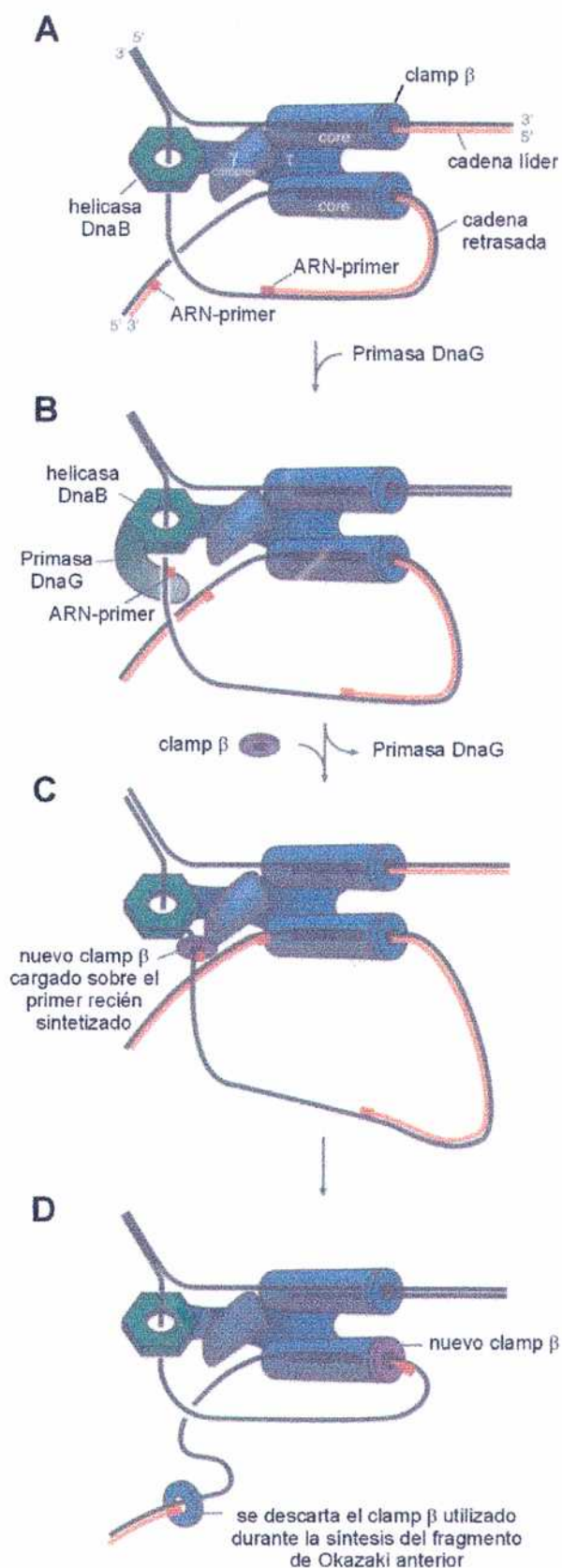
1.1.2 Elongación: el replisoma.

Una vez iniciada la replicación, las horquillas de replicación avanzan en forma bidireccional desde el origen. El complejo proteico en cada horquilla se denomina 'replisoma' y consiste en la holoenzima Pol III y la helicasa DnaB. La primasa DnaG juega un rol intermitente, interactuando transientemente con DnaB para efectuar la rutina de primeado (cebado) de la síntesis de la cadena retrasada. El resultado es un complejo, que lleva adelante la síntesis de ADN sobre ambas cadenas molde en forma coordinada. La síntesis continua de la cadena líder se complementa con la síntesis discontinua de la cadena retrasada. Las proteínas DnaB y DnaG constituyen el primosoma móvil de la cadena retrasada, sintetizando un primer cada 1,5 a 2 kilobases, para iniciar la síntesis de los fragmentos de Okazaki.

La holoenzima Pol III es una sofisticada maquinaria proteica compuesta por 18 polipéptidos, organizados de la siguiente manera: (i) dos **complejos base**, cada uno constituido por las subunidades α (catalítica), ϵ (proofreading) y θ (función desconocida); uno de los complejos base sintetiza la cadena líder mientras el otro sintetiza los fragmentos de Okazaki de la

Figura 3 Elongación catalizada por el replisoma

Se ha representado la holoenzima Pol III en azul, con los dos complejos base (core) unidos por la subunidad τ . Cada complejo base es aferrado a la cadena de ADN que sirve de molde por un clamp β . El complejo γ es el encargado de recambiar los clamps β durante la síntesis discontinua de la cadena retrasada. [A] La helicasa DnaB, representada como un hexámero verde sobre el molde de la cadena retrasada, va desenrollando el dúplex, permitiendo que Pol III pueda progresar en la síntesis coordinada de ambas cadenas. [B] La primasa DnaG mediante interacciones con DnaB se incorpora al complejo y sintetiza el ARN-primer necesario para iniciar el próximo fragmento de Okazaki. [C] Una vez sin-



tetizado el primer, el complejo γ desplaza a la primasa y carga un nuevo clamp β sobre el primer recién sintetizado [D] Una vez finalizado un fragmento de Okazaki, el clamp β usado se libera junto con la región de ADN replicada y se inicia un nuevo fragmento de Okazaki, utilizando el nuevo clamp β cargado sobre el primer correspondiente. Figura adaptada a partir de Cox M.M. 1998.

cadena retrasada; (ii) un **dímero de la subunidad τ** , que une los dos complejos base; (iii) un **`clamp' o pinza de procesividad** por cada complejo base, que consiste en un homodímero de la subunidad β y se encarga de mantener al complejo aferrado a la cadena de ADN molde y (iv) el complejo cargador del clamp o **complejo γ** , compuesto por las subunidades γ , δ , δ' , ψ y χ (Sutton M.D. & Walker G.C., 2001).

El complejo γ tiene tres funciones. Además de reciclar los clamps β durante la replicación de la cadena retrasada cargando un clamp en el comienzo de cada fragmento de Okazaki, la subunidad χ del complejo γ interactúa con la proteína de unión a ADNsc (SSB). Esta interacción permite desplazar a la primasa unida al ARN recién sintetizado que sirve como cebador para el fragmento de Okazaki, permitiendo que Pol III pueda unirse al mismo para comenzar la síntesis.

Para iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki, DnaG es reclutada hacia la horquilla de replicación, por interacción directa con la helicasa DnaB. Una vez que sintetiza el ARN cebador, permanece unida al mismo. La unión de la primasa y el cebador sintetizado es estabilizada por su asociación con SSB. Se requiere de la interacción de la subunidad τ del complejo γ de Pol III con SSB para desplazar a la primasa del híbrido cebador-ADN molde, permitiendo que el complejo γ pueda cargar un nuevo β clamp. La posterior traslocación de la región de la cadena molde conteniendo el ARN-primer recién sintetizado con el clamp β , hasta Pol III, permite iniciar la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki. Cuando Pol III arriba al fragmento de Okazaki sintetizado previamente, se repite todo el proceso. Pol I actuando conjuntamente con la ADN-Ligasa se encarga de la maduración de los fragmentos de Okazaki; Pol I degrada el cebador al tiempo que sintetiza el fragmento de ADN correspondiente y la ADN-Ligasa une cada fragmento con el subsiguiente [Figura 3] (Sutton MD & Walker GC, 2001).

Las proteínas que constituyen el primosoma móvil, DnaB y DnaG, son esenciales en *E.coli*. Mutantes termosensibles de la helicasa o la primasa exhiben un fenotipo de bloqueo rápido de la síntesis de ADN. De las múltiples helicasas que posee *E. coli*, DnaB es la única esencial para la replicación del genoma.

1.1.3 Localización de la maquinaria de replicación: replication factory.

En los últimos diez años, nuevas técnicas tales como la `hibridación fluorescente *in situ*' (FISH: Fluorescent in situ Hybridization) y la localización por fluorescencia de proteínas de fusión con GFP (Green Fluorescent Protein), han permitido localizar proteínas y regiones específicas del cromosoma durante el ciclo celular bacteriano. Estas técnicas permitieron demostrar que el cromosoma bacteriano está organizado con una orientación particular dentro de la célula. Los orígenes, al ser duplicados, se dirigen hacia los polos opuestos, mientras que el terminus permanece en la mitad de la célula. Las regiones intermedias del genoma muestran un esquema de localización intermedia, indicando que la organización del nucleoide refleja el mapa físico del genoma (Niki H & Hiraga S., 1998; Niki H. et al., 2000).

A fines de los 90 se comprobó que la maquinaria de replicación permanece en una posición fija en el medio de la célula. Esto implica que las dos horquillas de replicación iniciadas en un ciclo de replicación son procesadas a través de una `replication factory' fija (fábrica de replicación), que contiene ambos replisomas ubicados próximos entre sí [Figura 1B y 1C]. La acción de una maquinaria replicativa localizada centralmente facilita el movimiento del ADN que aún no ha sido replicado hacia el centro de la célula y la separación concomitante de los cromosomas hermanos producto de la replicación desde el centro de la célula y hacia los polos opuestos a medida que son sintetizados (Sawitzke J. & Austin S., 2001; Davey MJ

& O'Donnell M., 2000).

Para lograr replicar el genoma completo en el lapso del breve ciclo celular bacteriano (menos de una hora), las horquillas de replicación avanzan con una velocidad de aproximadamente 1000 nucleótidos por segundo. Sin embargo, cuando la bacteria crece en un medio rico, el ciclo celular se acorta y la velocidad con la que avanzan las horquillas de replicación es insuficiente para concretar la replicación del genoma antes de que finalice el ciclo. En estas circunstancias, a fin de evitar llegar al final del ciclo celular sin haber completado la replicación del cromosoma, la bacteria inicia nuevos ciclos de replicación antes de haber concluido el que está en marcha. Al microscopio de fluorescencia es posible comprobar que *E. coli*, creciendo en un medio rico, posee más de dos horquillas de replicación en marcha y pueden visualizarse los pares de orígenes recién sintetizados que comienzan a migrar en direcciones opuestas. Si se marca con GFP la Polimerasa, es posible observar la localización de las distintas 'replication factories' en zonas específicas de la célula [1/2; 1/4 y 3/4; 1/8, 3/8, 4/8 y 7/8]. En la Figura 1D, se ha representado una célula creciendo en medio rico, que contiene varios ciclos de replicación en marcha (Sherratt D.J. et al., 2001).

1.1.4 Existencia de un primosoma alternativo: el primosoma $\Phi X174$

Escherichia coli posee otro primosoma que permite iniciar la síntesis de la cadena retrasada, en el que participan además de DnaB, DnaG (que conforman el primosoma *oriC* que acabamos de detallar) y DnaC (que se requiere para ensamblar el primosoma en *oriC*), las proteínas PriA, PriB, PriC y DnaT. Este tipo de primosoma se denominó, en un primer momento, 'primosoma $\Phi X174$ ', ya que fue descubierto durante experimentos *in vitro* tendientes a reproducir la primera etapa de la replicación de este fago, la conversión del genoma circular simple cadena en un círculo

doble cadena (forma replicativa, RF) que permite iniciar la replicación por círculo rodante. El genoma del fago posee una secuencia denominada sitio de ensamblaje del primosoma (PAS: Primosome Assembly Site), que puede adoptar una estructura secundaria, aún cuando el resto del ADNsc se recubre de SSB. PriA es capaz de reconocer esta estructura secundaria, unirse al sitio PAS y reclutar a las proteínas PriB, PriC y DnaT. DnaT interacciona entonces con el complejo DnaB-DnaC, permitiendo que se cargue la helicasa DnaB sobre el ADNsc que servirá de molde. La posterior interacción transiente entre DnaB y la primasa DnaG completa el primosoma, permitiendo que se sintetice el cebador que habilita el inicio de la síntesis de la cadena complementaria del fago.

Más adelante se discute la importancia de este tipo de primosoma en la fisiología de la bacteria.

1.2 Replicación de plásmidos

1.2.1 Plásmido ColE1: inicio de la replicación dependiente del primosoma $\Phi X174$.

Los plásmidos de la familia de ColE1, entre los cuales se encuentran p15A y pMB1, replican por un mecanismo de tipo theta (θ) unidireccional. Los vectores de clonado más usados, tales como pACYC184 y pBR322/pUC19 son derivados de p15A y pMB1 respectivamente. Estos plásmidos utilizan un R-loop (estructura en la cual una cadena de ARN se aparea con una de las cadenas de un dúplex de ADN, desplazando a la cadena complementaria) como cebador para iniciar la síntesis de la cadena líder.

La ARN-Polimerasa del huésped sintetiza un transcrito de ARN [RNA II] que forma un híbrido estable con el ADN complementario en la región del origen. Este híbrido es procesado por la RNasaH, generando el 3'-OH a partir del cual la ADN-Polimerasa I comenzará a sintetizar la cadena líder. A

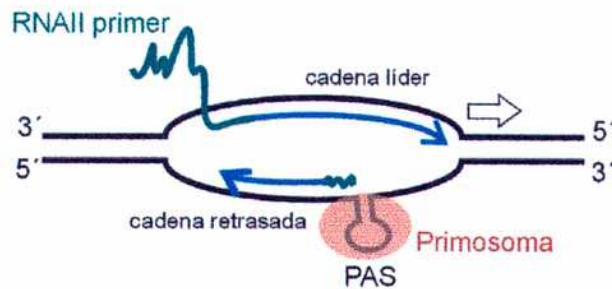


Figura 4 Inicio de la replicación del plásmido ColE1.

La ARN-Polimerasa transcribe el RNA II, que al formar un híbrido con el ADN en la región del origen, es procesado específicamente por la RNasa H. De esta manera se genera el primer que permite el inicio de la cadena líder por acción de la Polimerasa I. A medida que progresa la síntesis de la cadena líder, en la cadena desplazada se expone el sitio PAS, que adopta una estructura secundaria reconocible por PriA. PriA ensambla sobre el sitio PAS el primosoma, que sintetiza un primer y recluta a la holoenzima Pol III para que comience a sintetizar las dos cadenas coordinadamente. Esta figura ha sido adaptada a partir de Masai H. & Arai K, 1996a.

medida que Pol I progresa, en la cadena desplazada se expone el sitio PAS (Primosome Assembly Site) o sitio de ensamblaje del primosoma. En el ADNsc el sitio PAS adopta una estructura secundaria en forma de 'stem-loop' o 'tallo con rulo', que no puede ser desestabilizada por SSB. Esta estructura secundaria es reconocible por la proteína PriA, que se une al sitio PAS y recluta a PriB, PriC y Dna [Figura 4].

PriA actúa, en una primera instancia, como factor de especificidad al reconocer y unirse a una estructura especializada del origen del plásmido (el sitio PAS) y luego inicia el reclutamiento del resto de las proteínas primosomales. El complejo DnaC-DnaB mediante interacciones con DnaT, carga a la helicasa DnaB sobre la hebra que servirá de molde para la síntesis de la cadena retrasada, completando el pre-primosoma. Interacciones transientes entre DnaB y la primasa DnaG completan el primosoma Φ X174, que sintetiza el cebador que le permitirá a la ADN-Polimerasa III iniciar la síntesis de la cadena retrasada, al tiempo que reemplaza a Pol I en la síntesis de la cadena líder. Los plásmidos de la familia ColE1 son incapaces de replicar en mutantes PriA⁻ (Del Solar G. et al. 1998; Masai H. & Arai K., 1996).

1.2.2 Regulación del inicio de la replicación:

El ARN-primer utilizado para iniciar la replicación de ColE1 [RNA II], es sintetizado por la ARN Polimerasa y procesado específicamente por la RNasa H. Este procesamiento es indispensable para que comience la replicación, ya que genera el 3'-OH a partir del cual Pol I inicia la síntesis de la cadena líder. La disponibilidad de este 3'-OH determina la velocidad de iniciación de la replicación y está modulada por un ARN antisentido [RNA I], que es complementario a la región 5' del pre-primer RNA II. La formación de un híbrido entre el pre-primer y el anti-sentido (RNA II / RNA I) altera la estructura secundaria del pre-primer evitando que el extremo 3' del mismo hibride con el ADN complementario en el origen del plásmido. Esto, a su vez, inhibe el inicio de la replicación, ya que el pre-primer no puede ser procesado por RNasa H si no está formando un híbrido con el DNA en el origen del plásmido. El RNA I se transcribe a partir de un promotor constitutivo y es inestable, por lo tanto su nivel es proporcional al número de copias del plásmido.

La proteína Rom constituye un factor adicional en el control del número de copias de este tipo de plásmidos. Rom interactúa con RNA I y RNA II, aumentando la eficiencia de formación de un complejo estable entre ambos y por ende disminuyendo la frecuencia de iniciación de la replicación (Del Solar G. et al. 1998).

1.2.3 Plásmido R1: inicio de la replicación independiente de PriA

R1 y sus derivados también replican por un mecanismo de tipo theta (θ) unidireccional, pero no utilizan el primosoma Φ X174 para iniciar la síntesis de la cadena retrasada. El inicio de la replicación depende de la proteína RepA, codificada por el plásmido. RepA se une a dos sitios dentro del origen del plásmido (*oriR*), desnaturalizando las cadenas en una región

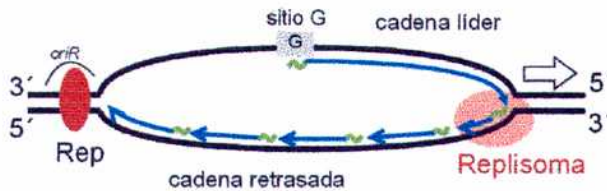


Figura 5 Inicio de la replicación del plásmido R1

La unión de la proteína RepA a sus sitios de unión en *oriR* permite la desnaturalización del dúplex en el origen. El primosoma ensamblado en esta región inicia la síntesis de la cadena retrasada. Cuando la horquilla llega al 'sitio G', 400 pares de bases río abajo de *oriR* activa el sitio permitiendo que la primasa sintetice el primer que habilita el inicio de la cadena líder. Figura adaptada a partir de Masai H. & Arai K, 1996a.

rica en AT adyacente a sus sitios de unión. DnaA parece contribuir a este proceso, mediante interacciones con RepA. La desnaturalización de las cadenas en *oriR*, permite que se cargue DnaB a partir del complejo DnaB-DnaC. DnaB recluta entonces a la primasa DnaG que sintetiza el cebador que habilita a Pol III para que inicie la cadena retrasada. Al progresar la síntesis de la cadena retrasada, en la cadena desplazada se expone el 'sitio G' (400 pb río abajo del inicio de la síntesis de la cadena retrasada), que es el sitio de inicio de la cadena líder. Al exponerse el sitio G, DnaG sintetiza el cebador que permite el inicio de la síntesis de la cadena líder. Se desconocen los detalles sobre este proceso [Figura 5].

El inicio de la replicación es totalmente independiente de PriA, por lo tanto estos plásmidos son capa-

ces de replicar en un contexto deficiente en PriA. Otros plásmidos capaces de replicar en un contexto *priA* son pSC101, R6K, RK2 y F [Masai H. & Arai K, 1996a y 1996b].

1.3 Replicación de bacteriófagos: estrategias alternativas para iniciar la replicación

1.3.1 Fago Mu: Replicación por transposición.

Inicio de la replicación sobre una estructura en Y.

El bacteriófago Mu replica por un mecanismo que involucra una primera etapa de transposición seguida de replicación iniciada sobre el intermediario de transposición. La replicación es iniciada por proteínas primosomales del huésped [Figura 6]. La transposasa MuA codificada por el fago, se ensambla en un transpososoma oligomérico que promueve la transferencia de los extremos del genoma del fago al ADN blanco. El intercambio de cadenas genera una estructura en Y (horquilla) en cada extremo, en las cuales el extremo 3' del ADN blanco puede servir de cebador para la síntesis de la cadena líder. La transposasa permanece unida a los dos extremos de Mu. Se requiere de la chaperona ClpX para generar un cambio conformacional en el transpososoma que debilita su interacción

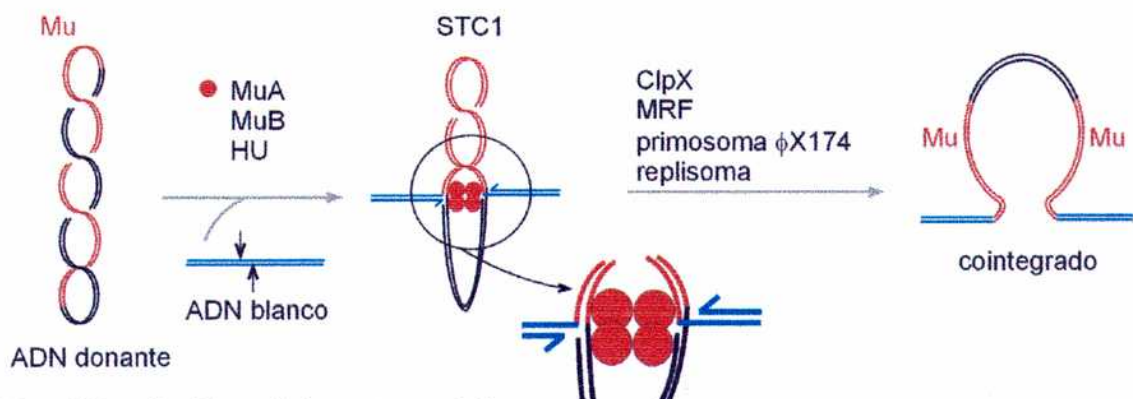


Figura 6 Fago MU: replicación mediada por transposición

El fago MU replica por transposición. En la primer etapa las proteínas de transposición del fago MuA y MuB, con ayuda de HU, permiten que los extremos -OH 3' de Mu (en rojo) invadan un ADN blanco (en azul). El intercambio de cadenas genera una estructura en Y (horquilla) en cada extremo de Mu, en la cual el extremo 3' del ADN blanco puede servir de primer para la síntesis de la cadena líder (para más detalles referirse a la figura 7). En este intermediario (STC1: strand exchange complex), la transposasa MuA, que se ensambla en un transpososoma oligomérico, permanece unida a los dos extremos de Mu. Se requiere de ciertos factores no identificados del fago (MRF) y de factores del huésped (ClpX y proteínas primosomales) para desplazar el transpososoma e iniciar la replicación del genoma de Mu desde uno de los extremos, resultando en la formación de un cointegrado entre el ADN blanco y el donante, conteniendo una copia de Mu en cada unión. Esta transición desde el transpososoma al replisoma se ha esquematizado en la Figura 7. Figura adaptada a partir de Nakai H. et al., 2001.

con el ADN, facilitando que factores no identificados del fago (MRF α 2) lo desplacen, para ensamblar el pre-replisoma (SCT-3). El pre-replisoma evita que el extremo del ADN blanco sea elongado por acción de Pol I y permite la transición hacia la etapa posterior de síntesis de ADN [Figura 7A, B y C].

La proteína PriA del huésped se une entonces a una de las horquillas generadas por el intercambio de cadenas y comienza el proceso de ensamblaje del primosoma en uno de los extremos del genoma del fago. Se desconoce el mecanismo por el cual se define cuál de los dos extremos de Mu será utilizado para iniciar la síntesis de ADN. PriA ensambla el pre-primosoma sobre esta estructura en Y, reclutando a PriB, DnaT y al complejo DnaB-DnaC. Para permitir que DnaB se cargue sobre el ADNsc que servirá como molde para la cadena retrasada, PriA debe desenrollar el dúplex valiéndose de su actividad helicasa 3'→5'. Una vez cargada DnaB sobre el ADNsc, se recluta a la primasa DnaG que completa el primosoma y sintetiza el ARN-primer. La interacción de DnaB con Pol III completa el ensamblado del replisoma, que puede entonces comenzar a sintetizar ambas cadenas, la líder (utilizando como cebador el extremo 3' del ADN blanco) y la retrasada a partir del cebador sintetizado por el primosoma.

Al completarse la replicación, se genera un cointe-

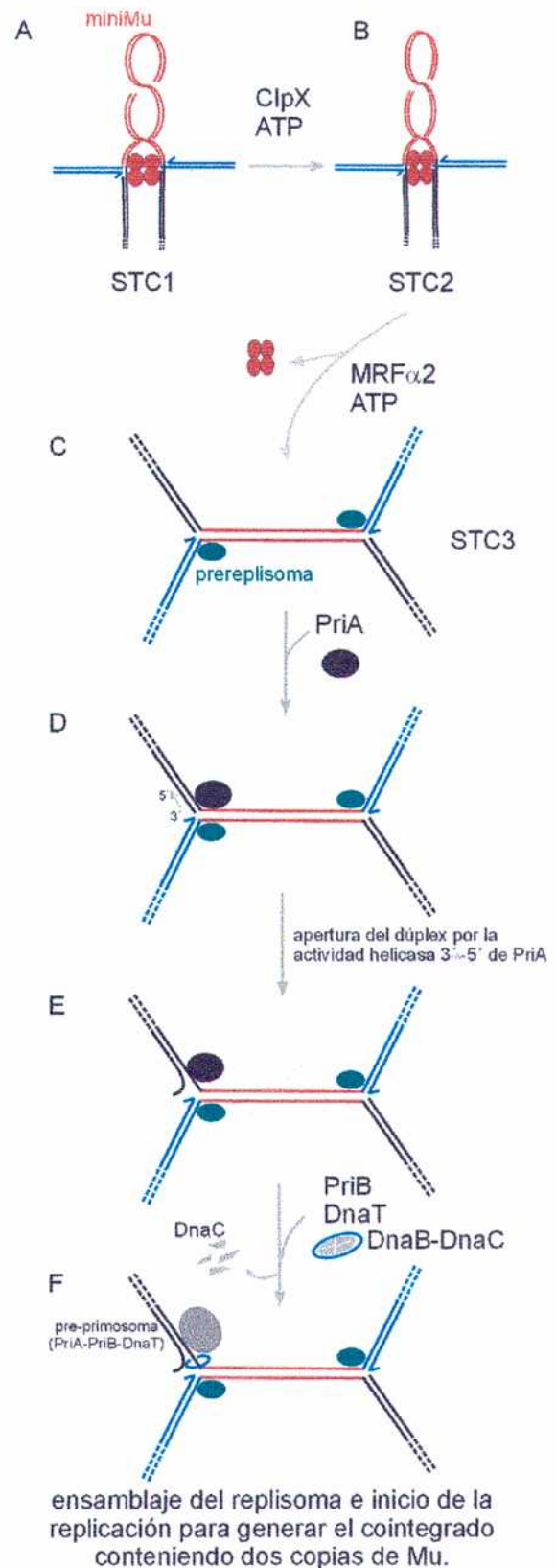


Figura 7 Fago Mu: Replicación a partir de una estructura en Y.

En esta figura se ha representado la transición del transpososoma al replisoma. La chaperona ClpX, modifica la conformación del transpososoma, permitiendo la transición de STC1 (A) a STC2 (B). Luego un conjunto de proteínas del fago, que aún no han sido caracterizadas (MRF α 2), desplaza al transpososoma y forma el pre-replisoma en cada extremo de Mu (en verde), STC3 (C). PriA es reclutada hacia uno de los extremos conteniendo una estructura en Y (D). Mediante su actividad helicasa es capaz de desplazar una cadena del dúplex de ADN blanco, generando la región simple cadena necesaria para cargar a la helicasa DnaB (E). El reclutamiento de PriB y DnaT, permite que DnaT interactúe con el complejo DnaB-DnaC, resultando en el cargado de la helicasa DnaB sobre la cadena que servirá de molde para la síntesis de la cadena retrasada (F). El posterior reclutamiento de DnaG permitirá la síntesis del primer para iniciar la cadena retrasada. El cargado de la holoenzima Pol III completa el replisoma, que avanzará hacia el otro extremo de Mu, hasta completar su replicación. Como resultado de todo el proceso se genera un cointegrado entre el ADN blanco y el donante, conteniendo una copia de Mu en cada unión. Esta figura

ha sido adaptada a partir de Nakai H. et al., 2001.

Por una cuestión de claridad se ha esquematizado a PriA desenrollando el dúplex, utilizando su actividad helicasa 3' a 5', antes de reclutar al resto de las proteínas primosomales. Probablemente, esta actividad sea desarrollada por PriA una vez que ha ensamblado el pre-primosoma (PriA-PriB-DnaT).

grado entre el ADN blanco y el donante, con una copia del fago en cada unión. Cada proceso de transposición seguido de replicación resulta en la duplicación del genoma de Mu (Nakai H. et al., 2001).

1.3.2 Fago T4: replicación dependiente de recombinación. Inicio de la replicación sobre un D-loop.

El genoma del fago T4 que ingresa en la bacteria es un dúplex de ADN lineal. Esto representa un problema conceptual, ya que las ADN-polimerasas no pueden replicar la cadena retrasada hasta el final del extremo 3'. El fago T4 resuelve este problema utilizando replicación-dependiente-de-recombinación (RDR) y un proceso de empaquetado que llena la cápside del fago con ADN lineal de una longitud mayor a una unidad de genoma.

El fago T4 comienza su ciclo de replicación con varias rondas de replicación a partir de orígenes fijos dentro del genoma, que utilizan R-loops para facilitar la desnaturalización de la región y proveer un ARN-primer para iniciar la síntesis de la cadena líder. Cuando la horquilla de replicación ensamblada en dicho origen llega al extremo del genoma, la cadena líder presumiblemente se completa hasta el final pero la cadena retrasada dejará un extremo simple cadena en el extremo 3'. Este extremo de ADNsc puede invadir otra cadena homóloga, generando un D-loop (loop de desplazamiento: estructura en la cual una molécula de ADNsc se aparea con una de las cadenas de un ADNdc, desplazando a la cadena complementaria) a partir del cual puede iniciarse la replicación [ver Figura 9] (Kreuzer K.N., 2000).

La pregunta es: ¿cual es el dúplex homólogo invadido que permite generar múltiplos del fago por RDR? La respuesta a esta pregunta está dada por atributos del genoma del fago, determinados por el mecanismo que utiliza para empaquetar su genoma en partículas infectivas; el genoma de T4 es 'terminalmente redundante' y 'circularmente permutado'. La

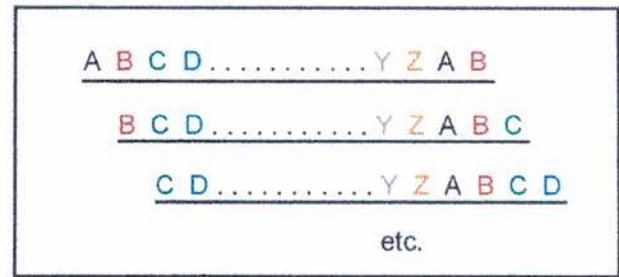


Figura 8 Genoma del fago T4: permutación circular y redundancia terminal.

Se ha diagramado una serie de moléculas de ADN del fago, utilizando letras para representar la secuencia del genoma. Cada molécula posee redundancia terminal, que abarca aproximadamente 5 kbp de los extremos; tal es el caso del segmento AB en la primera molécula. Si se analiza una colección de moléculas del fago, se observa que el genoma puede terminar con cualquier secuencia de las contenidas en el genoma. Dado que el clivaje al azar de un círculo puede producir una colección de moléculas con esta característica, este atributo ha sido denominado permutación circular.

Redundancia terminal implica que las dos regiones terminales de cada cromosoma individual contienen la misma secuencia [ver Figura 8]. Respecto del segundo atributo, la permutación circular: cuando se analiza una colección de moléculas de T4, en los extremos se encuentran todas las secuencias posibles del genoma del fago. Dado que la linealización al azar de un círculo podría generar una colección de este tipo (aunque sin terminación redundante), este aspecto de la estructura del cromosoma se ha denominado permutación circular [ver Figura 8].

Ahora bien, debido a la redundancia terminal, cada extremo simple cadena 3' generado durante las primeras etapas de la infección por una única partícula de fago, será homólogo al ADN cercano al extremo opuesto del cromosoma infectivo (ya sea la misma molécula hija o su hermana). La replicación unidireccional iniciada a partir de la invasión de este extremo 3' duplicará la mayor parte de la molécula ya que la horquilla de replicación avanzará hacia el centro del cromosoma. Cabe aclarar, que esto no ocurriría en ausencia de redundancia terminal y/o permutación circular.

Durante la infección de una célula por múltiples partículas del fago las posibilidades se multiplican ya que, debido a la permutación circular del genoma de

T4, el extremo de una molécula infectiva generalmente será homólogo a regiones internas de moléculas co-infectantes. Independientemente de cual sea el dúplex homólogo invadido, la RDR generará productos que contendrán más de una copia del genoma. De hecho, este es el primer paso en la generación de largos multímeros, que se requieren para el empaquetamiento del ADN en etapas posteriores durante la infección.

Un aspecto muy importante de la RDR del fago T4 es que es auto-regenerativa. Cuando una horquilla de replicación iniciada por RDR llega al extremo, se generan extremos 3' simple cadena que permiten invasiones que dispararán nuevas rondas de RDR, resultando en multímeros cada vez más largos. A medida que progresa la infección, el ADN sintetizado comienza a formar una red de estructuras ramificadas, como resultado de la resolución incompleta de algunas de la estructuras de Holliday generadas durante la invasión de un dúplex por acción de un extremo simple cadena. Estas estructuras ramificadas son resueltas por la Endonucleasa VII codificada por el fago, antes de que comience el empaquetamiento del ADN para generar partículas infectivas.

El empaquetamiento comienza al azar en cualquier región del genoma del fago, lo cual explica la permutación circular del ADN empaquetado. La longitud del ADN empaquetado está determinada por la capacidad de la cápside; y dado que la cápside tiene capacidad para 103% de la longitud de una copia del genoma, cada molécula de ADN empaquetada resulta terminalmente redundante durante el proceso de empaquetamiento a partir de los multímeros (Kreuzer K.N. 2000).

Todavía existe cierta controversia acerca de la direccionalidad de la RDR en el fago T4. G. Mosig propuso que el clivaje del D-loop por acción de una nucleasa con especificidad por estructuras de Holliday, podría generar replicación uni o bi-direccional

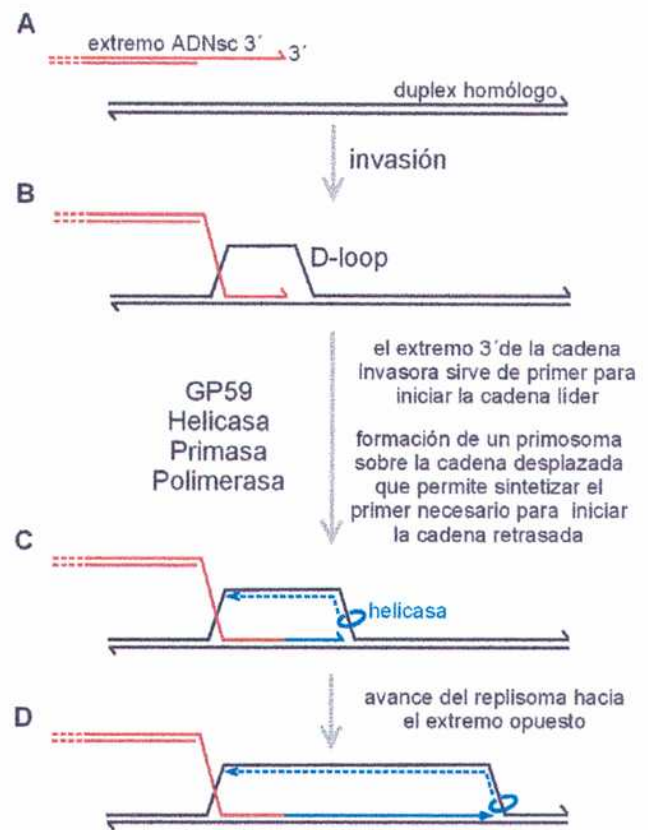


Figura 9 Fago T4: Replicación dependiente de recombinación (RDR) a partir de un D-loop.

[A] Dado que el genoma de T4 es lineal, las primeras rondas de replicación, generan moléculas del fago que contienen un extremo con ADNsc 3'. [B] Este extremo 3' puede invadir un dúplex homólogo (en negro), generando un D-loop. Los eventos que siguen constituyen la base del proceso de RDR e involucran la conversión del D-loop en una horquilla de replicación. [C y D] La proteína GP59 reconoce la estructura del D-loop y carga a la helicasa y la primasa sobre la cadena desplazada, permitiendo la síntesis del primer necesario para iniciar la cadena retrasada (representada con una flecha azul punteada). El extremo 3' invasivo puede ser utilizado como primer para iniciar la cadena líder (flecha azul continua). El primosoma (GP59, helicasa y primasa) recluta a la Polimerasa del fago, completando el replisoma que comienza a avanzar hacia el otro extremo replicando el genoma.

nal dependiendo de cuáles sean las cadenas clivadas. En ambos casos, la cadena invasora sería utilizada como cebador para la replicación de la cadena líder en la primer dirección y haría falta cargar una helicasa sobre la cadena desplazada del D-loop, para que se ensamble el primosoma que permitirá el inicio de la cadena retrasada. De esta manera se habilitaría un replisoma para que avance en dicha dirección [Figuras 9 y 10] (Mosig G., 1998).

Para que se instale una replicación bidireccional, el primer fragmento de Okazaki sintetizado por la horquilla que avance en la primer dirección podría ser uti-

lizado como cebador de la cadena líder de la horquilla que avance en la dirección contraria. Una segunda helicasa debería cargarse sobre la cadena invadida, río arriba de la región invadida para permitir el ensamblado del replisoma que avanzará en la segunda dirección [Figura 10 b].

El fago T4 codifica la mayoría de las enzimas necesarias para replicar su genoma por RDR. En la Tabla 1 se indica la proteína codificada por el fago y su homólogo funcional en *Escherichia coli*. El cargado de la helicasa Gp41 sobre la cadena desplazada, es un paso esencial en el ensamblado del replisoma y el fago T4 expresa la proteína Gp59 para cumplir con esta tarea. Esta proteína es un homólogo funcional de la proteína PriA de *E. coli* (Jones J.M. & Nakai H., 2000).

1.4 Sinopsis: mecanismos de inicio de la replicación en bacterias

Se ha descrito el procedimiento por el cual *E. coli* y algunos plásmidos y bacteriófagos que se propagan en esta bacteria, cargan la maquinaria replicativa sobre el ADN molde, con el objeto de presentar el abanico de mecanismos utilizables para iniciar la replicación en bacterias.

En el caso del genoma bacteriano, se utiliza un mecanismo que depende de DnaA y DnaC para cargar sobre cada cadena molde una helicasa DnaB. DnaB recluta a la primasa DnaG, habilitando de esta manera la iniciación de la replicación del genoma en las dos direcciones. Luego, el primosoma móvil compuesto por DnaB y DnaG (transientemente) sintetiza el cebador necesario para iniciar la síntesis de los sucesivos fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada.

E. coli codifica otras proteínas que son capaces de cargar a la helicasa DnaB sobre una cadena de ADN. Estas conforman el primosoma Φ X174, que es esencial para la iniciación de la replicación de plásmidos

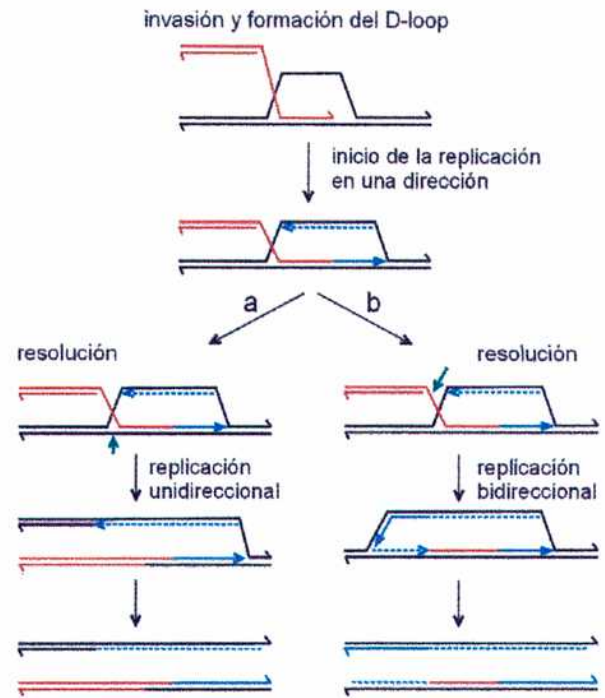


Figura 10 Establecimiento de replicación UNI o BI-direccional a partir del D-loop

En el extremo opuesto del loop, existe un empalme-de-tres-cadenas (three way junction). Dependiendo de cómo se resuelva esta estructura, puede establecerse replicación uni- o bi-direccional a partir del D-loop. [A] Se ha delineado una de las vías por las que puede establecerse la replicación unidireccional: una endonucleasa corta la cadena inferior del dúplex homólogo (flecha azul). Otra posibilidad sería la conversión de la "three way junction" en una "four-way-junction" (o estructura de Holliday: EH) por migración del cross-over hacia la izquierda. Independientemente de si esta EH es resuelta en una u otra dirección o simplemente se la hace migrar hasta el extremo del genoma, el resultado será el establecimiento de replicación unidireccional. [B] Se ha representado cómo el clivaje de la cadena invasora puede llevar al establecimiento de replicación bidireccional. El extremo 3' de la cadena retrasada, se puede utilizar como primer para iniciar la cadena líder en la segunda dirección. Se requiere del ensamblaje de un nuevo primosoma sobre la cadena inferior del dúplex invadido, para establecer el replisoma que avanzará en la segunda dirección.

T4	<i>E. coli</i>	Función
UvsX	RecA	intercambio de cadenas carga a UvsX sobre ADN recubier to por gp32.
UvsY	RecO RecR	
UvsW	RecG	helicasa específica para EH proteína de unión a ADNsc
gp32	SSB	
gp41	DnaB	helicasa replicativa
gp46/47	SbcCD	potencial nucleasa / helicasa
gp59	PriA	carga a la helicasa replicativa sobre el molde de la cadena retrasada.

Tabla 1: Proteínas del fago T4 involucradas en la replicación mediada por recombinación.

Se han listado las funciones del fago involucradas en la replicación mediada por recombinación y los homólogos funcionales en *E. coli*. No se han incluido las proteínas involucradas en la fase de elongación, tales como la primasa (gp61), la polimerasa (gp43), las proteínas cargadoras de la pinza de procesividad (gp44/45/62) y la topoisomerasa (gp39/52/60).

de tipo ColE1 y de los fagos Φ X174 y Mu. La proteína que inicia el ensamblaje de este tipo de primosoma se denomina PriA y es capaz de reconocer señales de ensamblaje de primosoma que adoptan una estructura secundaria específica al estar sobre ADNsc. Tal es el caso de los sitios PAS del plásmido ColE1 y el fago Φ X174. PriA también puede reconocer estructuras en forma de Y, como las generadas durante el proceso de transposición del fago Mu, permitiendo el inicio de la replicación sobre este tipo de estructuras.

Cabe destacar que estudios bioquímicos han confirmado que la proteína PriA no participa de la inicia-

ción de la replicación del genoma de *E.coli* en *oriC*, ni en la síntesis de la cadena retrasada durante la etapa de elongación. Más adelante, se discute su papel en la fisiología de la bacteria.

Por último, presentamos la replicación del fago T4 como ejemplo de replicación iniciada sobre un D-loop generado durante la primeras etapas de un proceso de recombinación, la invasión de un dúplex por parte de un extremo 3' simple cadena. Este proceso de RDR es catalizado por proteínas codificadas por el fago. La proteína GP59, que parece ser la encargada de reclutar un primosoma sobre el D-loop, es un homólogo funcional de PriA..

2 Reparación

2.1 Tipos de lesiones al ADN

El ADN cumple con dos funciones esenciales: almacenar la información genética para que pueda ser transmitida a las sucesivas generaciones y actuar de molde en el proceso de transcripción, proveyendo la información necesaria para que se sinteticen todas las proteínas (y los ARNs) indispensables para el funcionamiento celular. Para que pueda cumplir con estas funciones, la célula debe cerciorarse de que toda lesión o modificación que sufra el ADN sea reparada eficientemente y garantizar que durante la replicación la información se duplique fielmente.

El ADN como cualquier otra macromolécula está sujeto a agresiones constantes que pueden provenir del propio medio intracelular o de factores externos ambientales. Las modificaciones que puede sufrir incluyen: la pérdida o modificación de una base nitrogenada, las interrupciones en la cadena de deoxinucleótidos (*nick* cuando afecta a una de las cadenas y corte doble cadena [DSB: Double Strand Break] cuando afecta a las dos cadenas), el cross-linking (unión covalente) entre las dos cadenas y el apareamiento incorrecto de un par de bases.

Determinadas modificaciones de las bases nitrogenadas y el apareamiento incorrecto (mismatch), de persistir hasta el momento de la replicación, pueden derivar en la generación de una mutación. Por otro lado, ciertas alteraciones en las bases, así como la generación de un sitio abásico (por pérdida de una base), las interrupciones en la cadena de deoxinucleótidos, y el cross-linking entre las cadenas pueden producir un bloqueo total del proceso de replicación, resultando letales para la célula.

El apareamiento incorrecto normalmente surge de errores cometidos por la Polimerasa durante la replicación. Estos errores en algunos casos pueden ser inducidos por cambios tautoméricos o deaminación

de las bases nitrogenadas, que promueven la incorporación de una base incorrecta durante la replicación. Por otro lado la pérdida de una base genera un sitio abásico, es decir un deoxinucleótido carente de base nitrogenada, que constituye un bloqueo para la ADN-polimerasa. Los dímeros de pirimidinas que se generan entre dos bases adyacentes como producto de la radiación UV, también bloquean el avance de la Polimerasa.

Especial atención merece el daño oxidativo, que se genera por acción de especies reactivas de oxígeno sobre el ADN. Estos radicales libres pueden generar modificaciones en las bases nitrogenadas y/o cortes en una o ambas cadenas del dúplex de ADN. Existen varias fuentes intra y extracelulares de radicales oxígeno. La mayor fuente intracelular la constituyen los radicales libres producto del metabolismo aeróbico, entre los que se encuentran los radicales peróxido ($\cdot\text{O}_2$), el oxígeno singlete ($\cdot\text{O}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Entre las fuentes extracelulares se encuentra la radiación ultravioleta (UV cercano, 320-380 nm) y la radiación ionizante (radiación γ). De hecho, la radiación ionizante daña el ADN principalmente a través del efecto de las especies reactivas de oxígeno generadas por radiolisis del agua (Friedberg E.C., 1995a).

2.2 Reparación de lesiones simple cadena [LSC]

Más allá de la naturaleza de la lesión, los daños al ADN y los mecanismos de reparación necesarios para corregirlos, pueden clasificarse en dos grandes grupos: lesión en una-de-las-cadenas [LSC: Lesión Simple Cadena] y lesión en las-dos-cadenas [LDC: Lesión Doble Cadena]. La reparación de LSC puede realizarse utilizando la información de la cadena complementaria. *Escherichia coli* cuenta con distintos sistemas que le permiten reparar todo el espectro de

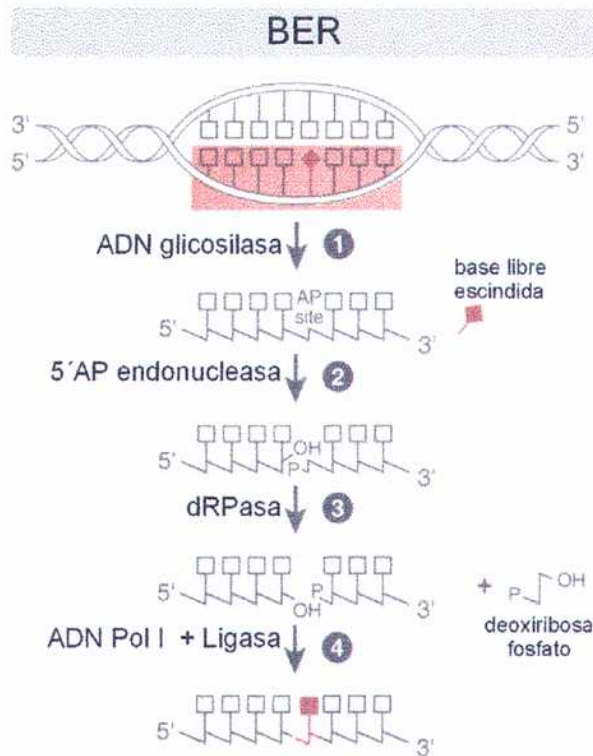


Figura 11 BER: reparación por escisión de bases

Por una cuestión de simplicidad en la mayor parte de la figura sólo se muestra la cadena relevante. [1] Ciertas 'bases modificadas' (esquematizadas como un rombo rojo) son reconocidas por una glicosilasa específica que cataliza la escisión de la base libre por hidrólisis del enlace N-glicosílico que la une a la unidad azúcar-fosfato. Esta reacción deja un sitio abásico en el ADN (AP site). [2] El ataque de estos sitios abásicos por acción de una 5'AP-endonucleasa resulta en un corte de la cadena que deja una unidad de deoxiribosa-fosfato 5' terminal, que es escindida por acción de una fosforibodiesterasa (dRPasa) en el paso [3]. El último paso [4] consiste en rellenar el gap de un nucleótido. Pol I agrega el nucleótido que falta basándose en la información de la cadena complementaria y la Ligasa sella el nick. Las Figuras 11 y 12 han sido adaptadas a partir de Friedberg E.C. et al, 1995c y d.

lesiones posibles.

Por un lado, cuenta con distintas proteínas que permiten la **reversión directa del daño**, es decir reparan la base dañada por acción directa sobre la misma. Ejemplos de este tipo de reparación lo constituyen la Fotoliasa, que monomeriza el dímero de timina formado entre dos bases adyacentes; y las Metiltransferasas, que se unen a una base metilada (producto de la acción de un agente alquilante) y remueven el grupo metilo, restituyendo la base original.

Sin embargo, el tipo de lesiones que puede ser reparado por reversión directa del daño es muy acotado. El mecanismo más general de reparación, res-

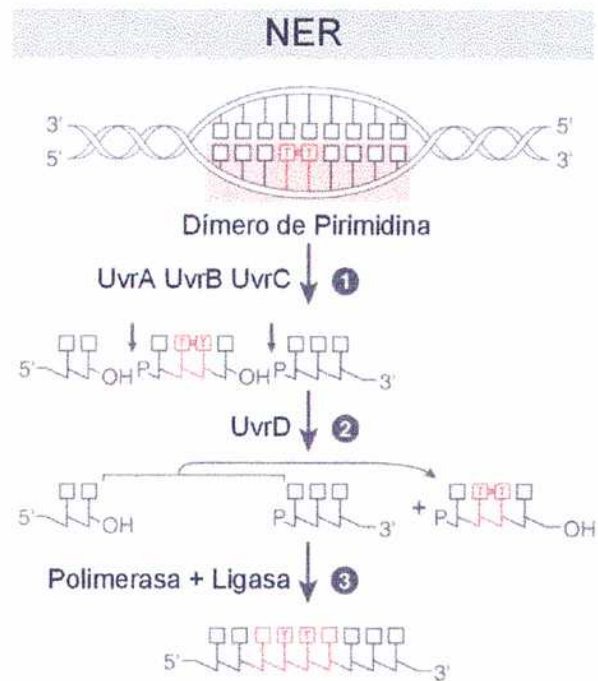


Figura 12 NER: reparación por escisión de nucleótidos

Por una cuestión de simplicidad en la mayor parte de la figura sólo se muestra la cadena relevante. Ciertos daños en las bases nitrogenadas generan una distorsión de la doble hélice. Este sistema de reparación en vez de reconocer una lesión determinada, es capaz de reconocer la distorsión de la hélice que producen distintos tipos de lesiones. En esta figura se ha representado la reparación de un dímero de timina, generado por exposición a la luz UV. [1] El complejo UvrA-UvrB-UvrC reconoce la distorsión en la hélice producida por el dímero de timina y genera un corte a cada lado del dímero, generando un oligonucleótido que podrá ser desplazado por acción de la helicasa UvrD en el siguiente paso [2]. El tamaño del oligonucleótido representado es meramente esquemático (normalmente se escinden oligos de 12 nucleótidos). [3] Finalmente se rellena el gap por acción de Pol I y la Ligasa.

ponsable de la reparación de la mayor parte de las lesiones, consiste en escindir el nucleótido conteniendo la base inapropiada o dañada y reemplazarlo por el nucleótido correcto. Este tipo de reparación se denomina **reparación por escisión**. En términos generales consiste en reconocer una lesión, escindir el nucleótido dañado o un oligonucleótido conteniendo el nucleótido dañado de la cadena correspondiente y luego resintetizar la región escindida basándose en la información de la cadena complementaria. *Escherichia coli* posee tres mecanismos de reparación por escisión, que se describen brevemente a continuación (Friedberg E.C. et al., 1995b).

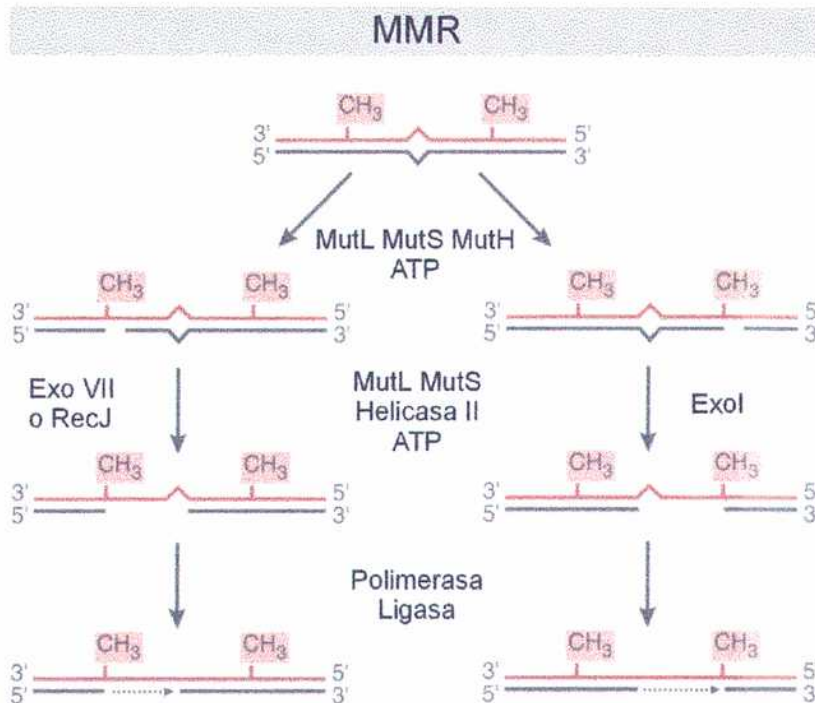


Figura 13 MMR: reparación de mismatches dirigida por el patrón de metilación

Este sistema de reparación se basa en el patrón de metilación para discernir cuál es la cadena recién sintetizada, que por definición será la que contiene el nucleótido incorrecto (producto de un error durante la replicación). Se utiliza el patrón de metilación en las secuencias GATC. Dado que la modificación de la secuencia GATC ocurre con posterioridad a la síntesis de las cadenas de ADN, el ADN recién sintetizado permanece hemimetilado durante una estrecha ventana de tiempo. Es esta ausencia transiente de modificación la que aprovecha el sistema de reparación para reconocer la cadena recién sintetizada. La actividad de endonucleasa latente de MutH se activa en presencia de MutL, MutS y el mismatch. MutH cliva la cadena no-metilada en un sitio GATC que puede estar ubicado a un lado o el otro del mismatch. Dependiendo del extremo generado, Exo I o Exo VII /RecJ remueven el fragmento de ADN que va desde el sitio de corte hasta el mismatch. Finalmente se rellena el gap por acción de una Polimerasa de reparación y la ADN Ligasa. Figura adaptada a partir de Friedberg E.C. et al, 1995e.

2.2.1 BER [Base Excision Repair]: reparación por escisión de la base dañada.

Diversas glicosilasas con especificidad para reconocer una base modificada, eliminan la base dañada generando un sitio abásico. Luego se escinde la unidad deoxiribosa-fosfato correspondiente por acción de una AP-endonucleasa y una deoxiribofosfodiesterasa, generándose un hueco (gap) de un nucleótido en el dúplex. Finalmente la Polimerasa I incorpora el nucleótido que falta utilizando la otra cadena como molde y la Ligasa sella el nick (Friedberg E.C. et al., 1995c).

2.2.2 NER [Nucleotide Excision Repair]: reparación por escisión de nucleótidos.

Aquellas modificaciones que no son reconocibles por glicosilasas, son reparadas por este sistema, que es capaz de reconocer un conjunto de alteraciones que generan distorsión en la doble hélice. El complejo UvrA-UvrB-UvrC reconoce el daño y genera un nick en la hebra correspondiente a cada lado del mismo. Luego, la helicasa UvrD elimina el oligonucleótido conteniendo el daño, permitiendo que Pol I rellene el gap generado utilizando la información de la cadena

complementaria. Finalmente, la Ligasa completa la reparación (Friedberg E.C. et al., 1995d; Sancar A, 1994).

2.2.3 MMR [Methyl directed Mismatch Repair]: reparación de apareamientos incorrectos dirigida por el patrón de metilación.

Este sistema se encarga de reparar apareamientos incorrectos que surgen durante la replicación. Al actuar inmediatamente post-replicación, la hemimetilación del dúplex recién sintetizado le permite al sistema de reparación discernir cuál es la cadena que contiene la secuencia original y eliminar un oligonucleótido, conteniendo el nucleótido que se aparea incorrectamente, de la cadena complementaria. El complejo MutL-MutS-MutH reconoce el apareamiento incorrecto y MutH genera un corte sobre la cadena no-metilada en un sitio GATC que puede estar ubicado a un lado o el otro del mismatch. La acción de Exo I, o de Exo VII/RecJ remueve el oligonucleótido que abarca la región entre el mismatch y el sitio GATC inclusive. Finalmente se rellena el gap y se sella el nick por acción de la ligasa (Friedberg E.C. et al., 1995e; Modrich P., 1994).

2.3 Reparación de Lesiones doble cadena [LDC]

2.3.1 ¿Qué ocurre cuando las dos cadenas están dañadas ?

En los tres mecanismos de reparación por escisión, la maquinaria de reparación se basa en la información de la cadena complementaria para reparar la lesión. ¿Qué ocurre cuando ambas cadenas están dañadas ? En ese caso se requiere de un dúplex homólogo y de la maquinaria de recombinación para recuperar la información que falta. El principio que rige este tipo de reparación es el siguiente [ver Figura 14]: el dúplex dañado debe aparearse e intercambiar cadenas con un dúplex homólogo. La resolución de este intermediario permite generar dos nuevas moléculas de ADN, cada una de las cuales contiene la lesión en una de las cadenas [LSC]. Por lo tanto, podrán ser reparadas por alguno de los mecanismos de reparación por escisión, utilizando la información de la cadena intacta que contiene la secuencia original. En otras palabras, la estrategia consiste en convertir una lesión doble cadena [LDC] en dos lesiones simple cadena [LSC], por intercambio de cadenas entre un dúplex dañado y un segundo dúplex homólogo intacto; habilitando a los mecanismos de reparación por escisión para que reparen las dos LSC (Kuzminov A., 1999).

2.3.2 ¿En qué circunstancias se generan LDC ?

La exposición a radiación ionizante puede inducir cortes concomitantes en las dos cadenas, generando un corte doble cadena [DSB: double strand break]. Sin embargo, las LDC también pueden generarse en ausencia de un agente externo que dañe el ADN, cuando una horquilla de replicación se encuentra con un nick o una lesión, en una de las cadenas molde (Kowalczykowski S.C., 2000). En el caso de encontrarse con un nick, uno de los brazos de la horquilla de replicación se desprende, generando un extremo doble cadena [Figura 15A].

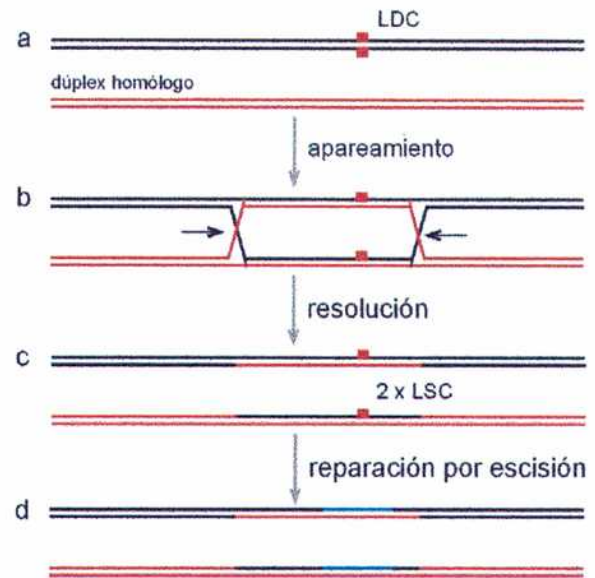


Figura 14 Fundamento de la reparación de LDC.

[A] Se ha representado una molécula de ADN conteniendo una LDC, alineada con un dúplex homólogo (en rojo) [B] los dúplex intercambian cadenas, convirtiendo la lesión doblecadena (LDC) en dos lesiones simple cadena (2x LSC). Las flechas indican el lugar en el que se resuelve el intercambio de cadenas en el siguiente paso. [C] La resolución del intermediario separa nuevamente las dos cromosomas. [D] Finalmente la reparación por escisión repara las dos LSC (sección azul), completando el proceso de reparación. Notar que si los dos cromosomas no son 100% idénticos en toda su extensión el proceso generará cromosomas recombinantes. Figura adaptada a partir de Kuzminov A., 1999.

Por otro lado, si el replisoma se encuentra con una lesión que no ha sido reparada en el molde de la cadena líder, la síntesis de la cadena líder se detiene en la lesión, pero la síntesis de la cadena retrasada puede continuar un tramo más antes de bloquearse. Como resultado de este desacople temporario en la síntesis de las cadenas se genera una brecha simple cadena [SSG: Single Strand Gap] en la cadena líder. Cuando la lesión se encuentra en el molde de la cadena retrasada, la síntesis puede reiniciarse río abajo de la lesión con un nuevo fragmento de Okazaki, dejando un SSG en la cadena retrasada que no puede ser completado. [Figura 15B].

En estos casos se requiere de un dúplex homólogo y de un mecanismo celular que permita aprovechar la información que puede aportar el dúplex intacto (el cromosoma hermano) para reparar el dúplex dañado. La maquinaria de recombinación es la res-

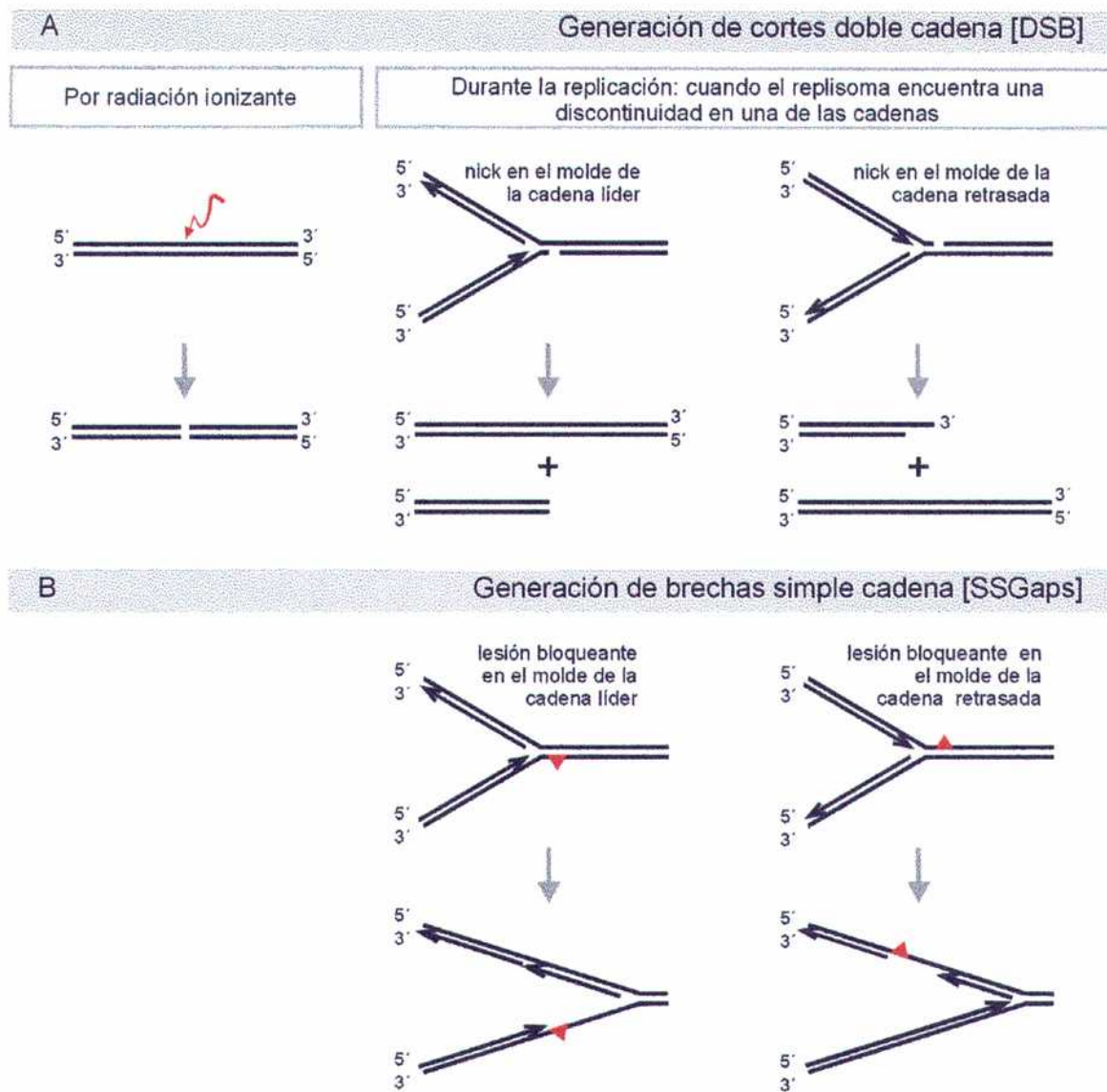


Figura 15 Generación de LDC: cortes doble cadena (DSBreaks) y brechas simple cadena (SSGaps).

[A] La radiación ionizante o la replicación de una molécula de ADN que contiene una discontinuidad en una de las cadenas pueden llevar a la generación de cortes doble cadena. [B] La replicación de una molécula de ADN que contiene una lesión en una de las cadenas molde puede generar una brecha simple cadena o SSGap en una de las cadenas.

ponsable de cumplir con esta función. Es en la reparación de horquillas de reparación dañadas o bloqueadas donde convergen las tres R del metabolismo del ADN: la Replicación, la Recombinación y la Reparación.

Habiendo revisado los mecanismos de replicación y reparación, resta analizar los mecanismos de recombinación homóloga, para poder integrar finalmente los tres procesos en el procesamiento y la reparación de horquillas de replicación bloqueadas o colapsadas.

3 Recombinación

3.1 Modelo general de recombinación homóloga

Esta sección pretende repasar brevemente los mecanismos de recombinación homóloga en bacterias y las funciones celulares involucradas en este proceso en *Escherichia coli*. El proceso de recombinación se puede dividir en cuatro etapas: (1) iniciación, que involucra el procesamiento de los sustratos a recombinar; (2) apareamiento de secuencias homólogas e intercambio de cadenas; (3) extensión del heterodúplex (migración de la bifurcación o branch migration) y por último (4) la resolución.

En la Figura 16 se ha esquematizado el modelo de 'reparación de cortes doble cadena' [DSBR: Double Strand Break Repair], mediante el cual es posible reparar un genoma dañado (por la introducción de un corte doble cadena), por recombinación con el cromosoma homólogo (Kowalczykowski S.C., 2000). Cada una de las etapas delineadas en esta figura, también podría aplicarse para explicar la recombinación homóloga que se da entre dos dúplex de ADN, durante un proceso de conjugación o transducción (que se evidencia en función de la generación de recombinantes, con una cierta frecuencia).

Se ha representado un dúplex que sufre un corte en las dos cadenas que genera dos extremos doble cadena [A]. El primer paso, iniciación, representa el procesamiento del dúplex de ADN conteniendo los dos extremos doble cadena (Edc: Extremo doble cadena) para generar extremos invasivos con una región de ADN simple cadena 3'. En este procesamiento están involucradas las helicasas específicas de recombinación RecBCD y RecQ. Esta última probablemente actúe en conjunto con la exonucleasa RecJ [B].

Sobre el borde izquierdo del esquema se han incluido las proteínas que participan en cada etapa del proceso, según la vía de recombinación utilizada.

Puede observarse que las dos vías difieren en la etapa pre-sináptica, que abarca la iniciación y parte de la segunda etapa, el proceso de cargado de RecA sobre el ADNsc. Las etapas subsiguientes son catalizadas por proteínas comunes a ambas vías: RecA, RuvAB, RecG y RuvC.

RecBCD es una helicasa que también posee una actividad nucleasa que está regulada por la secuencia χ . La modificación de la actividad enzimática de RecBCD por acción de χ está coordinada con el cargado de la proteína RecA sobre ADNsc conteniendo una secuencia χ en el extremo. De esta manera se asegura que el ADNsc generado por acción de RecBCD sobre el extremo doble cadena se incorpore a un complejo nucleoproteico con capacidad recombinogénica (el filamento de RecA sobre la región simple cadena). [Para más detalles referirse a la Figura 18]. Por lo tanto, en la vía RecB, la proteína RecBCD mediante interacciones con la secuencia χ , catalizará concomitantemente el procesamiento del sustrato y el cargado de RecA sobre el mismo [etapas B y C].

La vía alternativa involucra a la helicasa RecQ. En un contexto salvaje RecQ participa en la vía RecF, que funciona predominantemente sobre brechas simple cadena o SSGs [Single Strand Gaps]; pero también puede actuar eficientemente sobre cortes doble cadena en el contexto *recBC sbcBC sbcCD*, en el que RecBCD está inactiva. En la Sección 6 se proporcionan más detalles sobre los mecanismos de recombinación que funcionan en este contexto genético.

La helicasa RecQ trabaja en conjunto con la exonucleasa RecJ, que digiere ADNsc con polaridad 5'→3'. La acción conjunta de estas dos proteínas permite generar un extremo con ADNsc 3' a partir de un extremo doble cadena. Sin embargo, RecQ no puede facilitar el cargado de RecA sobre el ADNsc

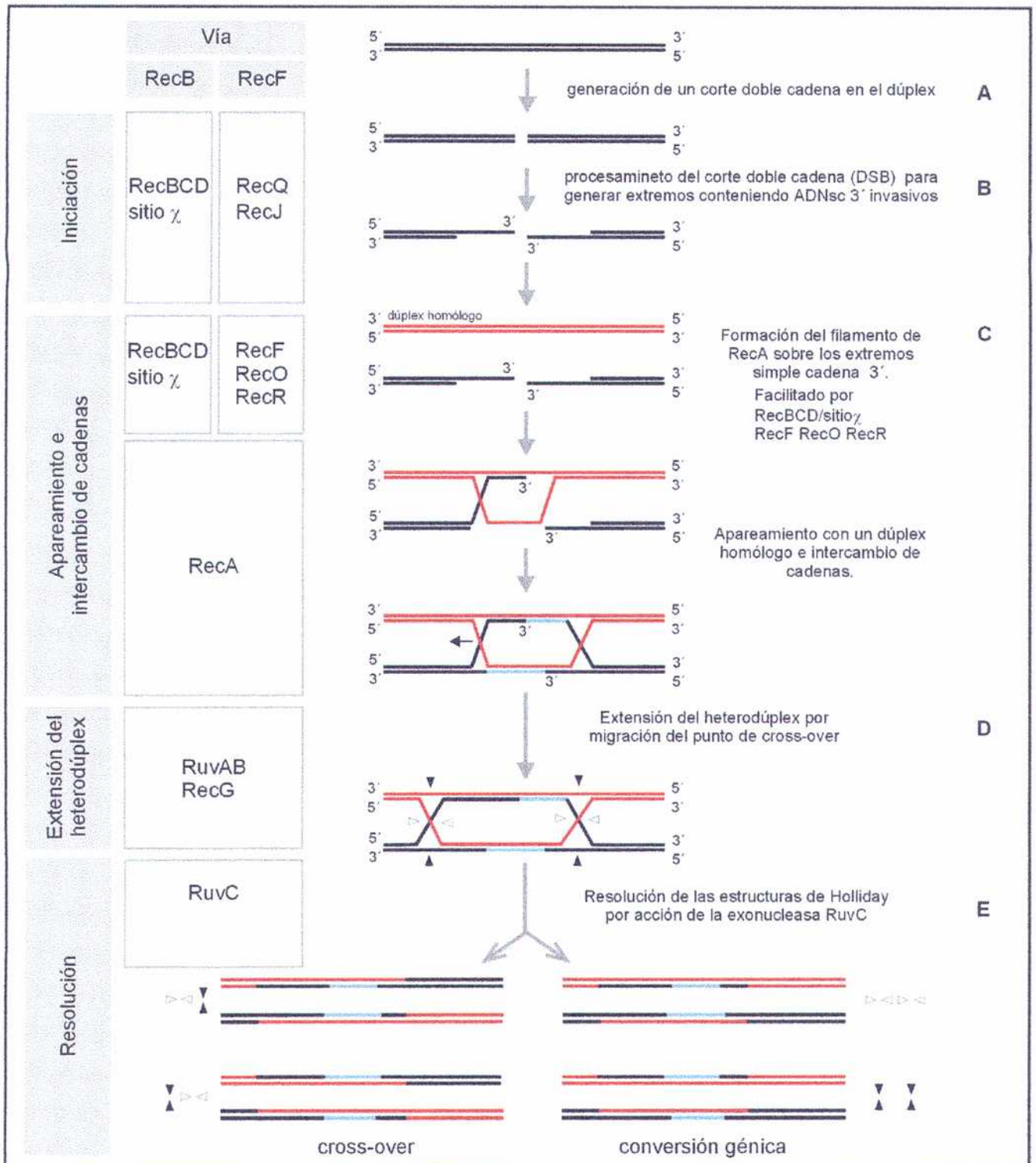


Figura 16 Recombinación homóloga en bacterias: modelo de reparación de cortes doble cadena.

que se va generando. Se requiere de proteínas accesorias para permitir que RecA desplace a SSB del ADNsc. Las proteínas accesorias RecF, RecR y RecO facilitan el cargado de la proteína RecA sobre SSGaps o sobre el ADNsc generado a partir de un extremo doble cadena [Edc] por acción de

RecQ/RecJ.

Una vez ensamblado del denominado filamento pre-sináptico sobre el ADNsc, sobreviene la búsqueda de homología, el apareamiento con el dúplex homólogo y el intercambio de cadenas. Todas estas actividades son catalizadas por el nucleofilamento

RecA-ADNsc. También se requeriría de una polimerasa para sintetizar las regiones del dúplex negro que han sido degradadas, utilizando las cadenas del dúplex rojo como molde (en la figura, se ha representado en azul el ADN sintetizado).

La tercera etapa consiste en extender el heterodúplex y aquí entra en juego el complejo RuvAB [D]. Este complejo es una ADN helicasa, con afinidad por Estructuras de Holliday [EH], que extiende la región de heterodúplex haciendo migrar el punto de cross-over o intercambio de cadenas (en el esquema se ha indicado el sentido de migración del punto de cross-over con una flecha).

Para finalizar el proceso de recombinación hace falta separar las dos moléculas de ADN. Esta etapa de resolución es catalizada por RuvC, una endonucleasa específica para estructuras de Holliday que actúa en conjunto con RuvAB [E].

La consumación ordenada de cada una de estas etapas resultará en la formación de recombinantes que exhibirán crossing-over (XO) o conversión génica, dependiendo de cómo se hayan resuelto las dos estructuras de Holliday en el intermediario de recombinación. Se han esquematizado todos los cortes posibles con puntas de flecha negras y blancas. Cabe aclarar, que si los dos dúplex que recombinan entre sí son moléculas circulares, en caso de generarse un crossover, los dos círculos quedarán formando un único círculo. Más adelante se volverá sobre las implicancias que tiene este tema en la replicación de un genoma circular.

En la Figura 17 se ha esquematizado el intercambio de cadenas entre dos dúplex homólogos, con el objeto de mostrar las cuatro alternativas para resolver un intermediario de recombinación que contiene dos estructuras de Holliday. En la Sección A de la figura, se muestra la isomerización de una estructura de Holliday (EH) por un giro de 180°, para adoptar la configuración planar abierta. Se ha postulado que cuan-

do RuvA se une a la EH, la fuerza a adoptar esta configuración. Por otro lado, en esta configuración es más sencillo visualizar el resultado de realizar un par de cortes simétricos sobre la EH en sentido vertical u horizontal. En la monografía escrita por A. Kuzminov (Kuzminov A., 1999) se presenta un modelo muy interesante para explicar la migración de EH por acción de RuvAB y el corte de cadenas catalizado por RuvC.

En la Sección B de la Figura 17, se muestra un intermediario de recombinación entre dos dúplex de ADN, conteniendo dos EH [B1]. La isomerización de estas dos EH nos permite analizar este intermediario de recombinación, según se indica en [B2]. Cada estructura de Holliday se resuelve mediante dos cortes simple cadena simétricos, que se han representado con flechas en diagonal, numeradas 1 y 2 según la orientación en la que se realizan los cortes.

Si aceptamos que cada EH se resuelve en forma independiente de la otra, existen cuatro posibilidades para resolver este intermediario de recombinación, que se han representado como 1-1, 1-2, 2-1 y 2-2, en función de la orientación del par de cortes en la primera y segunda EH respectivamente.

En dos de estas posibilidades (1-1) y (2-2), el dúplex negro queda unido al dúplex rojo (cross-over). Si las dos moléculas son circulares, el resultado de estas dos alternativas de resolución, será la generación de un único círculo. En las dos alternativas restantes, los dúplex solo intercambian la región abarcada por las dos estructuras de Holliday (conversión génica) (Kuzminov A., 1999).

3.2 Las dos vías de recombinación: RecB y RecF

En *Escherichia coli*, las funciones de recombinación han sido clasificadas en dos sistemas: las vías RecB y RecF de recombinación, cada una de las cuales involucra un conjunto de proteínas que actúa en las etapas tempranas pre-sinápticas del proceso de recombinación.

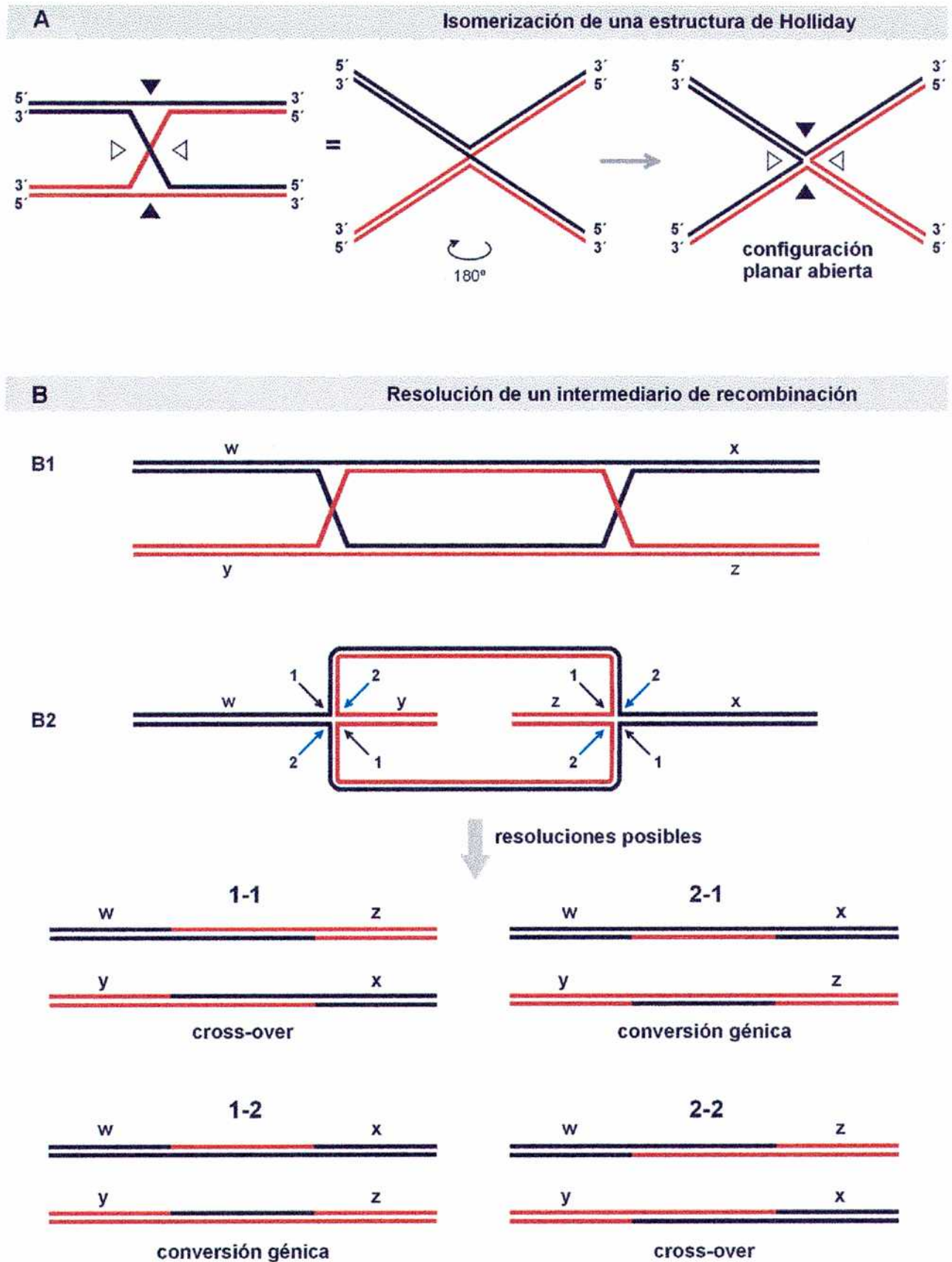


Figura 17: Resoluciones posibles de un intermediario de recombinación conteniendo dos Estructuras de Holliday

La vía RecB es utilizada principalmente cuando uno de los sustratos es una molécula de ADN lineal o contiene un extremo doble cadena [Edc: Extremo doble cadena]. Estos Edc son reconocidos por el complejo proteico RecBCD, que posee actividad helicasa y nucleasa. RecBCD es capaz de moverse a lo largo del dúplex de ADN, desenrollando las hebras y degradando preferentemente el extremo 3' hasta encontrarse con una secuencia χ en la orientación correcta. Al interactuar con χ modifica su actividad: continúa desenrollando el dúplex pero su actividad nucleasa se vuelca hacia la hebra 5', generándose de esta manera un extremo simple-cadena 3' [3'ss overhang] sobre el cual RecA puede polimerizar para comenzar la búsqueda e invasión del dúplex homólogo. De hecho, RecBCD, después de interactuar con χ , facilita el cargado de RecA sobre el extremo simple cadena 3' que va generando, asegurándose de esta manera que el ADNsc se incorpore a un complejo nucleoproteico con capacidad recombinogénica [Figura 18].

Respecto de esta capacidad de las secuencias χ de modular la actividad de la enzima RecBCD, cabe mencionar la existencia de mutantes de *recC* y *recD* en los que se pierde esta regulación, ya que estos mutantes serán utilizados en la sección 2.2 (Resultados-cap. 2) del presente trabajo. Los mutantes *recC*₁₀₁₀ y *recD*₁₉₀₃, no degradan el ADN lineal tan rápidamente (no poseen actividad ExoV), pero mantienen la actividad recombinogénica (se comportan como Rec⁺ en ensayos de conjugación y transducción). Sin embargo, esta actividad recombinogénica se vuelve independiente de la secuencia χ . Se ha comprobado que estos mutantes son capaces de desenrollar un dúplex lineal conteniendo un Edc y cargar a RecA sobre la cadena que contiene el extremo 3', independientemente de la secuencia χ . Por lo tanto, in vivo estos mutantes se comportan como Rec⁺, independientemente de que el sustrato a

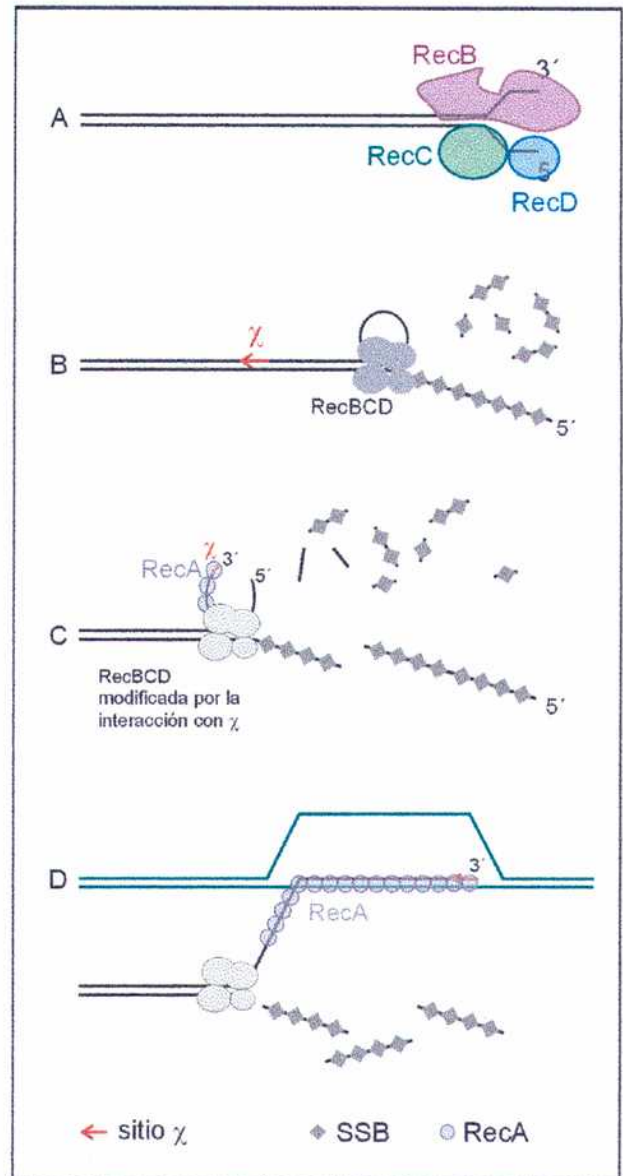


Figura 18 Procesamiento de DSE por RecBCD.

[A] RecBCD se une a un extremo doble cadena (DSE). [B] Comienza desenrollando el dúplex mientras degrada preferentemente la cadena 3'. [C] Al interactuar con χ se modifican las actividades del complejo RecBCD: se atenúa la actividad nucleasa 3'→5' y se exagera la actividad nucleasa 5'→3' que anteriormente era muy débil. El complejo sigue desenrollando el dúplex y se facilita el cargado de RecA sobre el ADNsc 3' que se va generando, que contiene el sitio χ en el extremo. [D] El nucleofilamento RecA-ADNsc invade un dúplex homólogo, generando un D-loop. Figura adaptada a partir de Kowalczykowski S.C. 2000.

recombinar posea un sitio χ (Churchill J.J., et al., 1999).

La vía RecF cobra mayor importancia en la reparación de brechas simple cadena [SSG: Single Strand Gap] que pueden generarse durante el proceso de replicación. Cuando el replisoma encuentra una lesión que no ha podido ser reparada en una de las cadenas molde, se genera una brecha simple cadena

[SSGap] en uno de los cromosomas que sólo podrá ser reparado utilizando la información del cromosoma hermano (desarrollado en la sección 2.3.2, Figura 15). RecF, con la ayuda de RecR y RecO, sería capaz de facilitar el ensamblaje del nucleofilamento de RecA sobre el SSG para que pueda repararse por recombinación utilizando la información del cromosoma hermano (Umezú K., 1993; Umezú K. & Kolodner R., 1994; Webb B.L., 1997). En la sección 4.1, se presentan más detalles sobre este mecanismo de reparación.

Dado que los ensayos utilizados para estimar la capacidad recombinogénica en *E.coli*, normalmente se basan en la determinación de la frecuencia de producción de recombinantes en ensayos de transducción y conjugación, y éstos involucran moléculas lineales de ADN, por mucho tiempo se consideró que la vía RecB era la principal vía de recombinación en este microorganismo (los mutantes *recB* presentan una frecuencia de generación de recombinantes 100 veces menor a la de una cepa salvaje).

Sin embargo, últimamente, se ha puesto en evi-

dencia que la función primordial del sistema de recombinación bacteriano es la reparación de horquillas de replicación. En el contexto de reparación de horquillas de replicación, la vía RecF parece ser tan importante como la vía RecB (Galitski T. and Roth J.R. 1997, Steiner W.W. and Kuempel P.L. 1998). Cada vía sería responsable de reconocer y procesar los distintos sustratos que pueden generarse como resultado del bloqueo o colapso de una horquilla de replicación, en función de las propiedades de las proteínas pre-sinápticas involucradas en cada una de ellas. Una vez procesados los sustratos, las dos vías convergen en la vía única de intercambio de cadenas que depende de RecA y comparten las proteínas responsables de la extensión del heterodúplex y la resolución del intermediario de recombinación.

En la siguiente sección se aborda el tema de 'reparación de horquillas de replicación dañadas', proceso en el cual interactúan las maquinarias de replicación, recombinación y reparación, para asegurar que se complete la replicación del genoma.

4 Reparación de horquillas de replicación mediada por recombinación

4.1 Procesamiento de la horquilla dañada

Los mecanismos de reparación por escisión aprovechan la redundancia de información que representa un dúplex de ADN, que les permite eliminar la lesión de la cadena dañada y usar la cadena complementaria como molde para resintetizar correctamente el fragmento de ADN eliminado. Cuando una horquilla de replicación se encuentra con una lesión o una discontinuidad en una de las cadenas molde, en general se generan estructuras en las cuales las dos cadenas están dañadas.

En la Figura 19 se han esquematizado las vías de reparación de horquillas de replicación bloqueadas o colapsadas (Cox M.M., 1998, 2001; Cox M.M. et al., 2000; Michel B. et al., 2001; Gregg A.V. et al., 2002). La vía de la izquierda, describe algunos de los procesos involucrados en la reparación de horquillas de replicación que encuentran una lesión en el molde de la cadena líder. Tal como se describió en la sección 2.3.2., cuando el replisoma se topa con una lesión en el molde de la cadena líder, si bien se frena la síntesis de esta cadena en el lugar de la lesión, la síntesis de la cadena retrasada puede continuar (presumiblemente hasta completar el fragmento de Okazaki). Este desacople en la síntesis de las dos cadenas resulta en la generación de una brecha simple cadena o SSG sobre la cadena líder

Los mecanismos de reparación por recombinación delineados en esta sección de la figura no intentan reparar ellos mismos la lesión, sino generar una estructura alternativa que provea la cadena complementaria para que, los mecanismos de reparación por escisión, reparen la lesión.

El proceso que permite iniciar la reparación de la horquilla dañada se denomina regresión de la horquilla y consiste en el apareamiento de las dos cadenas

recién sintetizadas de manera de hacer retroceder la horquilla. Este proceso genera una four-way-junction o empalme-de-las-cuatro-cadenas que se denomina chicken-foot o 'pata de gallo', debido a la apariencia que presenta al microscopio electrónico [Figura 19i]. Si la horquilla bloqueada posee un SSG en la cadena líder, tal como se presenta en esta figura, RecA puede formar un filamento sobre el ADNsc del gap, asistida por RecF-RecO-RecR, y catalizar la regresión de la horquilla. De lo contrario, este proceso es catalizado por RecG.

La 'pata de gallo' puede ser procesada por distintas vías, algunas de las cuales están esquematizadas en la sección ii de la figura. En (iia) se ha esquematizado la vía propuesta para explicar el salteado (bypass) de lesiones por acción de Pol II, durante las primeras etapas de la respuesta SOS (Rangarajan S. et al., 2002). Se completa el gap (flecha azul) utilizando como molde la otra cadena recién sintetizada y al revertir la regresión puede reiniciarse la replicación río abajo de la lesión. La lesión, al quedar formando parte de un dúplex, podrá ser reparada por los mecanismos de reparación por escisión.

En (iib) la regresión de la horquilla otorga tiempo adicional para que la lesión pueda ser reparada por los mecanismos de reparación por escisión. Al revertir la regresión puede reiniciarse la replicación sobre el molde reparado (sección azul).

En (iic) se ha esquematizado un tercer mecanismo alternativo para procesar la 'pata de gallo'. Dado que esta estructura contiene un empalme-de-cuatro-cadenas (EH: estructura de Holliday), puede ser reconocido por el complejo helicasa/exonucleasa específico para EH, el complejo RuvABC. El clivaje de la EH, según indicado por las flechas azules, resulta en la generación de un extremo libre doble cadena que

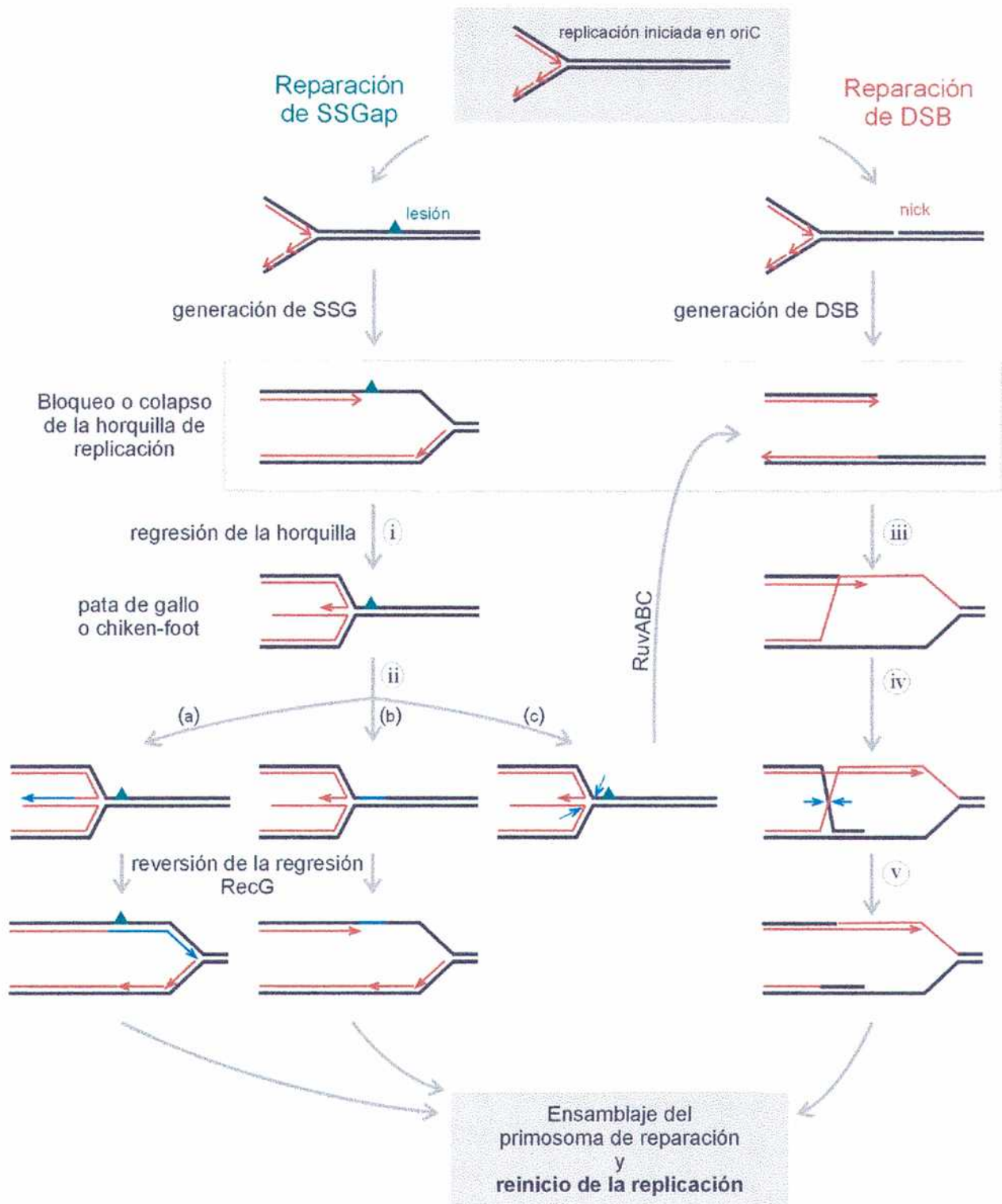


Figura 19 Reparación de horquillas de replicación bloqueadas o colapsadas.

Se han esquematizado las vías propuestas para explicar la reparación de horquillas de replicación. En la sección de la izquierda se ha representado la reparación de un SSG que se genera en uno de los cromosomas, cuando la horquilla de replicación se encuentra con una lesión en el molde de la cadena líder. La reparación comienza con la regresión de la horquilla, generando la estructura denominada 'pata de gallo'. Esta puede ser procesada de distintas maneras para reconstituir la horquilla.

En la sección de la derecha se ha representado el colapso de una horquilla de replicación al arribar a un nick en el molde de la cadena líder. La reparación en este caso involucra un proceso de recombinación homóloga (vía dependiente de RecBCD) que restaura la horquilla utilizando la información que aporta el cromosoma hermano.

En todos los casos, una vez restaurada la horquilla es necesario ensamblar un primosoma de reparación que permita reclutar a la maquinaria de replicación para reiniciar la replicación. Para más detalles referirse al texto.

debe ser procesado por la otra vía, la vía de reparación de extremos doble cadena, delineada en la sección derecha de la figura.

La vía de la derecha describe el mecanismo propuesto para reparar horquillas de replicación que colapsan al encontrarse con una discontinuidad en una de las cadenas molde. Cuando el replisoma encuentra un nick en el molde de la cadena líder, uno de los brazos de la horquilla se desprende, generándose un extremo doble cadena (Edc). Este Edc puede ser procesado por RecBCD para convertirlo en un extremo conteniendo ADNsc 3', sobre el cual va cargando a la proteína RecA. El nucleofilamento RecA-ADNsc puede entonces invadir el dúplex homólogo, que en este caso sería el cromosoma hermano (el otro brazo de la horquilla) o el mismo dúplex parental (este caso no ha sido representado en este esquema). La extensión del heterodúplex y el clivaje de la EH por acción de RuvABC permiten regenerar la horquilla de replicación.

Una vez restaurada la horquilla por alguno de los mecanismos antes detallados, hace falta reclutar a la maquinaria de replicación para reiniciar la replicación. Dado que la horquilla puede haberse bloqueado o colapsado en cualquier región del genoma, la bacteria necesita un primosoma de reparación que sea capaz de reconocer las estructuras generadas durante el proceso de restitución de la horquilla y ensamblar nuevamente el replisoma en dicho lugar para que pueda completarse el ciclo de replicación.

4.2 Reinicio de la replicación sobre la horquilla reparada: PriA y el primosoma de reparación.

En la sección 1.1.4, se mencionó que *Escherichia coli* posee dos tipos de primosomas. El primosoma *oriC* está compuesto por DnaB y DnaG y se ensambla en el origen por acción de DnaA y DnaC. Este primosoma se encarga de cargar la maquinaria de replicación en *oriC* para iniciar la replicación del genoma;

y luego participa del proceso de elongación desenrollando el dúplex parental y sintetizando los cebadores que permiten la iniciación de los fragmentos de Okazaki que componen la cadena retrasada. Tanto DnaA (que permite el ensamblado del primosoma-*oriC* en el origen), como DnaB y DnaG son esenciales en *Escherichia coli*. Mutantes termosensibles de DnaB y DnaG presentan un bloqueo inmediato de la replicación al transferir las células a la temperatura restrictiva.

El segundo primosoma denominado $\Phi X174$, se descubrió en función de su rol en el inicio de la replicación del fago $\Phi X174$ y los plásmidos de tipo ColE1. Está constituido por las proteínas PriA, PriB, PriC, DnaT, la helicasa DnaB y la primasa DnaG. Si bien DnaC no forma parte del primosoma, es necesaria para su ensamblaje. La proteína PriA dirige el ensamblaje de este tipo de primosoma. Tanto en el caso del fago $\Phi X174$, como en el de los plásmidos de tipo ColE1, PriA reconoce la estructura secundaria adoptada por el sitio PAS (sitio de ensamblaje del primosoma), cuando éste se expone sobre ADNsc y comienza a reclutar al resto de las proteínas primosomales PriB, PriC y DnaT. La interacción del complejo DnaC-DnaB con DnaT permite cargar un hexámero de DnaB sobre el ADNsc y la posterior interacción de DnaB con DnaG completa el primosoma.

PriA es esencial para la replicación del fago $\Phi X174$ y los plásmidos de tipo ColE1 en *Escherichia coli*. Sin embargo, no se requiere para el ensamblaje del primosoma en *oriC*, ni para la síntesis de los fragmentos de Okazaki. De hecho, al completarse la secuenciación del genoma de *E. coli* no se encontraron secuencias homólogas al sitio PAS consenso (Masai H. & Arai K., 1996). Por mucho tiempo se desconoció cuál era la importancia fisiológica tanto de PriA como de PriB, PriC y DnaT para la bacteria. Cuando se logró clonar PriA por genética reversa y se construyeron mutantes, el fenotipo pleiotrópico que

exhibían mutantes nulos de *priA*, proporcionó el primer indicio de que el primosoma Φ X174 cumplía un papel esencial en la fisiología bacteriana (Lee E.H. et al., 1990, Lee E.H. & Kornberg A., 1991; Nurse P. et al., 1991)

PriA es una proteína de 732 aminoácidos, con capacidad para unirse específicamente a moléculas de ADN que contengan estructuras tales como: un tallo enrollado o stem-loop (sitios PAS), un D-loop o una estructura en Y (horquilla como la que se encuentra en el intermediario de transposición del fago Mu) (Mc Glynn P. et al., 1997; Nurse P. et al., 1999; Masai H. & Arai K., 1996; Jones J.M. & Nakai H., 1997). Posee actividad ATPasa y helicasa, con una polaridad 3'→5'. Estas actividades pueden separarse genéticamente de su actividad de 'ensamblaje de primosoma' [EP]. Es decir, existen mutantes carentes de actividad ATPasa y Helicasa que mantienen la capacidad de ensamblar un primosoma. La proteína PriA contiene varios motivos helicasa y un dominio 'dedos-de-zinc' (zinc-finger) sumergido entre dos de estos motivos hacia el extremo carboxi-terminal de la proteína. Este dominio dedos-de-zinc, rico en cisteínas, es inusual en una helicasa y probablemente sea responsable de algunas de las propiedades únicas de esta proteína [ver esquema de PriA en la Figura 58, sección 2.1.1 Resultados-Cap 2].

A comienzos de los 90, dos grupos de investigación construyeron mutantes *priA* nulos. La mutante $\Delta priA1::kan$, contiene una delección de los codones 406 a 466 y una inserción de un gen de resistencia a kanamicina río abajo del codón 405 (Lee E.H. & A. Kornberg, 1991). La mutante *priA2::kan* contiene una inserción del marcador de resistencia a kanamicina entre los codones 154 y 155 (Nurse P. et al., 1991). Los extractos proteicos, preparados a partir de estas dos cepas son incapaces de permitir la replicación *in vitro* del fago Φ X174. Estas mutantes no pueden ser infectadas por los fagos Φ X174 y Mu, ni permiten el

establecimiento de plásmidos derivados de ColE1.

Las cepas deficientes en *priA* exhiben una viabilidad muy reducida [1-10 % la viabilidad de una cepa salvaje], incluso menor que la de una mutante *recA*. Presentan un alto grado de filamentación e inducción constitutiva de la respuesta SOS (ver sección 4.4 para una descripción de la respuesta SOS). Es posible suprimir la inducción del regulón SOS por complementación con la mutante PriA300, que carece de actividad helicasa, pero mantiene intacta la capacidad de ensamblar un primosoma [fenotipo Hel⁻ EP⁺]. El hecho de que las mutantes *priA* presentaran niveles inducidos del regulón SOS sin ser expuestas a un agente exógeno que dañara el ADN, y que esta inducción fuera suprimible por la función de 'ensamblaje de primosoma' de PriA, sugirió que la función celular de PriA podría ser la de reiniciar la replicación sobre horquillas de replicación bloqueadas por la presencia de lesiones en el ADN, provocadas por agentes endógenos (producto del propio metabolismo celular) (Nurse P. et al., 1991; Zavitz K.H. & Mariani K.J., 1992). La investigación subsiguiente del resto de los fenotipos que exhibe una mutante *priA* proveyó mayores precisiones sobre el mecanismo por el cual PriA cumple con esta importante función celular.

El fenotipo de las mutantes *priA* incluye: sensibilidad al medio rico (los recuentos en placas de LB son 100-1000 veces inferiores a los obtenidos en placas de medio mínimo) y deficiencias muy marcadas en (a) recombinación homóloga (en mutantes *priA*, la frecuencia de obtención de recombinantes en ensayos de transducción y conjugación es 100-1000 veces inferior a la de la cepa salvaje), (b) procesos de replicación independientes del origen tales como la 'replicación estable del ADN, inducible y constitutiva' (iSDR y cSDR: fenómenos que se explican más adelante); (c) reparación de cortes doble cadena y de daños al ADN generados por radiación UV (los mutantes *priA* son 10000 veces más sensibles a la

radiación γ y 100 veces más sensibles al UV que una cepa salvaje) (Marians K.J., 2000).

Todos estos fenotipos también son suprimibles por una mutante PriA300 [fenotipo Hel⁻ EP*]. ¿De qué manera se pueden explicar todos estos fenotipos en base a la pérdida de la capacidad de ensamblar un primosoma PriA-dependiente? Si se analiza cada uno de los fenotipos detallados anteriormente, se deduce que el factor que tienen en común es que todos involucran un proceso de recombinación:

(a) deficiencia en recombinación homóloga:

Tokio Kogoma propuso que la reducción en la frecuencia de generación de recombinantes durante ensayos de transducción tenía dos explicaciones posibles. Una de ellas sería que se requiere extensa replicación para completar un proceso de recombinación, es decir que es necesario ensamblar dos horquillas de replicación sobre el intermediario de recombinación para completar la resolución del mismo. En otras palabras, para generar un recombinante durante el proceso de transducción, se requeriría invasión del genoma por parte del fragmento de ADNdc que ingresa a la célula, el ensamblaje de dos horquillas de replicación a partir de las zonas de invasión en direcciones opuestas y la replicación del resto del genoma. La otra posibilidad para explicar la baja eficiencia de obtención de recombinantes en ensayos de transducción y conjugación realizados con mutantes *priA*, sería suponer que la presencia de intermediarios de recombinación bloquee el avance del replisoma de manera tal que para obtener recombinantes se requeriría irremediablemente del reinicio de la replicación mediado por PriA (Kogoma T. et al., 1996; Kogoma T., 1996).

(b) incapacidad de las mutantes *priA* de experimentar iSDR y cSDR. Bajo ciertas condiciones especiales, *Escherichia coli* experimenta replicación del genoma en forma independiente de *oriC* y DnaA. Estos fenómenos se denominan iSDR [inducible,

Stable DNA Replication: replicación estable del ADN, inducible] y cSDR [constitutive SDR: replicación estable del ADN, constitutiva]. En el caso de iSDR, la inducción del regulón SOS dispara la replicación del genoma en forma independiente de DnaA y *oriC*. Este fenómeno es dependiente de RecA y RecBCD, además de PriA. Por otro lado, en mutantes *mhA* (y en mutantes *recG*) también se registra replicación del genoma independiente de DnaA. De ahí que se denomine cSDR, ya que ocurre constitutivamente sin necesidad de inducir la respuesta SOS. Este fenómeno también requiere RecA y PriA pero es independiente de RecBCD. Kogoma propuso que durante iSDR y cSDR, RecA cataliza la formación de D-loops y R-loops (que son estabilizados por la ausencia de RNAsaH) respectivamente, sobre los cuales PriA ensambla el replisoma, permitiendo que se inicie la replicación ectópicamente de manera independiente de DnaA. Serían procesos equivalentes a la replicación dependiente de recombinación del fago T4 (Masai H. et al., 1994; Asai T. & Kogoma T., 1994; Kogoma T., 1997).

(c) Incapacidad para reparar cortes doble cadena y lesiones que se generan en el ADN por exposición a radiación UV. En la sección anterior se precisaron los mecanismos por los cuales una horquilla de replicación puede bloquearse o colapsar al encontrarse con una lesión o discontinuidad en una de las cadenas molde. La maquinaria de recombinación puede restaurar la horquilla por distintas vías, pero en todos los casos, para completar el proceso de reparación, hace falta cargar el replisoma sobre la horquilla reconstituída para reiniciar la replicación. PriA sería necesaria para completar esta última etapa del proceso de reparación (Kogoma T. et al., 1996).

La sensibilidad al medio rico podría explicarse considerando que una bacteria creciendo en un medio rico posee un ciclo celular muy corto y para lograr completar la replicación del genoma antes de

Ensamblaje de un primosoma de reparación sobre un D-loop

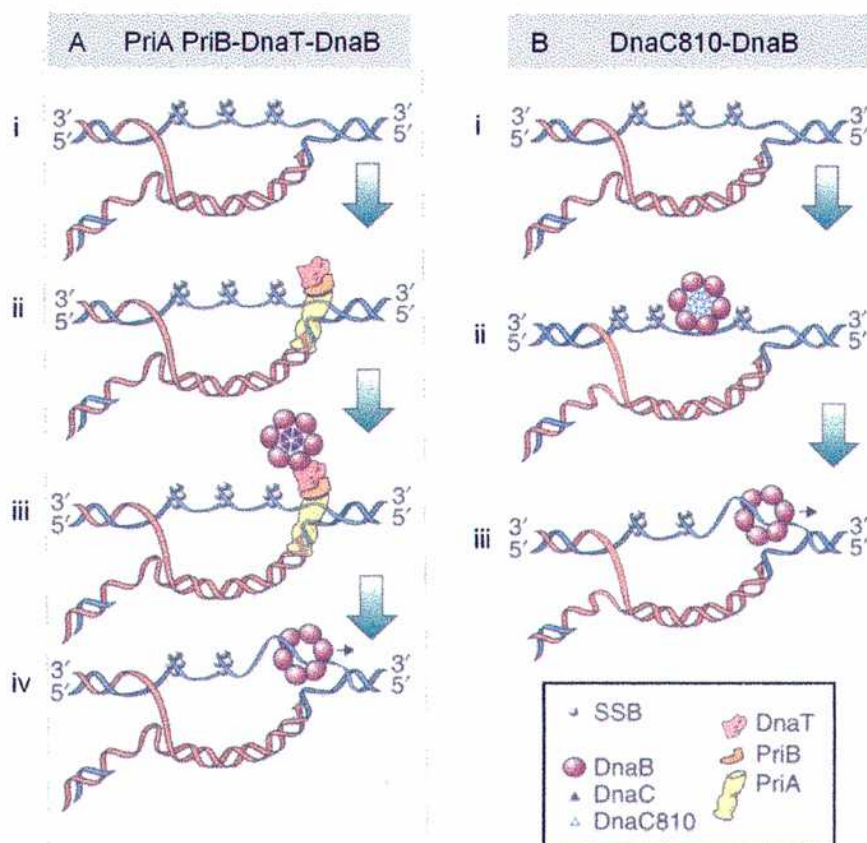


Figura 20 Ensamblaje de un primosoma de reparación sobre un D-loop.

[A] Ensamblaje del primosoma de reparación sobre un D-loop dirigido por PriA. [i] Cuando un extremo simple cadena 3' invade un dúplex homólogo, se genera un heterodúplex entre la cadena invasora y una de las cadenas del dúplex invadido, al tiempo que la cadena complementaria del mismo resulta desplazada. Esta estructura se denomina D-loop o loop de desplazamiento. [ii] PriA reconoce el D-loop, se une al ensamblaje de tres cadenas generado entre el dúplex receptor y el extremo 3' invasivo y recluta a PriB y DnaT hacia el D-loop. [iii y iv] La interacción entre DnaT y el complejo DnaB-DnaC, permite que se cargue un hexámero de DnaB sobre la cadena desplazada del dúplex.

[B] Ensamblaje del primosoma de reparación en ausencia de PriA en un contexto *dnaC810*. Aparentemente, la mutante DnaC810 es capaz de cargar a DnaB sobre la cadena desplazada del dúplex por sí misma. Parece ser capaz de competir con SSB y cargar a la helicasa sobre el ADNsc recubierto por SSB, sin la intervención de otras proteínas.

Las pequeñas flechas negras indican la dirección en la que se mueve DnaB y por ende la dirección en la que comenzará a avanzar el replisoma. Figura reproducida a partir de Mariani K.J. 2000.

que se concluya el ciclo debe iniciar nuevas rondas de replicación antes de concluir la que está en marcha. Por ende, posee simultáneamente más de dos horquillas de replicación en marcha durante un mismo ciclo, aumentando significativamente la posibilidad de que el replisoma se tope con lesiones/nicks en las cadenas molde que no hayan sido reparadas y sobrevenga el colapso o bloqueo de la horquilla (Kogoma T., 1997).

Todas estas líneas de investigación llevaron a la conclusión de que PriA es capaz de ensamblar un primosoma de reparación sobre distintos intermediarios de recombinación, permitiendo el reinicio de la replicación a partir éstos. En función de la viabilidad marginal que presentan las mutantes *priA* se dedujo que, en condiciones normales de crecimiento aeróbico, la mayoría de las horquillas de replicación se encuentra con alguna lesión o nick en una de las cadenas molde que produce un bloqueo o colapso la horquilla antes

de que alcance el terminus. La horquilla es reparada por acción de la maquinaria de recombinación y luego se requiere de PriA para ensamblar el primosoma de reparación, que permite volver a cargar el replisoma en la región en la que se produjo el bloqueo, posibilitando el reinicio de la replicación (Cox M.M., 2000; Mariani K.J., 2000; Sandler S.J. & Mariani K.J., 2000).

Estas hipótesis son avaladas por experimentos *in vitro* utilizando un ADN circular doble cadena conteniendo un D-loop, que demuestran que PriA es capaz de permitir el establecimiento de una horquilla de replicación a partir del D-loop (Liu J. et al., 1999; Liu J. & Mariani K.J., 1999).

En la Figura 20A se presenta un modelo para explicar el ensamblado de un primosoma de reparación sobre un D-loop, generado durante un proceso de recombinación. PriA reconoce la estructura del D-loop, se une al mismo y recluta a PriB y DnaT.

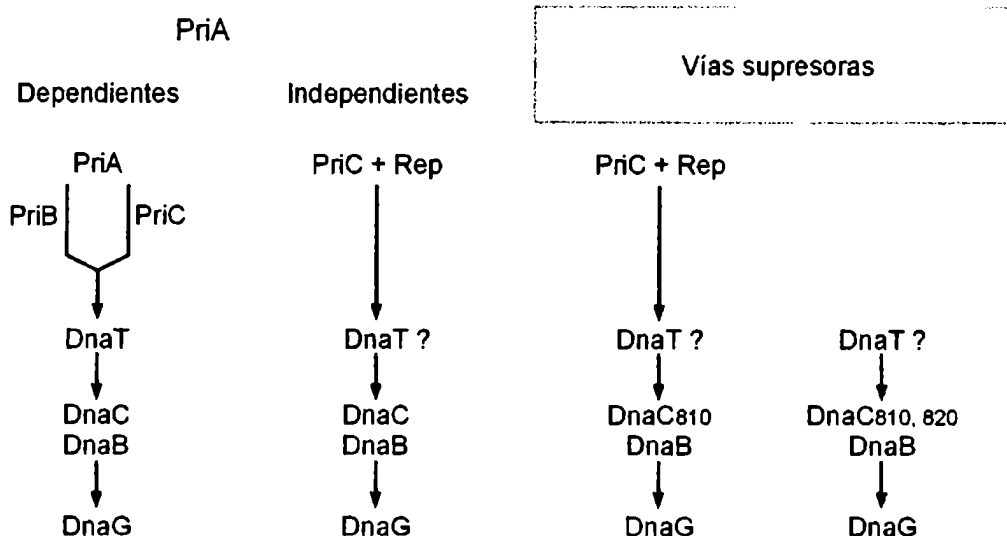


Figura 21 Vías alternativas para ensamblar un primosoma de reparación.

Interacciones entre DnaT y el complejo DnaC-DnaB permiten cargar un hexámero de DnaB sobre el ADNsc de la cadena desplazada del D-loop. Interacciones entre DnaG y la helicasa DnaB, cargada sobre la cadena desplazada del intermediario de recombinación, completan el primosoma de reparación, permitiendo que se inicie la síntesis de la cadena discontinua; al tiempo que el extremo 3' simple cadena que generó el D-loop puede utilizarse como cebador para iniciar la síntesis de la cadena líder (Marians K.J., 2000).

Las mutantes *priA* nulas adquieren mutaciones supresoras que restauran la viabilidad y suprimen las deficiencias en recombinación homóloga, reparación de cortes doble cadena y lesiones inducidas por UV. Todos estos supresores mapean en el locus *dnaC* (Sandler S.J., 1996). DnaC es la proteína que forma un complejo con DnaB en solución y facilita el cargado de la helicasa sobre el ADNsc. La mutante DnaC810, que *in vivo* suprime todas las deficiencias de una mutante *priA*, *in vitro* es capaz de saltar (bypasear) la necesidad de PriA, PriB y DnaT y ensamblar una horquilla de replicación sobre una molécula de ADNdc conteniendo un D-loop, con la sola presencia de DnaB y la holoenzima Pol III. En la Figura 20B se presenta un modelo en el que se muestra a la

mutante DnaC810 cargando a la helicasa DnaB sobre el intermediario de recombinación, independientemente de PriA.

4.3 Múltiples vías para ensamblar el primosoma de reparación.

Las mutantes $\Delta priB$ y $\Delta priC$ no exhiben ninguna de las deficiencias de la mutante *priA*. Sin embargo, la combinación de estas dos mutaciones en la doble mutante $\Delta priB \Delta priC$ resulta en una cepa apenas viable, que crece incluso más lentamente que la cepa *priA*. La doble mutante también adquiere rápidamente mutaciones supresoras en *dnaC*. La mutación *dnaC810* permite un rescate parcial del fenotipo. Se requiere de una segunda mutación en *dnaC* para permitir supresión de las múltiples deficiencias de la doble mutante $\Delta priB \Delta priC$. La triple mutante *dnaC810,820* $\Delta priB \Delta priC$ presenta un fenotipo prácticamente salvaje.

Existe otra helicasa con polaridad 3'→5', denominada Rep. Esta helicasa es esencial para la replicación del fago $\Phi X174$ en *Escherichia coli*. Por otro lado, se ha reportado que en las mutantes *rep* las horquillas de replicación avanzan a la mitad de la velocidad que en una cepa salvaje. La introducción de la mutación *priA* en un contexto deficiente en Rep es

letal. Esto ha sido interpretado por S. Sandler y colaboradores como evidencia de que Rep participa en una vía alternativa para ensamblar un primosoma de reparación, que en un contexto *priA* se torna esencial.

La combinación de mutaciones en *priA* y *priC* también es letal, mientras que la cepa *priA priB* y la cepa *priC rep* son viables. Tomadas en conjunto, las evidencias genéticas y bioquímicas sugieren la existencia de múltiples vías alternativas para ensamblar el primosoma de reparación. La vía principal dependería de PriA y PriB o PriC para iniciar ensamblaje del primosoma de reparación. La existencia de una tercer vía dependiente de PriC y Rep, permitiría explicar la viabilidad de las cepas deficientes en PriA y la inviabilidad de las cepas *priA rep* y *priA priC*. En la Figura 21 se han delineado las distintas vías alternativas para iniciar el ensamblaje del primosoma de reparación en un contexto salvaje. Se han esquematizado también las vías supresoras (Sandler S.J. et al., 1999; Sandler S.J., 2000).

4.4. Inducibilidad de los sistemas de reparación: la respuesta SOS.

En función de la viabilidad marginal que presenta una mutante *priA*, se dedujo que en condiciones normales de crecimiento aeróbico la frecuencia de bloqueo y/o colapso de una horquilla de replicación es lo suficientemente alta como para generar la necesidad de contar con las maquinarias de recombinación y reinicio de la replicación para completar la replicación del genoma y dotar con un cromosoma intacto a cada célula hija al momento de la división celular. Lo que resultó en realidad sorpresivo, fue descubrir que es indispensable contar con este mecanismo de reparación, aún en condiciones en las que las células no están expuestas a un agente exógeno que dañe el ADN. Es decir, que toda la maquinaria de reparación de horquillas de replicación es una función de mantenimiento celular ('house-keeping'function) (Cox

M.M. et al. 2000).

Hace más de tres décadas que se sabe que cuando se somete a *Escherichia coli* a un tratamiento que dañe masivamente su material genético, dispara una serie de respuestas tendientes a tolerar el daño y continuar con la replicación de su genoma mientras intenta reparar las lesiones. Los genes que codifican las funciones necesarias para llevar adelante este mecanismo adaptativo, están dispersos en el genoma de la bacteria y conforman el regulón SOS, que está sujeto a control transcripcional por el represor LexA.

Cuando la exposición a un agente que daña el ADN genera un daño masivo al material genético, dado que en bacterias no existe un sistema de 'checkpoints' (puntos de control) que bloquee inmediatamente la replicación y el progreso del ciclo celular, las horquillas de replicación intentan continuar avanzando y se topan una y otra vez con lesiones en las cadenas molde, bloqueándose y/o generando múltiples regiones de ADNsc que se recubren de RecA. El filamento núcleo-proteico RecA/ADNsc constituye la señal que dispara la respuesta SOS. También actúa como transductor de esta señal, ya que facilita el autoclivaje de LexA, que resulta en la inactivación de este represor. Al disminuir la cantidad de LexA capaz de actuar como represor, se activa la transcripción de genes pertenecientes al regulón SOS, dotando a la célula de funciones que le permiten aumentar su capacidad de reparar lesiones al ADN y continuar replicando su genoma a pesar de las lesiones [Figura 22] (Stortz. G. & Hengge-Aronis R., 2000; Volkert M.R. & Landini P., 2001).

En condiciones normales de crecimiento, el represor LexA reprime la transcripción del regulón SOS. LexA se une como dímero a una secuencia palindrómica, denominada 'caja SOS' presente en las regiones promotoras de los genes que regula, reprimiendo su transcripción. Las 'cajas SOS' contienen una secuencia invertida consenso, dentro de la cual

ciertas posiciones están muy conservadas. Los niveles basales de expresión de algunos de los genes pertenecientes al regulón SOS se deben a 'cajas SOS' imperfectas (cuyas secuencias se alejan del consenso) y/o a la existencia de promotores alternativos insensibles al control por LexA. Por otro lado, la represión total de otros de estos genes se asegura mediante la presencia de una segunda 'caja SOS' en el promotor. Sólo las moléculas de LexA que se encuentran en solución pueden ser inactivadas por el autoclivaje de la misma favorecido por RecA/ADNsc. Por lo tanto, aquellos genes que poseen una 'caja SOS' con una alta afinidad por LexA tardan más en desreprimirse; es decir, comienzan a expresarse cuando está más avanzada la respuesta SOS (Kuzminov A., 1999)

Los genes pertenecientes al regulón SOS pueden subdividirse en cuatro grupos en función del grado de similitud que posea la 'caja SOS' presente en la región promotora con la secuencia consenso y a la menor o mayor afinidad de LexA por dicha secuencia. Esto a su vez determina en qué estadio de la respuesta SOS comenzarán a expresarse. Existe otro nivel de control temporal, regido por modificaciones post-traduccionales. Tal es el caso de UmuD, que debe sufrir un autoclivaje, favorecido también por RecA/ADNsc, para poder adoptar la conformación activa que le permite formar parte del complejo UmuD₂UmuC, que posee actividad polimerasa [PolV]. En otras palabras, la aparición de la actividad PolV se da tardíamente durante la respuesta SOS, por un lado porque los genes *umuD* y *umuC* tienen alta afinidad por LexA y por ende se des-reprimen tardíamente, pero además porque UmuD debe ser procesado post-traduccionamente para convertirse en UmuD' y conformar el complejo UmuD₂UmuC que posee actividad polimerasa, capaz de catalizar la síntesis de ADN a través de lesiones (TLS: Trans Lesion Synthesis) (Kuzminov A., 1999; Stortz. G. & Hengge-

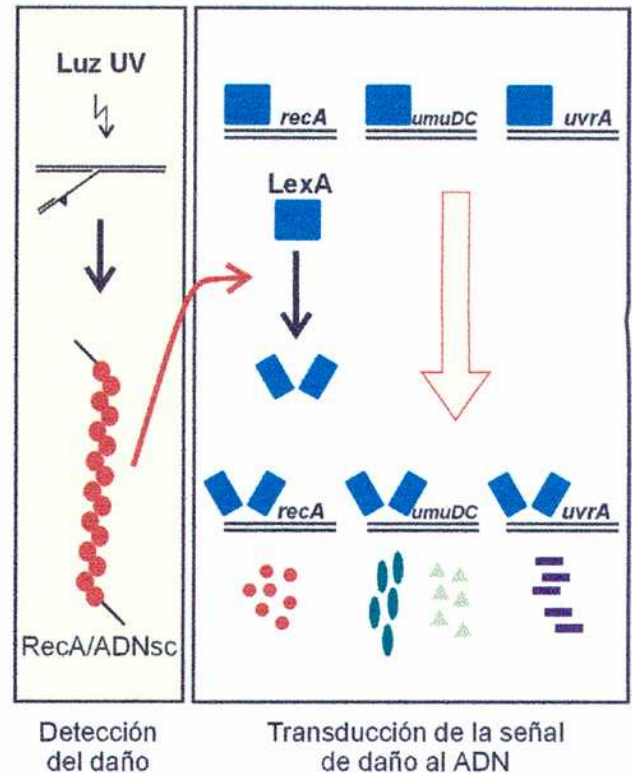


Figura 22 Regulón SOS: detección del daño y transducción de la señal mediada por RecA/ADNsc.

RecA se une al ADNsc generado como consecuencia de intentos fallidos de replicar el ADN dañado. Los filamentos nucleoproteicos RecA/ADNsc formados, facilitan la subsiguiente autodigestión del represor LexA. La autodigestión de LexA lo inactiva como represor transcripcional, resultando en la derepresión de distintos loci del regulón SOS, entre los que se encuentran *recA*, *uvrA* y *umuDC*. Figura adaptada a partir de Stortz G. & Henge-Aronis R. 2000.

Aronis R., 2000; Sutton N.D. et al., 2000).

La inducción de estos grupos de genes obedece a un programa que asegura que se pongan en marcha, de una manera ordenada y secuencial, distintas estrategias que permiten hacer frente al daño masivo en el ADN. La primera estrategia consiste en aumentar la capacidad celular de reparar lesiones, mediante la inducción de proteínas que participan de la reparación por escisión de nucleótidos; e incrementar la eficiencia de replicación del ADN dañado sin aumentar la frecuencia de generación de mutaciones, mediante la inducción de la expresión de Pol II.

Recientemente, se ha demostrado que PriA también participa en esta primera fase de la respuesta SOS. Aparentemente, las horquillas bloqueadas debido a la presencia de lesiones en el ADN molde,

1º grupo de genes en expresarse	
<i>lexA</i>	LexA: represor SOS
<i>uvrA</i>	reparación por escisión de nucleótidos [NER]
<i>uvrB</i>	reparación por escisión de nucleótidos
<i>uvrD</i>	reparación por escisión de nucleótidos
<i>polB</i>	Pol II, síntesis sobre la pata de gallo, que permite superar la lesión al revertir la regresión.
<i>ruvA</i>	subunidad de la helicasa RuvAB, recombinación
<i>ruvB</i>	subunidad de la helicasa RuvAB, recombinación
<i>dinI</i>	inhibición del procesamiento de UmuD
2º grupo de genes en expresarse	
<i>recA</i>	RecA, co-proteasa, sinaptasa, sensor/transductor de la señal de daño al ADN, reparación por recombinación
<i>recN</i>	RecN, recombinación. Función ?
3º grupo de genes en expresarse	
<i>sfiA</i>	SulA, inhibidor de la división celular
<i>umuD</i>	UmuD → UmuD' TLS
<i>umuC</i>	UmuC: actividad polimerasa en el complejo UmuD'₂-UmuC [Pol V]
Si el bloqueo persiste se induce la lisis celular	
<i>cea</i>	Colisin E1, lisis celular
<i>caa</i>	Colisin A, lisis celular

Tabla 2 : Funciones celulares que se inducen durante la respuesta SOS. Se ha hecho una clasificación en cuatro grupos, en función de la afinidad de LexA por la 'caja LexA' que poseen estos genes en su región operadora y datos presentes en la bibliografía referentes al nivel basal e inducido de estas proteínas en *E.coli*. Tabla adaptada a partir de Kuzminov A. 1999.

podrían ser procesadas por RecA para inducir la regresión de la horquilla, conduciendo a la formación de estructuras del tipo 'pata de gallo'. Pol II podría utilizar la cadena retrasada recién sintetizada, como molde para sintetizar la región correspondiente de la cadena líder [ver Sección 4.1 Introducción, figura 19, iia]. La reversión de la regresión por acción de RecG, permitiría restaurar la horquilla de replicación río abajo de la lesión y PriA sería responsable de reconocer la horquilla restablecida y ensamblar el primosoma de reparación para que Pol III pueda re-iniciar la replicación. Esta operatoria permitiría replicar el ADN con alta fidelidad a pesar del daño generalizado, dejando la lesión en un dúplex para que los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos la reparen utilizando la información de la cadena complementaria (Rangarajan S. et al., 2002).

Si el daño/bloqueo persiste, la respuesta SOS progresa y comienzan a expresarse genes más tardíos,

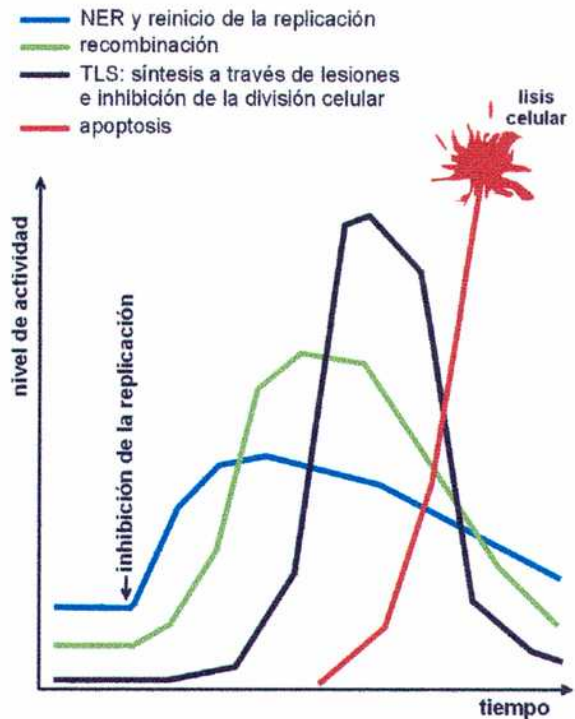


Figura 23: Cinética de inducción de los cuatro grupos de genes controlados por LexA. Se presenta una cinética idealizada de los cuatro grupos de genes controlados por LexA. El gráfico intenta ilustrar la inducción secuencial y coordinada de las distintas respuestas tendientes a reparar y tolerar el daño masivo al ADN y/o el bloqueo recurrente de la replicación. Los dos ejes están representados en unidades arbitrarias, sin embargo se ha intentado mostrar que el primer grupo de genes tendría un nivel basal más alto y el grado de inducción alcanzado sería menor (x2-x5) que el del segundo (x10-x50) y el tercero (x20-x100) que parten de un nivel basal menor y alcanzan un alto grado de amplificación al progresar la respuesta SOS. Figura adaptada a partir de Kuzminov A. 1999.

entre los que se encuentran UmuD, UmuC y SulA. UmuD sufre autodigestión catalizada por RecA/ADNsc y permite que se ensamble el complejo UmuD'₂UmuC, que posee actividad de polimerasa [Pol V] (Goddman M.F. & Tiffin B., 2000). Este complejo es capaz de catalizar la síntesis de ADN sobre un molde dañado, pero posee baja fidelidad e introduce mutaciones con una alta frecuencia. Se trata de una Polimerasa distributiva, que sintetiza el ADN a través de la lesión y luego le cede el lugar a Pol III para que prosiga con la replicación. Este proceso se conoce como 'síntesis a través de lesiones' [TLS: Trans Lesion Synthesis] o 'síntesis tendiente a introducir errores' [Error Prone Synthesis].

Si a pesar de todo, el daño persiste, se dispara la lisis celular por inducción de colicinas y/o la activación de profagos crípticos, mediante la inactivación de sus represores favorecida por RecA/ADNsc.

Volviendo al gráfico con la cinética de inducción de los distintos grupos de genes controlados por LexA, se puede ver claramente la lógica de la des-represión escalonada [Figura 23]. En un primer momento se intenta aumentar la capacidad de reparación y continuar replicando el ADN a pesar del daño, por un mecanismo que asegura la fidelidad del proceso [inducción de la expresión de proteínas involucradas en NER y Pol II]. Si esto resulta insuficiente, se inhibe

la división celular y se procura replicar el genoma por la acción conjunta de Pol V y Pol III [inducción de la expresión de SulA y UmuD/UmuC]. Esta segunda estrategia tiene el 'inconveniente' del incremento en la tasa de mutación. Finalmente, si todos los sistemas de reparación resultan insuficientes, se induce la lisis celular, presumiblemente para evitar desperdiciar recursos en una célula que ya está destinada a morir en función del daño acumulado. Se ha propuesto que esta especie de 'apoptosis' bacteriana permitiría incrementar el número de viables en un cultivo (Kuzminov A., 1999).

5 Problemas que surgen al replicar y reparar por recombinación un genoma circular

5.1 Resolución de 'catenanes' y dímeros cromosómicos: Topo IV y el sistema Xer.

La replicación de un cromosoma circular trae aparejado dos problemas. El primero de ellos, está asociado a la estructura de doble hélice del ADN. Al completarse la replicación del genoma circular, los dos cromosomas hijos están entrelazados entre sí o encaadenados. La estructura generada se denomina 'catenane' (concatenado: dos círculos enlazados entre sí)

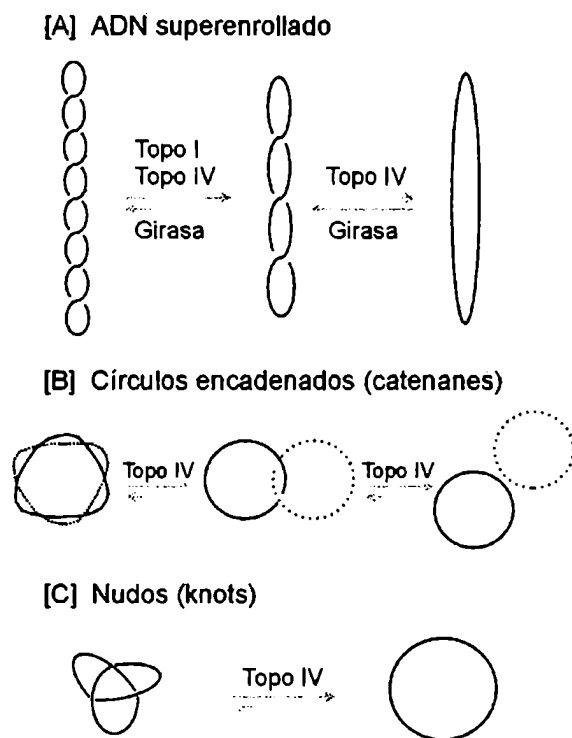


Figura 24 Formas topológicas y rol de las topoisomerasas celulares.

[A] Superenrollamiento: en *E. coli* la Girasa (*gyrA gyrB*) introduce superenrollamiento negativo en el ADN, mientras que la Topoisomerasa I (Topo I, *topA*) y la Topoisomerasa IV (Topo IV, *parC parE*) son capaces de relajar los supercoils negativos.

[B] Catenanes: compuestos por dos círculos encadenados entre sí, por uno o múltiples enlaces. Pueden generarse durante la replicación (el superenrollamiento positivo que se acumula hacia delante de la horquilla de replicación se equilibra con concatenación de los cromosomas hijos por detrás de la misma) o como resultado de un evento de recombinación específico-de-sitio (ej: la resolución de un dímero). Esta forma topológica es resuelta por acción de Topo IV.

[C] Nudos: resultan de enredar o anudar internamente un círculo. Se ha demostrado que en un intermediario de replicación, los cromosomas hijos a medida que son sintetizados pueden sufrir este tipo de enredo. Topo IV es responsable de resolver esta forma topológica *in vivo*.

y debe ser resuelta por la Topoisomerasa IV, una topoisomerasa de tipo II, compuesta por dos subunidades (ParC y ParE), cuyas principales funciones celulares son las de desenlazar catenanes y desanudar nudos [ver Figuras 24 y 27] (Adams D.E. et al., 1992; Deibler R.W. et al., 2001).

El segundo problema que surge de la replicación de un genoma circular es el siguiente: si durante el transcurso de un ciclo de replicación, la reparación por recombinación introduce un número impar de cross-overs, se produce un intercambio de cromátides hermanas; por lo tanto, al completarse la replicación, los cromosomas hijos se encuentran unidos formando un dímero. Se estima que en *E. coli* se forman dímeros cromosómicos una vez cada 7 generaciones. *E. coli* y la mayoría de las bacterias con genomas circulares, poseen un sistema de recombinación específico-de-sitio que asegura que los dímeros cromosómicos sean resueltos en monómeros. Este sistema está compuesto por las recombinasas XerC y XerD, que actúan sobre un sitio específico denominado *dif*, localizado en la región del terminus cromosómico. El sistema Xer realiza un nuevo intercambio de cromátides hermanas en los sitios *dif* del dímero, resolviéndolo en dos monómeros (Sherratt D.J. et al., 2001).

XerC y XerD pertenecen a la familia de las Integrasas, compuesta por tirosin-recombinasas que catalizan el intercambio de cadenas por un mecanismo que utiliza una estructura de Holliday como intermediario [ver Figura 25 A] (Grindley N:D:F., 1997; Hallet B. & Sherratt D.J., 1997).

En el caso específico del sistema Xer, el primer intercambio de cadenas es catalizado por XerC. Esta reacción es reversible; genera una estructura de Holliday [EH] que puede ser resuelta en los sustratos originales por acción de la misma proteína. Se requie-

[A] Integreras: XerC, XerD, λ Int, P1 Cre y FLP.**[B] Resolvasas: TnpR de los transposones Tn3 y $\gamma\delta$ y las invertasas Hin y Gin.****Figura 25 Recombinación específica de sitio catalizada por Integreras y Resolvasas.**

La recombinação específica-de-sitio es un proceso totalmente conservativo mediante el cual las dos cadenas a recombinar son clivadas, intercambiadas y religadas en un proceso que no requiere hidrólisis de ATP ni síntesis de ADN. El clivaje de las cadenas no se realiza por un proceso endonucleolítico sino que se transfiere el fosforilo del ADN a una cadena lateral de la recombinasa, generando un intermediario en el cual a un lado del corte se genera una unión covalente entre el ADN y la proteína y al otro lado queda el grupo hidroxilo libre; un mecanismo equivalente al que utilizan las topoisomerasas. El procesamiento de este intermediario libera a la recombinasa y genera los productos de recombinação. Las recombinasas se clasifican en dos grandes familias: las integreras y las resolvasas. Estas dos familias no presentan homología de secuencia ni están relacionadas estructuralmente y emplean mecanismos de recombinação muy diferentes.

[A] Familia de las Integreras: Integrasa del fago λ , la proteína Cre del fago P1, las recombinasas XerC y XerD de *E. coli* y la proteína FLP de levaduras. Estas tirosin-recombinasas realizan un primer intercambio de cadenas que genera una estructura de Holliday (EH) como intermediario. El nucleófilo utilizado para el clivaje y la generación del intermediario ADN-recombinasa es una tirosina (Y-OH). Los sitios de corte en cada dúplex están separados por 6-8 pares de bases y la tirosina se une covalentemente al fosfato 3' del ADN en el sitio de corte.

[B] Familia de las resolvasas: incluye la mayoría de las resolvasas codificadas por transposones (por ejemplo TnpR de $\gamma\delta$ y Tn3) y las invertasas (Hin y Gin). Son serin-recombinasas que realizan cortes doble-cadena en los dos dúplex a recombinar simultáneamente, intercambian los extremos y los religan. El nucleófilo en este caso es una serina (S-OH) que cliva el ADN en sitios que están separados por 2 pares de bases y se une al fosfato 5' del ADN en el sitio de corte.

Figura adaptada a partir de Grindley N.D.F., 1997.

re de una proteína accesoria que modifique la conformación de la EH generada por acción de XerC, para que este intermediario pueda ser resuelto por XerD mediante un segundo intercambio de cadenas. Esta proteína accesoria es FtsK, una proteína anclada al septo, que está involucrada en el proceso de división celular [Figura 26] (Barre F.X. et al., 2000).

La resolución tiene lugar durante la septación y está regulada espacialmente. La proteína de membrana FtsK cumple un rol fundamental en esta regulación. Su extremo N_t determina su anclaje en el septo y la

interacción de su extremo C_t con XerD es esencial en el control espacial y temporal de la resolución en *dif*. La región del *terminus* permanece localizada en el centro de la célula, por lo tanto los sitios *dif* de los dos cromosomas hijos pueden formar un complejo sináptico con XerC, independientemente de que estén formando un dímero o no. En función de la reversibilidad de la reacción catalizada por XerC, una vez completado el ciclo de replicación pueden darse varios ciclos de formación y resolución de la EH por acción de XerC. Si los cromosomas son monómeros, eventual-

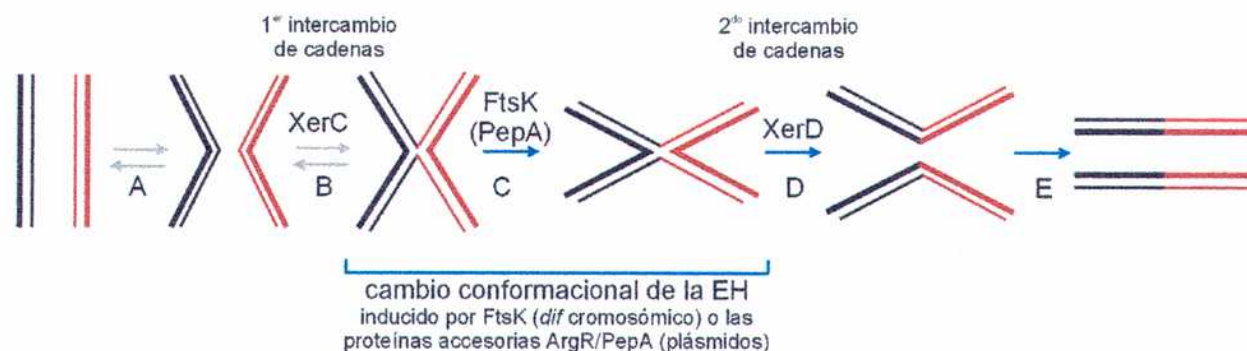


Figura 26 Resolución de dímeros cromosómicos por el sistema XerCD-FtsK

Se ha esquematizado la reacción catalizada por el sistema Xer. [A] XerCD se unen en forma cooperativa a los dos sitios *dif* del dímero cromosómico (o los sitios *cer* o *psi* plasmídicos), asegurando la formación del complejo sináptico (en el caso de los plásmidos se requiere de las proteínas accesorias ArgR y PepA). [B] XerC inicia el proceso realizando el primer intercambio de cadenas que genera la estructura de Holliday (EH). [C] Este intermediario debe experimentar un cambio conformacional para convertirse en un sustrato procesable por XerD para completar la reacción de recombinación. Durante la recombinación en *dif*, el extremo C₁ de FtsK facilita este cambio conformacional. En el caso de los sitios plasmídicos *psi* y *cer*, son las proteínas accesorias las que facilitan el cambio conformacional de la EH. [D] Finalmente XerD cataliza el segundo intercambio de cadenas, generando el producto recombinante (dos monómeros).

mente la segregación de los cromosomas hijos romperá el complejo sináptico, resultando en la separación definitiva de los sitios *dif* que se alejaran del centro de la célula antes de que se cierre el septo. Por el contrario, si los cromosomas están formando un dímero, el complejo sináptico no podrá alejarse del centro de la célula y tendrá acceso a interacciones con FtsK que se encuentra anclada en el septo. FtsK facilita el cambio conformacional de la EH necesario para activar la catálisis mediada por XerD y de esta manera coordina la resolución de dímeros cromosómicos con la división celular (Barre F.X. et al., 2001).

FtsK es un activador de la recombinación mediada por XerCD y su distribución restringida temporal y espacialmente al septo, en el momento de la división celular, asegura que solo progresen aquellos cross-over catalizados por XerCD sobre un par de sitios *dif* que estén formando parte de un dímero cromosómico.

El producto de la resolución específica-de-sitio catalizada por XerCD-FtsK es un par de círculos entrelazados entre sí, por lo tanto se requiere de Topo IV para completar la separación de los dos cromosomas hijos una vez que han sido resueltos. El sitio *dif* es un sitio preferencial (hot-spot) para el clivaje por

Topo IV *in vivo* (Hojgaard A. et al., 1999). La reciente demostración de que en *E. coli* la subunidad ParC de Topo IV está asociada a la maquinaria replicativa, mientras que la otra subunidad, ParE, se localiza en el septo por un mecanismo dependiente de FtsK, constituye otro indicio de la posible relación entre la decatenación y la resolución de dímeros cromosómicos. De manera que la resolución de dímeros y la decatenación estarían restringidas temporal y espacialmente al momento y lugar en el que ocurren la terminación de la replicación y la formación del septo (Sherratt D.J., 2001).

Tanto la resolución de dímeros que pueden haberse generarse durante el ciclo de replicación como consecuencia de la reparación de horquillas de replicación por recombinación, como la decatenación de los cromosomas hijos por acción de Topo IV, contribuyen a completar la separación de los cromosomas hijos, permitiendo la segregación adecuada de cada cromosoma hacia una de las células hijas antes de que se complete la formación del septo. En la Figura 27 se ha resumido la contribución de Topo IV y el sistema Xer al proceso de segregación de los cromosomas hijos, antes de que se complete la división celular.

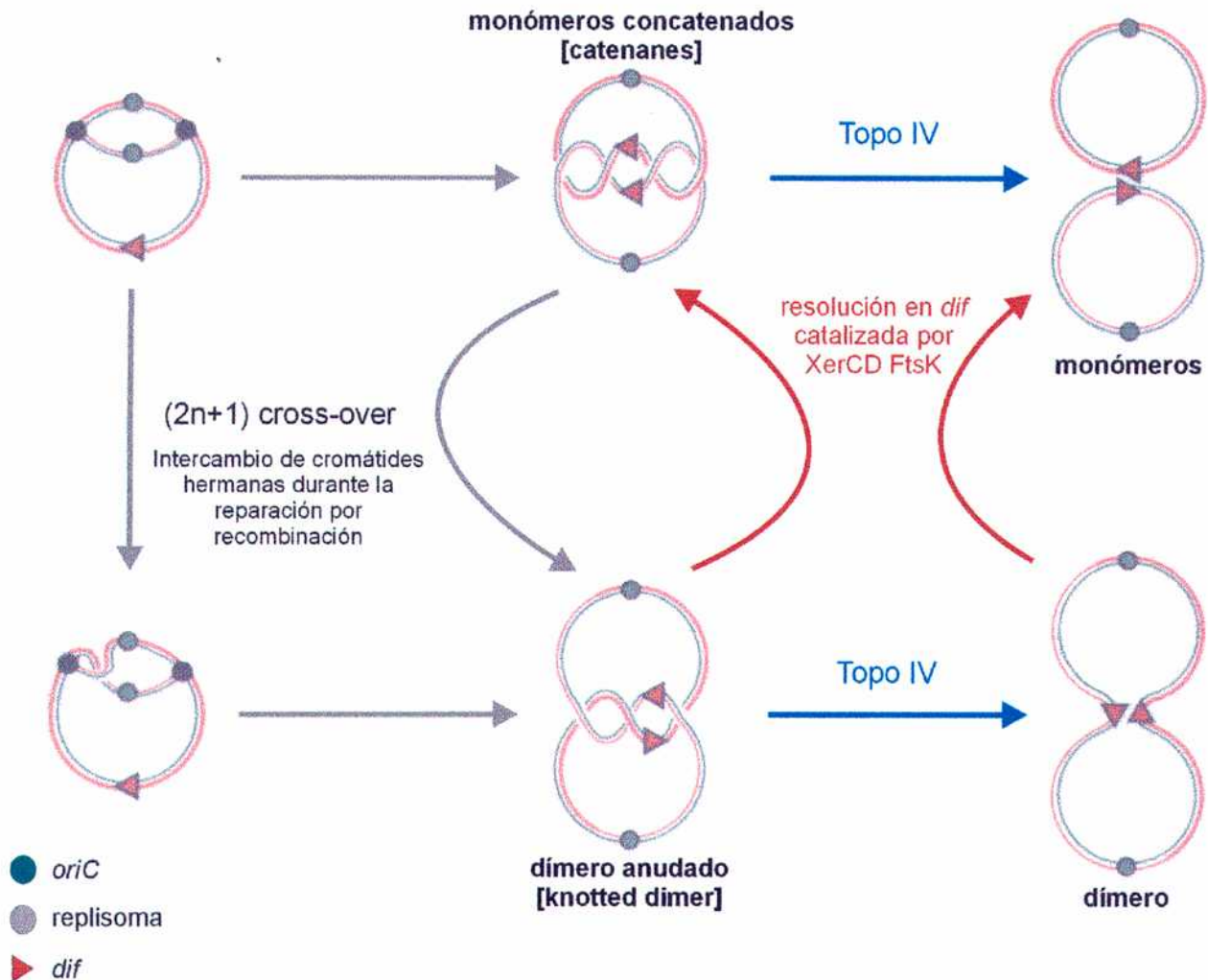


Figura 27 Interrelación existente entre la replicación, la recombinación y la segregación cromosómica.

Se presenta la resolución de 'catenanes' y nudos cromosómicos, catalizada por Topo IV y la resolución de dímeros por acción del sistema XerCD-FtsK sobre los sitios *dif*. Una de las cadenas parentales rojas se ha representado con una línea de mayor grosor para facilitar la visualización del intercambio de cadenas (el intercambio de cromátides hermanas que resulta en la formación de un dímero cromosómico).

En la parte superior de la figura se muestra la concatenación de los cromosomas hijos, que debe ser resuelta por acción de Topo IV para que éstos se separen y la región terminal de los cromosomas pueda migrar hacia los polos opuestos, completando la segregación antes de que se cierre el septo.

Si durante el ciclo de replicación, el proceso de reparación por recombinación introduce un número impar de cross-overs ($2n+1$) habrá intercambio de cromátides hermanas y se generará un dímero cromosómico. En ese caso, se requiere de XerCD-FtsK y los sitios *dif*, para resolver el dímero y de Topo IV para resolver los enlaces entre los monómeros. Figura adaptada a partir de Sherratt D.J., 2001.

5.2 Resolución de dímeros plasmídicos.

El proceso de reparación por recombinación también puede generar dímeros plasmídicos. El plásmido ColE1 posee un sitio denominado *cer*, que le permite aprovechar el sistema de resolución Xer bacteriano para asegurar la resolución de sus dímeros. En este caso, FtsK no participa del proceso de resolución. El plásmido utiliza otras dos proteínas bacterianas que aseguran que la recombinación catalizada por XerCD sólo pueda progresar en la dirección dímeros→monómeros. En otras palabras, las proteínas accesorias

ArgR y PepA aseguran la direccionalidad de la reacción hacia la resolución de dímeros plasmídicos (Blakely G. et al., 1993; Blakely G. & Sherratt D.J., 1996).

La generación de dímeros reduce la cantidad de copias del plásmido disponibles para repartir entre las células hijas y por ende disminuye la estabilidad del plásmido. Por lo tanto, la resolución de dímeros catalizada por XerCD-ArgR-PepA sobre los sitios *cer* de ColE1, aumenta la estabilidad segregacional del plásmido al asegurar que éste se mantenga como monó-

mero.

Se ha descrito la participación de otros sistemas de recombinación específicos-de-sitio en la estabilización de plásmidos. Tal es el caso de los sistemas *loxP*-Cre del fago P1, *mrs*-ParA del plásmido RP4, *per*-Per del plásmido R46, *psi*-XerCD del plásmido pSC101 (Austin S. et al., 1981; Eberl L. et al., 1994; Dodd H.M. & Bennett P., 1987, 1986; Cornet F. et al., 1994).

En nuestro laboratorio se demostró que el sistema de resolución *res*-TnpR del transposon $\gamma\delta$ es capaz de resolver dímeros de un plásmido, contribuyendo a la estabilidad segregacional del mismo durante subcultivos sucesivos en ausencia de presión de selección (Bellani M. et al., 1997). Dado que este sistema de resolución se utiliza en una de las secciones de la Tesis, a continuación se provee información acerca de las características de este sistema de recombinación específico-de-sitio, así como del transposón del cual deriva.

5.3 Transposón $\gamma\delta$: sistema *res*-TnpR

$\gamma\delta$ (antes denominado Tn1000) pertenece a la familia del transposón Tn3. Codifica por una transposasa denominada TnpA y un sistema de resolución específico-de-sitio compuesto por la resolvasa TnpR y el sitio *res* [Figura 28].

Transpone por un mecanismo replicativo que puede dividirse en dos etapas [Figura 29]. En una primera etapa la transposasa forma un cointegrado entre la molécula de ADN donante y el ADN blanco, conteniendo una copia del transposón en cada unión [A]. La segunda etapa es catalizada por el sistema de recombinación específico-de-sitio. La resolvasa TnpR realiza el intercambio de cadenas entre los sitios *res* de cada copia del transposón, resolviendo el cointegrado en una molécula de ADN donante intacta y una molécula de ADN blanco conteniendo la copia del transposón [B] (Sherratt D.J., 1989).

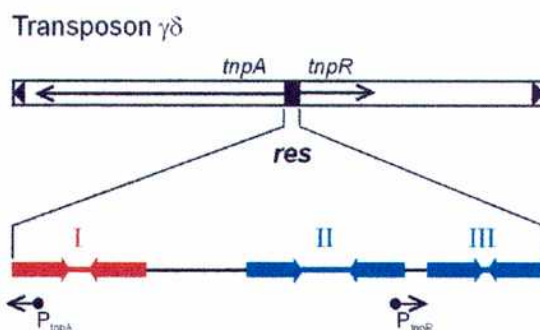


Figura 28 Transposón $\gamma\delta$.

Los genes *tnpA* y *tnpR* que codifican para la transposasa y la resolvasa respectivamente, se transcriben en direcciones opuestas a partir de promotores que se encuentran dentro del sitio *res*. El sitio *res* contiene tres sitios con repeticiones invertidas de 12 pb, que constituyen sitios de unión a dímeros de TnpR. La recombinación ocurre en el sitio I.

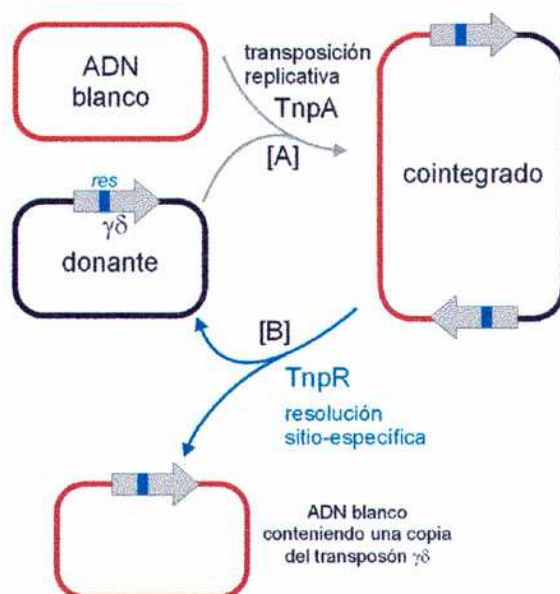


Figura 29 Transposición replicativa del transposón $\gamma\delta$

$\gamma\delta$ transpone en dos etapas. [A] La primera etapa la cataliza la resolvasa TnpA y resulta en la fusión del ADN donante y el blanco para formar un cointegrado, que contiene una copia del transposón en cada unión (proceso similar a la transposición replicativa del fago Mu). [B] La segunda etapa es un evento de recombinación catalizado por la resolvasa TnpR sobre los sitios *res* de las dos copias del transposón y resulta en la resolución del cointegrado en una molécula de ADN donante intacta y una molécula del ADN blanco conteniendo una copia del transposón.

La resolvasa es el prototipo de la otra familia de recombinasas específicas-de-sitio, las serin-recombinasas. A diferencia de XerCD que realizan dos pares de cortes simple cadena, pasando por una EH como intermediario, TnpR realiza dos cortes doble cadena concertadamente (uno en cada molécula de ADN a recombinar) intercambia las cadenas y las religa [Figura 25 B] (Grindley N.D.F., 1997).

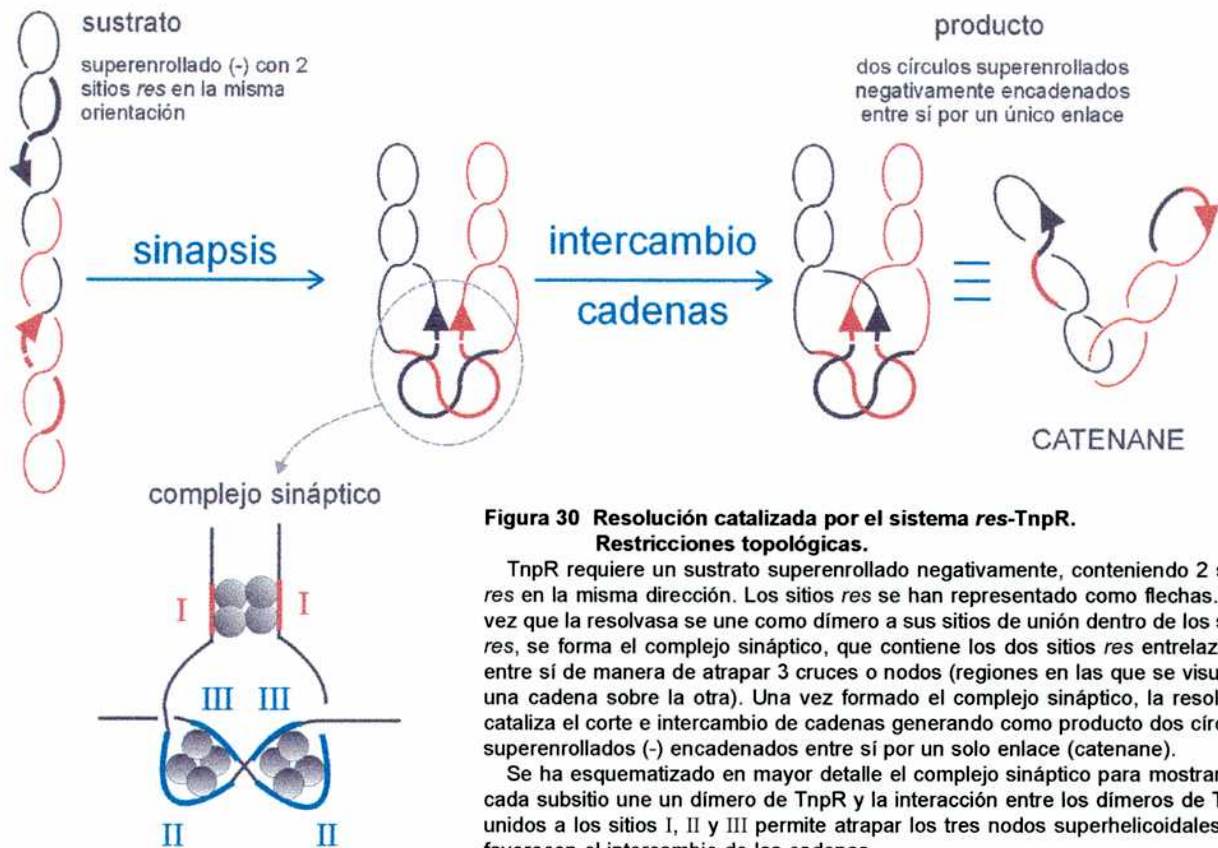


Figura 30 Resolución catalizada por el sistema *res*-TnpR. Restricciones topológicas.

TnpR requiere un sustrato superenrollado negativamente, conteniendo 2 sitios *res* en la misma dirección. Los sitios *res* se han representado como flechas. Una vez que la resolvasa se une como dímero a sus sitios de unión dentro de los sitios *res*, se forma el complejo sináptico, que contiene los dos sitios *res* entrelazados entre sí de manera de atrapar 3 cruces o nodos (regiones en las que se visualiza una cadena sobre la otra). Una vez formado el complejo sináptico, la resolvasa cataliza el corte e intercambio de cadenas generando como producto dos círculos superenrollados (-) encadenados entre sí por un solo enlace (catenane).

Se ha esquematizado en mayor detalle el complejo sináptico para mostrar que cada subsitio une un dímero de TnpR y la interacción entre los dímeros de TnpR unidos a los sitios I, II y III permite atrapar los tres nodos superhelicoidales que favorecen el intercambio de las cadenas.

El sitio *res* contiene tres secuencias repetidas invertidas que constituyen sitios de unión a dímeros de TnpR [Figura 28]. El sitio I es el sitio de recombinación, en el que se realiza el corte e intercambio de cadenas y los sitios accesorios II y III aparentemente son necesarios para formar el complejo sináptico y contribuyen a direccionar la reacción hacia la resolución.

La reacción de resolución [esquematizada en la Figura 30] puede dividirse en dos etapas: la sinapsis y el intercambio de cadenas. Durante la sinapsis se yuxtaponen los sitios de resolución en un complejo sináptico compuesto por las regiones que contienen los sitios *res* y seis dímeros de TnpR. Durante el intercambio de cadenas la resolvasa cliva las cadenas de ADN en el centro del subsitio I de cada sitio *res*, reacomoda las cadenas por medio de una rotación de 180° y las religa en la configuración recombinante.

El sistema *res*-TnpR tiene selectividad topológica.

La resolvasa TnpR requiere un sustrato superenrollado negativamente, que contenga dos sitios *res* ubicados en la misma dirección. El superenrollamiento (-) asegura que se forme un complejo sináptico con la arquitectura correcta, dos sitios *res* entrelazados entre sí de manera de atrapar tres cruces o nodos dentro del complejo sináptico. El segundo efecto del superenrollamiento negativo parece ser la generación de un cambio conformacional dentro del complejo sináptico que permite la desnaturalización del subsitio I rico en AT, en el que la resolvasa debe realizar el corte para intercambiar las cadenas (Benjamin K.R. et al., 1996).

Los productos de la reacción de resolución catalizada por *res*-TnpR son dos círculos superenrollados negativamente, encadenados entre sí por un solo enlace. *In vivo*, Topo IV es la topoisomerasa encargada de desenlazar los productos de resolución (Zechiedrich E.L. et al., 1997).

El requerimiento de superenrollamiento negativo y

dos sitios *res* en la misma dirección, constituye una señal regulatoria que le otorga selectividad a la reacción. El sistema de control topológico de la reacción de resolución, probablemente evolucionó para asegurar la resolución de un cointegrado (que es un círculo superenrollado (-) conteniendo dos sitios *res* en la misma dirección), permitiendo que se complete el evento de transposición replicativa.

El requerimiento de superenrollamiento negativo solo puede ser reemplazado por el 'anudado' o concatenación de los sustratos ('knotting' o 'catenation'). En otras palabras, TnpR también es capaz de actuar sobre una molécula circular relajada que contenga nudos o sobre dos moléculas circulares relajadas que

estén encadenadas entre sí por más de un enlace (multiply-linked catenanes), siempre y cuando estas dos moléculas contengan el sitio *res* en direcciones opuestas. Esto no se verifica en el caso de la concatenación que experimentan los dos cromosomas hijos en un intermediario de replicación. En ese caso, los dos sitios *res* se encuentran en la misma dirección, por lo tanto estos intermediarios de replicación no son un sustrato adecuado para *res*-TnpR. Aún suponiendo que *res*-TnpR pudiera catalizar el desanudado entre dos cromátides hermanas en un intermediario de recombinación, generaría un 'catenane' que no podría seguir procesando (Zechiedrich E.L. & Cozzarelli N.R., 1992).

6 El contexto *recBC sbcBC*

En *Escherichia coli*, las funciones de recombinación han sido clasificadas en dos sistemas: las vías RecB y RecF de recombinación, cada una de las cuales involucra un conjunto diferente de proteínas pre-sinápticas.

La vía RecB es utilizada principalmente cuando uno de los sustratos es una molécula de ADN conteniendo un extremo doble cadena. Tal es el caso de horquillas de replicación que colapsan al encontrarse con una discontinuidad en una de las cadenas molde. En estas circunstancias, uno de los brazos de la horquilla se desprende como un extremo doble cadena. La proteína RecBCD modulada por los sitios χ (sobre-representados con una polaridad definida a lo largo del genoma bacteriano), puede procesar ese extremo de ADN_{dc} y facilitar el cargado de RecA sobre el ADN_{sc} que va generando, permitiendo la reparación por recombinación de la horquilla colapsada (Kowalczykowski S.C., 2001; Michel B., 2001).

La vía RecF revierte mayor importancia en la reparación de brechas simple cadena [SSG], que se generan durante la replicación cuando la horquilla encuentra una lesión en una de las cadenas molde. RecF (con la ayuda de recR y RecO) es capaz de reconocer estos SSGaps y facilitar el ensamblaje del nucleofilamento de RecA sobre el SSG para que pueda iniciarse el proceso de reparación por regresión de la horquilla bloqueada.

Cada vía sería responsable de reconocer y procesar distintos sustratos que se generan como resultado del bloqueo o colapso de una horquilla de replicación, en función de las propiedades de las proteínas pre-sinápticas involucradas en cada una de ellas. Sin embargo, las dos vías convergen en la vía única de intercambio de cadenas que depende de RecA y también comparten las proteínas responsables de la

migración y resolución de estructuras de Holliday, así como aquellas involucradas en el ensamblaje del primosoma de reparación que permitirá finalmente el reinicio de la replicación en el lugar en el que la horquilla se había atascado.

Cabe destacar, que esta clasificación representa una sobresimplificación del tema, ya que actualmente se sabe que varias de las proteínas presinápticas pueden participar de las dos vías. En una cepa salvaje, las dos vías funcionan en paralelo, solapándose parcialmente y le ofrecen a la célula un abanico de posibilidades para procesar una horquilla de replicación dañada (que se prevee puede adoptar múltiples estructuras en función de las características de la lesión o bloqueo que haya causado el daño de la misma).

Originalmente, la vía RecF se descubrió como una vía alternativa capaz de restaurar altos niveles de recombinación en mutantes *recB*. La inactivación de la enzima RecBCD genera células con una viabilidad muy reducida (30-50% respecto de un contexto salvaje), que presentan muy baja frecuencia de generación de recombinantes en ensayos de transducción y conjugación (baja eficiencia de recombinación). La baja viabilidad de estas mutantes se debe a su incapacidad para reparar horquillas de replicación que colapsan al encontrarse con discontinuidades en alguna de las cadenas molde.

Combinar la mutación *recB* con una mutación en el gen *lig*, que codifica una Ligasa deficiente, resulta prácticamente letal para *E. coli*. Aparentemente, las discontinuidades que se acumulan en el ADN de la doble mutante, debido a la actividad deficiente de la ligasa conduce al colapso frecuente de horquillas de replicación, y generan una dependencia de RecBC para repararlas. El hecho de que sea posible incre-

mentar varios órdenes la eficiencia de plaqueo de las mutantes *recB lig* incubando las placas en anaerobiosis, sugiere que el metabolismo aeróbico es el principal generador de lesiones en el ADN que conducen a la frecuente desintegración de horquillas de replicación y generan la necesidad de contar con la maquinaria de recombinación y reparación para completar los ciclos de replicación (Morimyo M. et al., 1982).

Las mutantes *recBC* acumulan mutaciones supresoras en los genes *sbcB* y *sbcC(D)*, que restauran la viabilidad y la capacidad recombinogénica a niveles prácticamente equivalentes a los de una cepa salvaje. La supresión es dependiente de RecQ (o UvrD/HelD), RecJ, RecF, RecO y RecR. Probablemente, la acción conjunta de la helicasa RecQ (o de UvrD/HelD) y la exonucleasa simple-cadena 5'→3' RecJ, permita la conversión de un extremo doble-cadena en un extremo simple-cadena 3'. Sin embargo RecQ es incapaz de cargar a RecA sobre el ADNsc generado. Aparentemente, RecF, RecO y RecR permitirían desplazar a SSB del ADNsc facilitando la formación del filamento de RecA necesario para iniciar el proceso de reparación.

De manera que, en ausencia de RecBCD funcional, la vía RecF puede sustituir sus funciones solo si se inactivan las nucleasas codificadas por *sbcB* y *sbcCD* (Templin A. et al., 1972; Lloyd R.G. & Buckman C., 1988; Gibson F.P. et al., 1992).

sbcB codifica la Exonucleasa I [Exo I], una exonucleasa que degrada ADNsc, con polaridad 3'→5'. En la sección [2.2.2] se ha descrito su participación en el mecanismo de reparación de 'mismatches' dirigida por el patrón de metilación (MMR). Se ha comprobado que esta proteína también posee actividad dRPasa, por lo tanto participaría de la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Templin A. et al 1972; Sandigursky M. & Franklin W.A., 1992, 1994).

Los genes *sbcC sbcD* se agrupan en un operón, y

codifican las proteínas SbcC y SbcD (Lloyd R.G. & Buckman C., 1988; Gibson F.P. et al., 1992). SbcC pertenece a la familia de proteínas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes o proteínas de mantenimiento estructural de los cromosomas). Dentro de esta familia pertenece a la subclase implicada en recombinación, que incluye a la proteína Rad50 de eucariotas, involucrada en el procesamiento de cortes doble cadena. Por su parte, SbcD presenta homología con nucleasas involucradas en recombinación, tales como las proteínas Mre11 de levaduras y humanos.

SbcC normalmente forma un complejo con SbcD, que posee actividad de exonucleasa sobre ADNdc (dependiente de ATP) y endonucleasa sobre ADNsc (independiente de ATP). Esta última actividad parece ser responsable de eliminar estructuras secundarias formadas durante la replicación de secuencias palindrómicas, mediante la generación de un corte sobre el ADNsc que adopta la estructura secundaria. La posterior reparación de los extremos doble cadena generados por acción de SbcCD sobre el palíndromo parece requerir tanto de RecBCD como de funciones de recombinación involucradas en la vía RecF. Por último, el complejo SbcCD también puede degradar la cola simple cadena de un dúplex de ADN (Connelly S.C. & Leach D.R.F., 1996; Connelly S.C. et al, 1998).

Para la actividad exonucleasa sobre ADNdc se requiere de SbcC y SbcD. Pero la proteína SbcD puede catalizar por sí sola la actividad endonucleasa sobre un ADNsc. Tanto mutaciones en *sbcC*, como en *sbcD* (o la combinación de ambas) pueden suprimir las deficiencias de una mutante *recBC*. Por lo tanto, lo que resulta indispensable para la supresión sería la inactivación de la actividad exonucleasa sobre ADNdc.

Se presume que la eliminación de estas dos nucleasas, ExoI y SbcCD, preserva de la degradación a los extremos simple-cadena 3' gener-

ados mediante el procesamiento de extremos doble cadena por acción de la exonucleasa RecJ y la helicasa RecQ (o UvrD/HelD).

En síntesis, la mutación *recBC* anula una de las vías de recombinación homóloga generando un fenotipo *Rec⁻*, caracterizado por baja eficiencia de recombinación en ensayos de transducción y conjugación, sensibilidad exacerbada al daño por UV y baja viabilidad. Las mutaciones supresoras extra-génicas *sbcB* y *sbcCD*, restauran la capacidad recombinogénica celular, presumiblemente inactivando nucleasas que pueden degradar intermediarios generados por las proteínas pre-sinápticas de la vía RecF al procesar extremos doble cadena. Es decir, habilitando a la vía RecF de recombinación para que actúe con mayor eficiencia sobre extremos doble cadena. De manera tal que las células *recBC sbcB*

sbcCD recuperan tanto la viabilidad como la capacidad de reparar daños al ADN [UV^R] y la capacidad recombinogénica características de la cepa salvaje. No obstante, exhibe un alto grado de filamentación, que indica que enfrenta problemas de segregación.

La mutación *recBC* anula la principal exonucleasa celular (a veces denominada ExoV). Por lo tanto, la cepa *recBC sbcB sbcCD* constituye un contexto genético que permite amplificar procesos de replicación dependientes de recombinación, ya que posee un fenotipo *Rec⁺* y la deficiencia en RecBCD evita que se degraden intermediarios de recombinación conteniendo extremos doble cadena. En un contexto salvaje estos intermediarios (en caso de carecer de un sitio χ situado con la polaridad adecuada respecto del sitio de entrada de RecBCD a la molécula de ADNdc) serían degradados rápidamente por RecBCD.

7 Replicación de plásmidos en el contexto *recBC sbcBC*: modelo en vigencia.

En 1986 A.J. Clark reportó que las preparaciones de ADN plasmídico de células *recBC sbcBC* contenían formas del plásmido de muy alto peso molecular. Al aislar ADN total de estas células y analizarlo por southern-blot, hibridando con una sonda específica para el plásmido, podía observar además de las formas circulares monoméricas y multiméricas esperables, formas que migraban lentamente, a nivel de los fragmentos de ADN genómico (Cohen A. & Clark A.J., 1986). En función de la lenta migración estimó que se trataba de formas de alto peso molecular y las denominó con la sigla HMW (high molecular weight plasmid forms). También detectaba otra señal inusual a la altura del origen de migración [ver Figura 32].

En un intento de caracterizar estas formas del plásmido trató las preparaciones de ADN total con una enzima de restricción para la cual existía un único sitio de corte en el plásmido y observó que todas las formas del plásmido se convertían en una única banda correspondiente a monómeros lineales y un chorreado de fragmentos de menor tamaño. El tratamiento con una exonucleasa específica para ADN con extremos doble cadena degradaba únicamente la forma HMW. Tanto las formas ccc monoméricas como las multiméricas y aquellas que permanecían en el origen resultaban inertes al tratamiento con la nucleasa. Estos resultados lo llevaron a proponer que las formas HMW estaban constituidas por multímeros lineales del plásmido. Sin embargo, hasta ese momento no podía descartarse que se tratara de multímeros circulares que resultaran linealizados durante el proceso de extracción (Cohen A. & Clark A.J., 1986).

Unos años más tarde se comprobó la naturaleza lineal de los multímeros utilizando la técnica de lisis

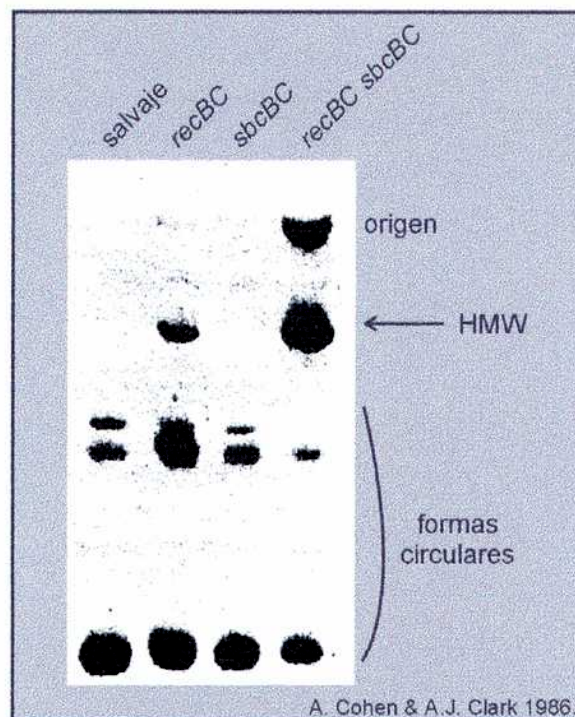
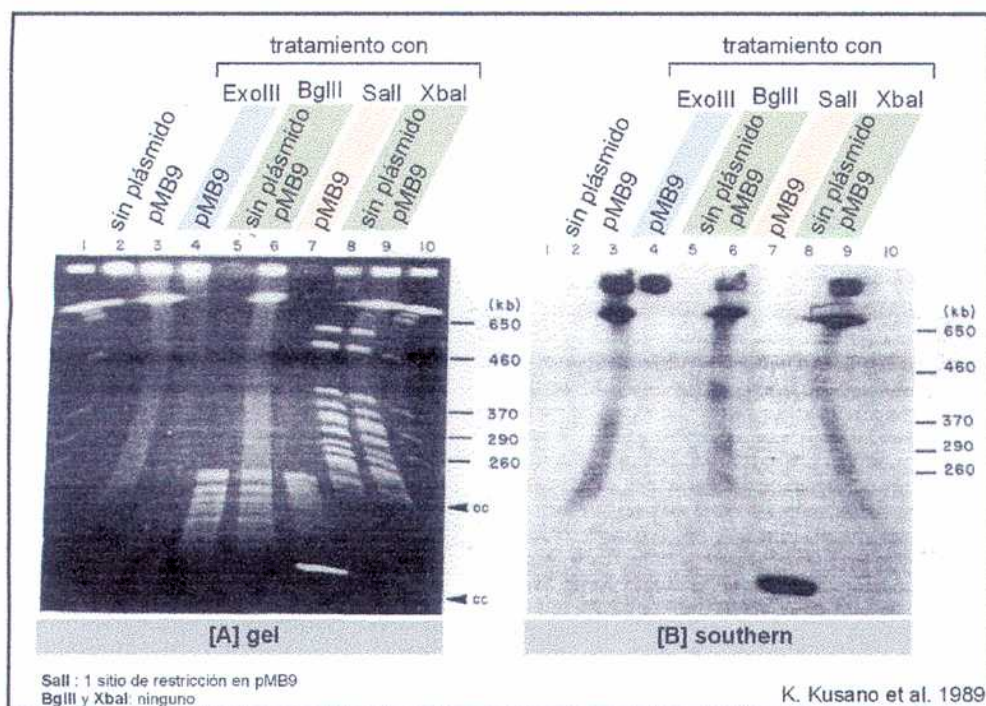


Figura 32 Acumulación de HMW en *E.coli recBC sbcBC*

Análisis por southern de las formas moleculares del plásmido pSB344 en distintas cepas de *E.coli*. Clark realizó preparaciones de ADN total de distintas cepas (cuyos genotipos se indican en la figura) conteniendo el plásmido pSB344 (derivado de pACYC184, origen p15A). Sometió las preparaciones a electroforesis en un gel de agarosa y posterior transferencia a una membrana e hibridación con una sonda radioactiva que detectaba específicamente el plásmido.

celular en tacos de agarosa y posterior análisis por electroforesis en campo pulsátil (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis) y southern-blot (Kusano K. et al., 1989). Esta técnica, que consiste en lisis las células una vez que han sido inmovilizadas en tacos de agarosa, permite una lisis suave que mantiene la integridad de moléculas de ADN de gran tamaño. Luego un fragmento del taco de agarosa, se incluye en un gel de agarosa y se lo somete a electroforesis en campo pulsátil. Sólo pueden ingresar al gel moléculas lineales de ADN.

Al analizar por esta técnica células *recBC sbcBC* conteniendo un plásmido de tipo ColE1, Kusano y colaboradores observaron que una proporción importante del plásmido entraba al gel, mientras que el

**Figura 33: Análisis por PFGE.**

Kusano y colaboradores prepararon tacos de agarosa conteniendo 2.5×10^7 células de la cepa KD2190 [*recBC sbcBC*] portando el plásmido pMB9 (derivado de ColE1).

Sometieron los tacos de agarosa a distintos tratamientos, según se detalla en la figura y luego analizaron el ADN contenido en éstos por PFGE (45 horas con pulsos de 45 seg).

[A] gel teñido con bromuro de etidio.

[B] autorradiografía del southern realizado sobre el mismo gel, utilizando una sonda radioactiva que reconocía específicamente al plásmido.

calles 1 y 10: marcador de PM, cromosomas de levadura.
calle 2: cepa KD2190 sin plásmido.

resto permanecía en el origen [Figura 33 B, calle 3], comprobándose de esta manera que en dicho contexto genético, una fracción de las moléculas del plásmido estaba conformada por multímeros lineales de alto peso molecular (Kusano et al. 1989). Si los tacos de agarosa eran tratados previamente con ExoIII, las formas lineales desaparecían, mientras que las formas que permanecían en el origen no se veían afectadas [B, calle 4]. Por otro lado, el tratamiento previo de los tacos con una enzima de restricción con un único sitio de corte en el plásmido, convertía las dos formas del plásmido en monómeros lineales que entraban al gel [B, calle 7]. Como control, procesaron en paralelo la cepa carente de plásmidos y verificaron que el ADN genómico permanecía intacto durante el proceso de lisis de las células en el taco de agarosa y como tal no lograba entrar al gel [Figura 33 A, calle 2].

En función de estos resultados se concluyó que en células *recBC sbcBC* los plásmidos se involucraban en procesos alternativos de replicación que generaban formas de alto peso molecular, en gran parte lineales. En ese momento se postuló que las formas que permanecían en el origen, podrían ser moléculas lin-

eales con extremos protegidos o moléculas lineales con una estructura ramificada (Kusano K. et al., 1989).

En cuanto a los requerimientos genéticos, A.Cohen (Silverstein Z. & A.Cohen, 1987) demostró que la helicasa DnaB era esencial para la generación de multímeros y distintos autores (Cohen A. & Clark A.J., 1986; Niki H. et al. 1990; Kusano K. et al. 1989) observaron que mutaciones en *recA* reducían dramáticamente la acumulación de HMW. En función de estas observaciones, Clark formuló un modelo para explicar la generación de HMW que incluía eventos de recombinación en los ciclos de replicación del plásmido (Cohen A. & Clark A.J., 1986). Propuso que durante los ciclos de replicación de tipo θ (theta) algún intermediario podría ser convertido en un círculo abierto con una región simple cadena redundante, dando lugar al establecimiento de un proceso de replicación alternativo por un mecanismo de círculo rodante, o modo σ (sigma) [Figura 34]. En un contexto salvaje la actividad ExoV de RecBCD degradaría los extremos lineales de la figura σ y las moléculas de ADNdc lineal que pudieran generarse a partir de

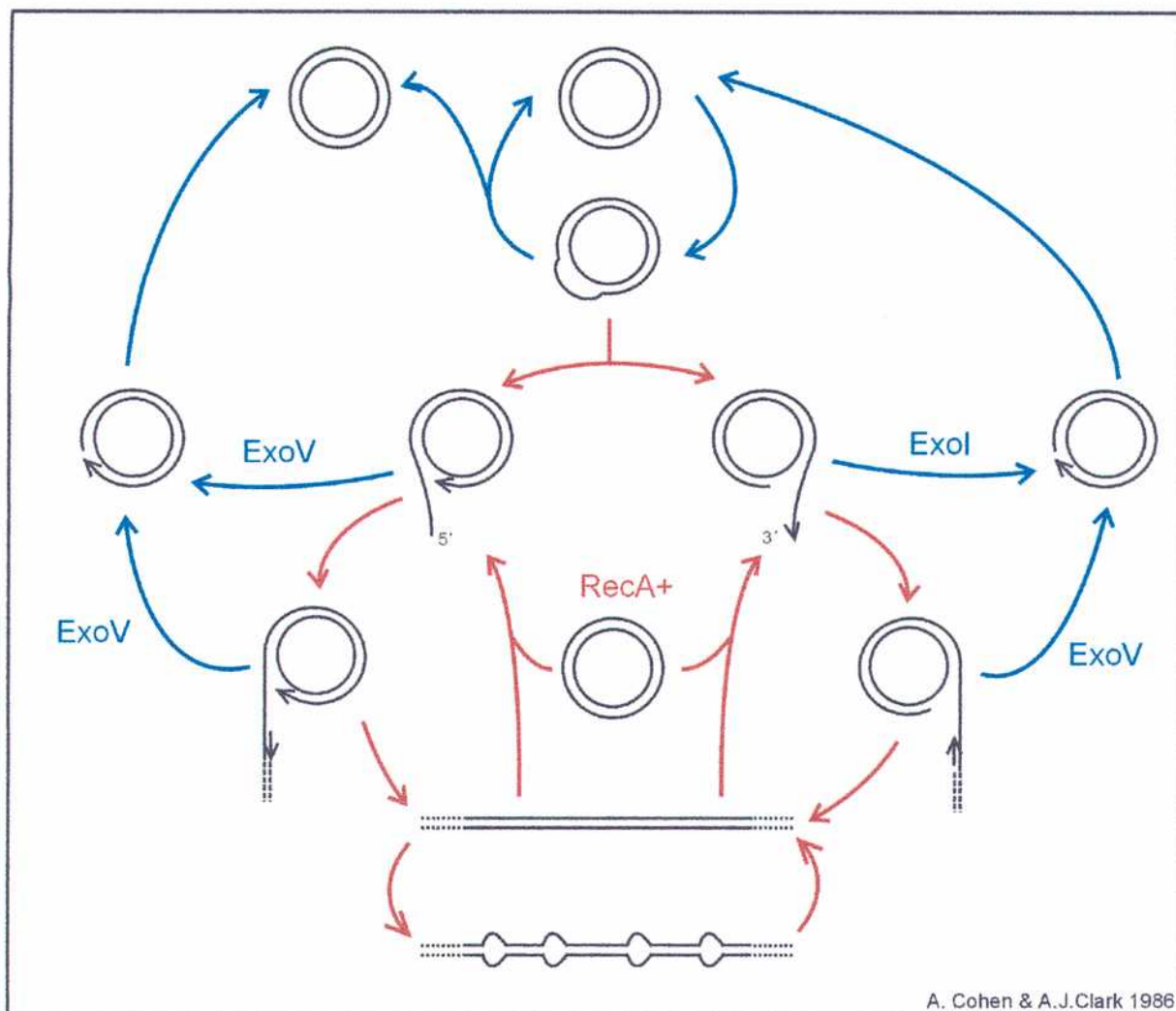


Figura 34: Modelo propuesto por A.J. Clark para explicar la generación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

No se hace referencia a SbcCD, ya que en ese momento se desconocía que la cepa JC7623 tenía también una mutación supresora en *sbcCD*.

éstas, mientras que ExoI degradaría las regiones simple cadena redundantes de los círculos abiertos. En el contexto *recBC sbcBC*, deficiente en las nucleasas ExoV, ExoI (y SbcCD), podría establecerse la replicación por círculo rodante, dando lugar a la generación de multímeros lineales del plásmido de muy alto peso molecular.

RecA contribuiría a amplificar este proceso al catalizar la invasión de monómeros circulares del plásmido por parte de multímeros lineales, generando más figuras σ que amplificaran el plásmido. Para explicar la existencia de ADN plasmídico incapaz de entrar en geles de agarosa (señal en el origen) se hipotetizó que los multímeros lineales del plásmido

podrían a su vez dar lugar a múltiples inicios de replicación generando estructuras altamente ramificadas, que serían incapaces de migrar en un gel de agarosa. El modelo no hacía predicciones en cuanto a las proteínas involucradas en cada uno de los pasos que llevarían al establecimiento de formas de replicación alternativas (Cohen A. & Clark A.J., 1986).

En los años subsiguientes se corroboró que en un contexto *recBC sbcBC*, plásmidos con distintos orígenes de replicación (p15A, pSC101 y oriC) generaban HMW, al igual que los derivados de ColE1 (Silverstein Z. & Cohen A., 1987).

Hipótesis y Objetivos planteados

Hipótesis de trabajo

El presente trabajo propone caracterizar el fenómeno de generación y acumulación de multímeros HMW de plásmidos en *Escherichia coli recBC sbcBC*. En el marco de la nueva visión imperante sobre la estrecha relación que existe entre las funciones de replicación, reparación y recombinación en bacterias, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: en el contexto *recBC sbcB sbcCD* la ausencia de RecBCD (principal exonucleasa responsable de degradar moléculas de ADN conteniendo Edc), posibilitaría la acumulación de intermediarios de replicación dañados del plásmido.

En función del fenotipo Rec⁺ de este contexto genético, estos intermediarios de replicación dañados podrían involucrarse en replicación-mediada-por-recombinación (RDR), disparando un modo de replicación alternativo, independiente del origen del plásmido, que conduciría a la acumulación de HMW.

En la primer etapa del trabajo se avanzó en la caracterización del fenómeno de acumulación de HMW

utilizando como herramienta un sistema de recombinación específico-de-sitio [*res-TnpR*]. El sistema de complementación diseñado permitió partir de células conteniendo una mínima proporción de HMW, para analizar la cinética de generación y acumulación de este tipo de multímeros, en distintas condiciones de crecimiento.

Luego se intentó definir las funciones esenciales para la generación de HMW en este contexto mediante un análisis genético. Con este objetivo, se inactivaron genes involucrados en los procesos celulares de recombinación y reinicio de la replicación y se analizó el efecto que producía inactivar estas funciones en la acumulación de HMW.

Finalmente se integró la información genética y fisiológica recabada en un modelo para explicar la generación de multímeros HMW basado en un proceso de replicación mediada por recombinación.

Objetivos planteados:

- ☐ Caracterización del fenómeno de generación y acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*.
- ☐ Determinación de las funciones esenciales para la generación de HMW.
- ☐ Elaboración de un modelo para explicar la generación de HMW en el marco teórico vigente acerca de la interrelación replicación / recombinación.

Resultados - Capítulo 1

- Pero, ¿no es muy oscuro el sótano?
- La verdad no entra en un entendimiento rebelde. Si todos los lugares de la tierra están en el Aleph, ahí estarán todas las luminarias, todas las lámparas, todos los veneros de luz.
- Iré a verlo inmediatamente.

J.L.B., El Aleph.

1. Caracterización del fenómeno de acumulación de HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	67
1.1 Puesta a punto de un sistema de complementación basado en el sistema de resolución <i>res-TnpR</i>.....	67
1.1.1. <i>res-TnpR</i> es capaz de evitar que un plásmido acumule HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	67
1.1.2 Puesta a punto de un sistema de complementación para estudiar el fenómeno de acumulación de HMW	68
1.1.2.a El plásmido reporter <i>pUC::res</i>	68
1.1.2.b Complementación con <i>pACYC::tnpR</i> : expresión constitutiva de TnpR.	69
1.1.2.c Complementación con <i>pGH156</i> : expresión inducible de TnpR [promotor <i>P_{IacUV5}</i>]	69
1.1.2.d Complementación con <i>pBAD::tnpR</i> : expresión regulable de TnpR [promotor <i>P_{BAD}</i>]	70
1.1.2.e Ensayo de complementación con el plásmido <i>pBADtnpR</i>	72
1.2 Análisis de la cinética de acumulación de HMW utilizando el sistema de complementación <i>pUCres/pBADtnpR</i>.....	73
1.2.1 Cinética de acumulación de HMW durante la fase exponencial	73
1.2.2 Cinética de acumulación de HMW durante la fase estacionaria.	74
1.2.3. Evidencias de actividad replicativa durante la fase estacionaria	75
1.2.4. ¿ Un sistema de resolución activo evita que se dispare la actividad replicativa de FE ?	76
1.3 Cinética de acumulación de HMW de los plásmidos <i>pUCres</i> y <i>pUCrestnpR</i>.....	78
1.3.1. Efecto glucosa	78
1.3.2. ¿Cuál es la cinética en LB ?	81
1.3.3. Subcultivos sucesivos en LB no logran erradicar el HMW por segregación.	84
1.3.4. Efecto glucosa y daño oxidativo	85
1.4 Sinopsis.....	88

Figuras

Figura 35: res-TnpR evita que el plásmido acumule HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	67
Figura 36: Plásmido reporter pUCres.	68
Figura 37: Complementación con pACYC <i>tnpR</i> : expresión constitutiva de TnpR	69
Figura 38: Complementación con pGH156 y pGH252: expresión inducible de TnpR	70
Figura 39: Plásmido pBAD-tnpR	71
Figura 40: Detección de TnpR por western.	71
Figura 41: Ensayo de resolución <i>in vivo</i> con el plásmido pGH436	71
Figura 42: Complementación con pBAD <i>tnpR</i> : expresión regulable de TnpR	72
Figura 43: Cinética de acumulación de HMW durante la fase exponencial.	73
Figura 44: Cinética de acumulación de HMW durante la FE.	74
Figura 45: Actividad replicativa y análisis por southern del plásmido pUCres:	75
Figura 46: Esquema del experimento.	77
Figura 47: MB1026 en LB, LBglu y LBara.	77
Figura 48: Esquema del experimento	79
Figura 49: Actividad replicativa de FE y acumulación de HMW.	80
Figura 50: pUCres y pUCrestnpR durante la transición hacia FE	82
Figura 51: Cinética de acumulación de HMW y de amplificación de los plásmidos	83
Figura 52: Durante el crecimiento en LB, la síntesis de HMW parece compensar la pérdida por segregación.	85
Figura 53: Estrategias utilizadas por <i>E. coli</i> para defenderse del daño oxidativo durante la FE.	86

Tablas

Tabla 3: Viabilidad de JC7623/pUCres pBADtnpR en las distintas condiciones de cultivo	78
Tabla 4: Eficiencia de plaqueo de las cepas JC7623 y JC7623/pUCres	87
Tabla 5: La incubación de las placas de recuento en anaerobiosis no incrementa los la eficiencia de plaqueo de la cepa JC7623/pUCres crecida en [LBglu].	87
Tabla 6: Incubación de la cepa JC7623/pUCres en [LB glu], con y sin agitación.	88

1. Caracterización del fenómeno de acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*

1.1. Puesta a punto de un sistema de complementación basado en el sistema de resolución *res-TnpR*.

1.1.1 *res-TnpR* es capaz de evitar que un plásmido acumule HMW en el contexto *recBC sbcBC*

La cepa JC7623 [*recBC sbcBC*] suele usarse como huésped para analizar la cinética de segregación de plásmidos, ya que en este contexto genético los plásmidos se pierden más rápidamente durante subcultivos sucesivos en ausencia de presión de selección. Durante el transcurso de un estudio sobre el efecto estabilizador del sistema de resolución específico-de-sitio del transposon $\gamma\delta$, se observó que la inclusión de este sistema de resolución en un plásmido evita que el mismo acumule HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

En la Figura 35 se puede observar que el plásmido pUC19 acumula grandes cantidades de HMW en *E.coli* JC7623 [calle 2]. Por el contrario, derivados del mismo conteniendo una copia completa del transposon $\gamma\delta$ [calle 3] o únicamente su sistema de resolución *res-TnpR* [calle 4], permanecen mayoritariamente como monómeros circulares.

En cuanto al plásmido pUC19, cabe aclarar que posee un origen pMB1, derivado de ColE1. Su sistema de control de número de copias determina que en un contexto salvaje se mantengan aproximadamente 200 copias del plásmido por célula [sección 1.2.2 Introducción]. Dado que carece de sitio *cer*, el plásmido pUC19 no puede utilizar el sistema Xer bacteriano para resolver sus dímeros [sección 5.2 Introducción].

Tal como se adelantó en la sección 5.3 de la Introducción, el transposón $\gamma\delta$ pertenece a la familia del Tn3, que se caracteriza por un mecanismo de transposición replicativo. El primer paso del proceso

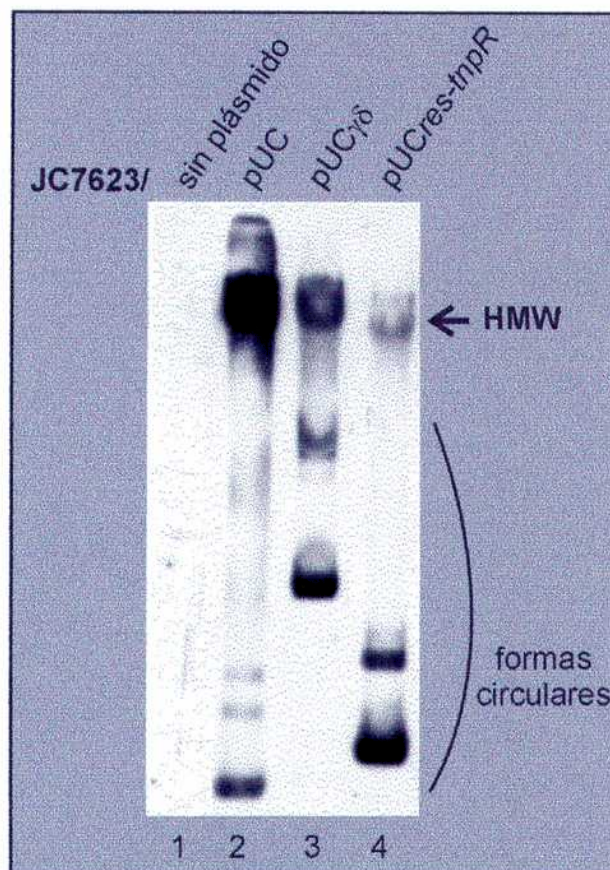


Figura 35: *res-TnpR* evita que el plásmido acumule HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

Se analizaron las formas de los distintos plásmidos en la cepa JC7623 por southern, siguiendo la técnica detallada en la sección materiales y métodos. Cada cepa fue cultivada en caldo LB suplementado con Ampicilina 100µg/ml. Transcurridas 24 horas de cultivo, se realizó una extracción de ADN total y se sometieron cantidades equivalentes de ADN total (2µgr) de cada cepa a electroforesis en un gel de agarosa. Luego el ADN fue transferido a una membrana de nylon y se realizó una hibridación con una sonda que reconoce específicamente al plásmido [sonda Ap299]. La detección se realizó por quimioluminiscencia.

de transposición es catalizado por la transposasa e involucra la formación de un cointegrado entre la molécula donante y la receptora, con una copia del transposón en cada una de las uniones. El segundo paso consiste en resolver este cointegrado en una molécula donante intacta y una molécula receptora conteniendo una copia del transposón. La resolución del cointegrado es catalizada por la resolvasa TnpR actuando sobre el sitio de resolución *res* presente en cada una de las copias del transposón.

El mecanismo molecular del proceso de resolución ha sido estudiado en detalle y se ha comprobado que

la resolvasa TnpR del transposón $\gamma\delta$ posee estrictos requerimientos topológicos para actuar: requiere un sustrato circular, superenrollado negativamente que contenga dos sitios de resolución *res* en la misma dirección. Esta topología definida del sustrato permite un correcto posicionamiento de los sitios *res* dentro del sinaptosoma, favoreciendo la resolución [Figura 27, sección 5.3 Introducción].

Un dímero circular del plásmido cumple con estos requerimientos, posee dos sitios *res* en la misma orientación y en un contexto Topo⁺ estará superenrollado negativamente (en mayor o menor grado dependiendo de las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento). De ahí, que la presencia del sistema de resolución *res*-TnpR en el plásmido le permita mantenerse casi exclusivamente como monómero, ya que resuelve los dímeros o multímeros que puedan generarse en monómeros con una alta eficiencia; equivalente a lo que ocurre con *dif* / XerCD en el caso del genoma bacteriano.

En el contexto *recBC sbcBC*, que es esencialmente Rec⁺, se generan multímeros circulares del plásmido por recombinación homóloga. Si el plásmido posee un sistema de resolución, los multímeros circulares podrán ser resueltos nuevamente en monómeros. En función de las características de las formas HMW (ADN lineal o ramificado) y los requerimientos topológicos de la resolvasa TnpR, puede preverse que el HMW no sería un sustrato adecuado para el sistema *res*-TnpR. Tampoco lo serían ninguno de los intermediarios propuestos por Clark para la generación de HMW (círculos abiertos, figuras sigma, moléculas lineales).

La capacidad de *res*-TnpR de evitar que se acumule HMW en el contexto *recBC sbcBC* puso en evidencia que el modelo propuesto para explicar la generación de HMW en este contexto genético probablemente no fuera acertado. A la vez, planteó la posibilidad de utilizar el sistema *res*-TnpR como una her-

ramienta para caracterizar el mecanismo de generación de HMW.

1.1.2 Puesta a punto de un sistema de complementación para estudiar el fenómeno de acumulación de HMW

1.1.2.a El plásmido reporter pUC::res

Se construyó el plásmido reporter pUC::res, insertando el sitio de resolución *res* en el sitio de clonado del plásmido pUC19 [Figura 36].

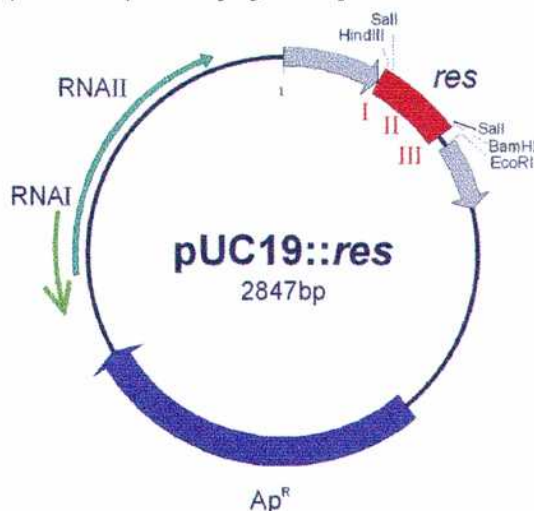


Figura 36: Plásmido reporter pUCres.

Para realizar los ensayos de complementación que se describen en las siguientes secciones se transformó la cepa JC7623 [*recBC sbcBC*] con el plásmido reporter pUC::res y un segundo plásmido compatible que expresara TnpR en forma constitutiva o regulable.

La metodología empleada para analizar la acumulación de multímeros involucra los siguientes pasos [para una descripción más detallada ver la sección 2.1 de Mat. y Métodos]:

- ❖ aislamiento de ADN total.
- ❖ tratamiento de las preparaciones con una enzima de restricción que fraccione el ADN genómico bacteriano y linealice el segundo plásmido, para evitar que éstos interfieran en la detección de las formas HMW del plásmido reporter.

- ❖ separación del ADN por electroforesis en gel de agarosa.
- ❖ transferencia del ADN a una membrana de nylon.
- ❖ hibridación con una sonda que detecta específicamente al plásmido reporter.
- ❖ detección por quimioluminiscencia.
- ❖ análisis densitométrico para determinar el porcentaje de formas HMW del total de ADN plasmídico en cada preparación (%HMW) o bien la relación de formas HMW respecto de las formas circulares (HMW / FC).

1.1.2.b Complementación con pACYC::tnpR: expresión constitutiva de TnpR.

El primer ensayo de complementación se realizó con el plásmido pACYC::tnpR. Este plásmido posee un marcador de resistencia a cloranfenicol y contiene el gen *tnpR* bajo control del promotor de tetraciclina [P_{tet}], cuya expresión es constitutiva.

Se incubaron las distintas cepas durante 24 horas en medio LB_{ApCm} a 32 °C, se extrajo ADN total y se analizó la distribución del plásmido reporter pUCres en sus distintas formas, siguiendo la metodología delineada en la sección anterior. Tal como puede verse en la Figura 37, la complementación en *trans* utilizando el plásmido pACYC::tnpR logra evitar que el plásmido reporter pUC::res acumule una gran proporción de multímeros HMW en el contexto *recBC sbcBC* [calle 6]. Por el contrario, no tiene ningún efecto sobre el vector carente de sitio de resolución [pUC], que se acumula principalmente como HMW [calle 5].

De esta manera se verificó que la expresión *en trans* de TnpR a partir de un plásmido compatible puede evitar la acumulación de multímeros del plásmido reporter, con la condición de que éste porte el sitio de resolución *res*.

Se planteó la necesidad de construir un plásmido compatible con pUC::res que permitiera regular la expresión de TnpR.

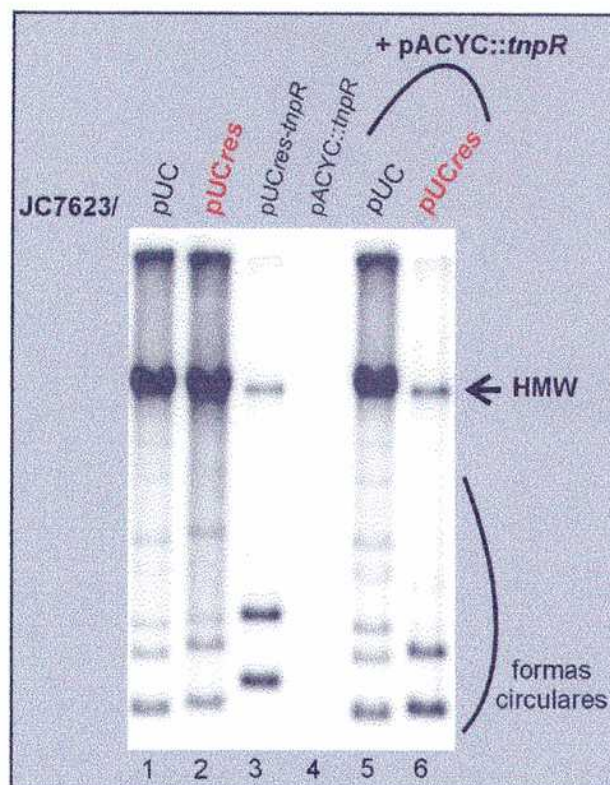


Figura 37: complementación con pACYCtnpR: expresión constitutiva de TnpR

Se cultivó las distintas cepas en LB_{ApCm} a 32°C. Transcurridas 24 horas, se analizó el plásmido reporter por southern-blot hibridando con una sonda específica para el pUC (sonda Ap299).

1.1.2.c Complementación con pGH156: expresión inducible de TnpR [promotor P_{lacUV5}]

Se realizó un primer intento de complementación con un plásmido de expresión inducible, utilizando el plásmido pGH156, que porta el gen *tnpR* bajo control del promotor P_{lacUV5} . Este promotor se puede inducir por el agregado de IPTG al medio de cultivo [Figura 38 A].

Se analizó en paralelo la complementación con el plásmido pGH252, que expresa la mutante catalítica TnpR[R68H] en la que se ha sustituido la arginina 68 por histidina. Esta mutante posee una afinidad por el sitio de resolución similar a la de la proteína salvaje (con una constante de afinidad del mismo orden) y mantiene la capacidad de formar el sinaptosoma. Sin embargo, carece de la actividad catalítica que le permita realizar el corte e intercambio de cadenas, necesario para completar la recombinación específica de sitio [Hughes R.E. et al 1990].

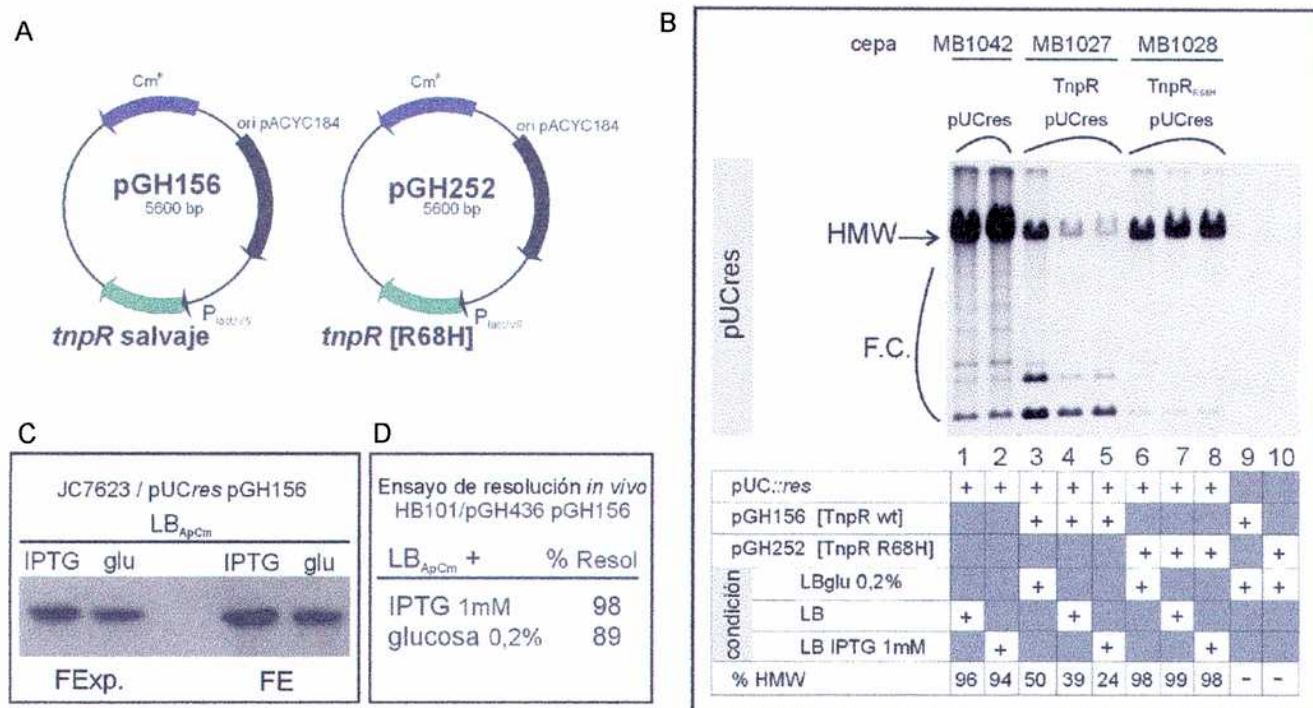


Figura 38: Complementación con pGH156 y pGH252

Se cultivaron las cepas:

MB1042: JC7623/ pUCres

MB1027: JC7623/ pUCres pGH156

MB1028: JC7623/ pUCres pGH252

en tres condiciones: LB, LB glucosa 0,2% y LB IPTG 1mM.

Todos los cultivos se realizaron con presión de selección. Transcurridas 24 horas de cultivo, se analizó el plásmido reporter pUCres por southern-blot.

Se analizaron las cepas MB1042, MB1027 y MB1028 en tres condiciones de cultivo: LB, LB glucosa 0,2% y LB IPTG 1mM (más detalles metodológicos al pie de la Figura 38). Tal como era de esperar, la expresión en *trans* de la mutante catalítica TnpR[R68H], a partir de pGH252, no logra evitar que el plásmido reporter acumule HMW [Figura 38 B, calle 8: JC7623/pGH252 pUCres en LB IPTG]. Por otro lado, la expresión de la resolvasa salvaje, a partir de pGH156, reduce al mínimo la acumulación de HMW del plásmido reporter [calle 5: JC7623/pGH156 pUCres en LB IPTG].

Por lo tanto, hace falta el sitio de resolución en *cis* y TnpR funcional, para evitar que un plásmido acumule HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

Sin embargo, en el caso de la cepa MB1027 en la condición [LB glucosa], en la que debería reprimirse la expresión de TnpR a partir de pGH156, también se observa una proporción disminuida de HMW respec-

[A] Plásmidos pGH156 y pGH252.

[B] Análisis del plásmido reporter pUCres, por southern.

[C] Detección de TnpR por western blot. Análisis de la expresión de TnpR a partir del plásmido pGH156, durante la fase exponencial (FExp.) y a las 24 horas de cultivo (FE), en las condiciones LB IPTG 1 mM y LB glucosa 0,2%.

[D] Ensayo de resolución *in vivo*, utilizando el plásmido reporter pGH436, para evaluar la expresión de TnpR a partir del plásmido pGH156, en LB IPTG y LB glucosa 0,2%.

to de la cepa control conteniendo únicamente el plásmido reporter [comparar calle 3 con calle 1]. Al parecer, el agregado de glucosa al medio no logra reprimir totalmente la expresión de TnpR. Esta observación fue confirmada por western-blot utilizando un antisuero específico para TnpR y mediante ensayos de resolución *in vivo* utilizando el plásmido pGH436 como reporter [Figura 38 C y D]. Se dan más detalles sobre el ensayo de resolución *in vivo* utilizando el plásmido pGH436 en la siguiente sección [Fig. 41A]

En función de estas observaciones se decidió construir un plásmido que permitiera inducir o reprimir totalmente la expresión de TnpR de acuerdo a las condiciones de cultivo empleadas.

1.1.2.d Complementación con pBAD::tnpR: expresión regulable de TnpR [promotor P_{BAD}]

Se construyó el plásmido pBAD::tnpR, a partir del vector pBAD33, que posee un origen de replicación

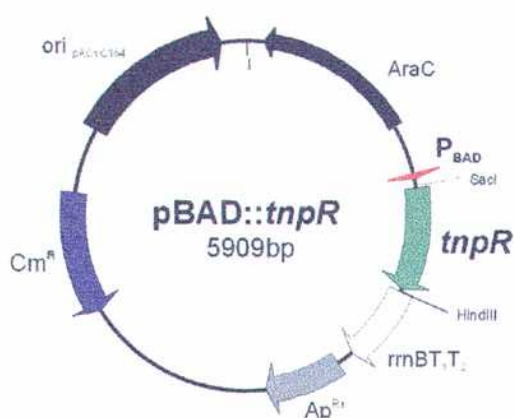


Figura 39: Plásmido pBAD-tnpR

derivado del plásmido pACYC184 y un marcador de resistencia a cloranfenicol. El gen *tnpR* fue puesto bajo control del promotor P_{BAD} , que se encuentra sujeto a regulación positiva y negativa por parte del regulador AraC [Figura 39]. La expresión a partir de este promotor puede ser inducida por el agregado de arabinosa al medio o reprimida por el agregado de glucosa. Al plásmido pBAD $tnpR$ se le verificó:

❖ **expresión regulable de TnpR:** por western blot utilizando un antisuero específico para TnpR. Se comprobó que en los extractos proteicos de la cepa [JC7623/ pBAD-*tnpR*], preparados a partir de cultivos de 24 horas en LB glucosa 0,2%, no se detectaba TnpR. Mientras que aquellos preparados a partir de cultivos en LB arabinosa, daban una señal cuya intensidad se relacionaba con la concentración de arabinosa en el medio [Figura 40].

❖ **funcionalidad de la resolvasa expresada:** mediante un ensayo de resolución con el plásmido reporter pGH436 (Stark W.M. et al. 1991). El plásmido pGH436 posee un gen de resistencia a tetraciclina flanqueado por dos sitios *res*, en la misma orientación [ver Figura 41 A]. En presencia de TnpR funcional, la recombinación sitio-específica catalizada por la resolvasa elimina el fragmento flanqueado por los sitios *res* y se pierde el gen de resistencia a tetraciclina. Por lo tanto aquellas células en las que se induce la transcripción de *tnpR* y se produce TnpR funcional, se vuelven sensibles a la tetraciclina. Para realizar los

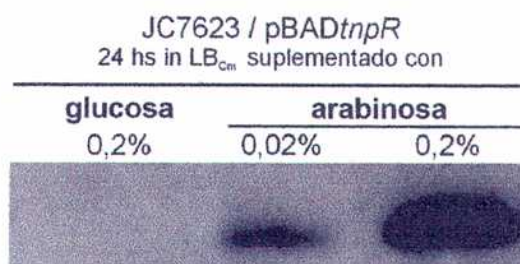
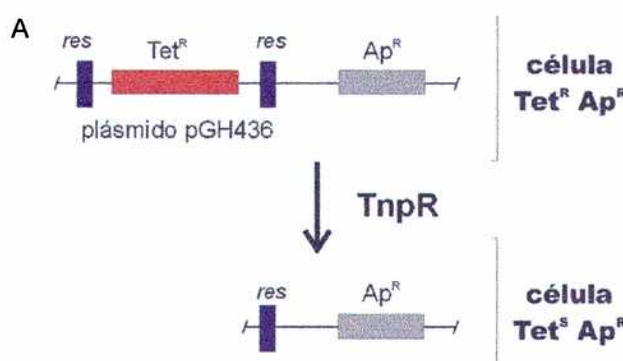


Figura 40: Detección de TnpR por western.

En LB glucosa 0,2% no se expresa TnpR a partir de pBAD $tnpR$. En LB arabinosa, la expresión de TnpR a partir de pBAD $tnpR$ es proporcional a la concentración de arabinosa.



B

HB101/pGH436+pBAD-tnpR en LB _{SmaCmAp} +	% resolución
Glucosa 0,2%	0,2 ± 0,04
Arabinosa 0,2%	100,0 ± 0,01
Arabinosa 0,02%	96,0 ± 3
Arabinosa 0,002%	41,7 ± 18
Arabinosa 0,0002%	3,5 ± 10

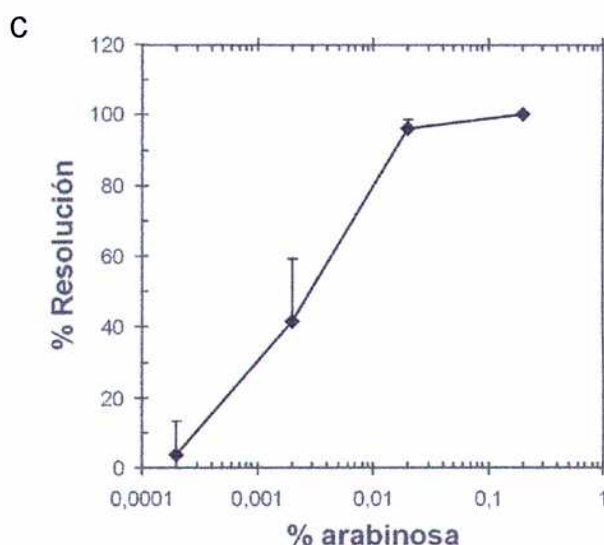


Figura 41: Ensayo de resolución in vivo.

[A] Esquema del experimento

[ByC] Resultados: porcentaje de resolución del plásmido reporter en función de las condiciones de cultivo. Se promediaron los valores de % resolución de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.

ensayos de resolución *in vivo* se utilizó la cepa HB101 [recA56] que es defectiva en recombinación homóloga, de manera de asegurarse que las deleciones se debieran a recombinación sitio-específica catalizada por TnpR. El %Resolución es una medida de la expresión y funcionalidad de TnpR expresada a partir del plásmido pBAD-tnpR en función de la presencia de arabinosa o glucosa en el medio de cultivo.

En la Figura 41B se puede observar que en presencia de glucosa no se detecta resolución del plásmido reporter pGH436, indicando que en esta condición está totalmente reprimida la expresión de TnpR a partir del plásmido pBADtnpR. Por otro lado, el porcentaje de resolución aumenta en forma directamente proporcional a la concentración de arabinosa en el medio, para concentraciones de arabinosa que van desde 0,0002 a 0,02 %. Por lo tanto en este rango de concentraciones la inducción de la transcripción de *tnpR* es proporcional a la concentración de arabinosa [Figura 41C].

En síntesis, el plásmido pBADtnpR permite regular la expresión de TnpR por el agregado de arabinosa /glucosa al medio de cultivo. La suplementación del medio con glucosa 0,2% reprime totalmente la expresión de TnpR [ausencia de señal en el western y resolución nula en el ensayo de resolución]. La suplementación con arabinosa induce la expresión de TnpR, en forma proporcional a la concentración de arabinosa en el medio [0,02-0,002%]. El ensayo de resolución *in vivo*, corrobora que la proteína TnpR expresada a partir del plásmido pBADtnpR es funcional.

1.1.2.e Ensayo de complementación con el plásmido pBADtnpR

Una vez verificado el plásmido se realizó un ensayo de complementación. La cepa JC7623 fue transformada con pBAD::tnpR y el plásmido reporter pUC::res. Se realizaron cultivos en caldo LB conteniendo glucosa o arabinosa. Transcurridas 24 horas

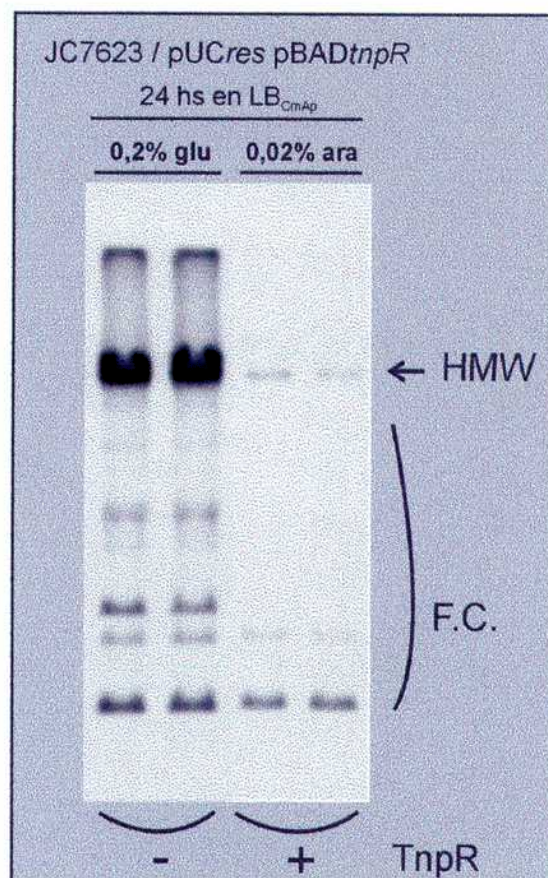


Figura 42: Ensayo de complementación con el plásmido pBADtnpR

Se cultivó la cepa MB1026 [JC7623/pUCres pBADtnpR] durante 24 horas en LB_{ApCm} suplementado con glucosa o arabinosa. Transcurridas 24 horas de cultivo, se analizó la distribución del plásmido reporter pUCres en sus distintas formas por southern-blot. Se presentan los resultados de un experimento en el que se analizaron duplicados de cada condición de cultivo.

de cultivo, se evaluó la distribución del plásmido reporter pUC::res en sus distintas formas.

Puede observarse que el crecimiento en presencia de glucosa, que reprime la expresión de TnpR a partir de pBAD::tnpR, resulta en acumulación de HMW del plásmido reporter. Mientras que el crecimiento en presencia de arabinosa, que induce la expresión de TnpR, evita que el plásmido reporter acumule multímeros [Figura 42].

De esta manera se concretó la puesta a punto de un sistema de complementación que permitiera estudiar la acumulación de HMW del plásmido reporter ante la inducción/represión de la expresión de TnpR. Este sistema se utiliza en las siguientes secciones, para analizar la cinética de acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

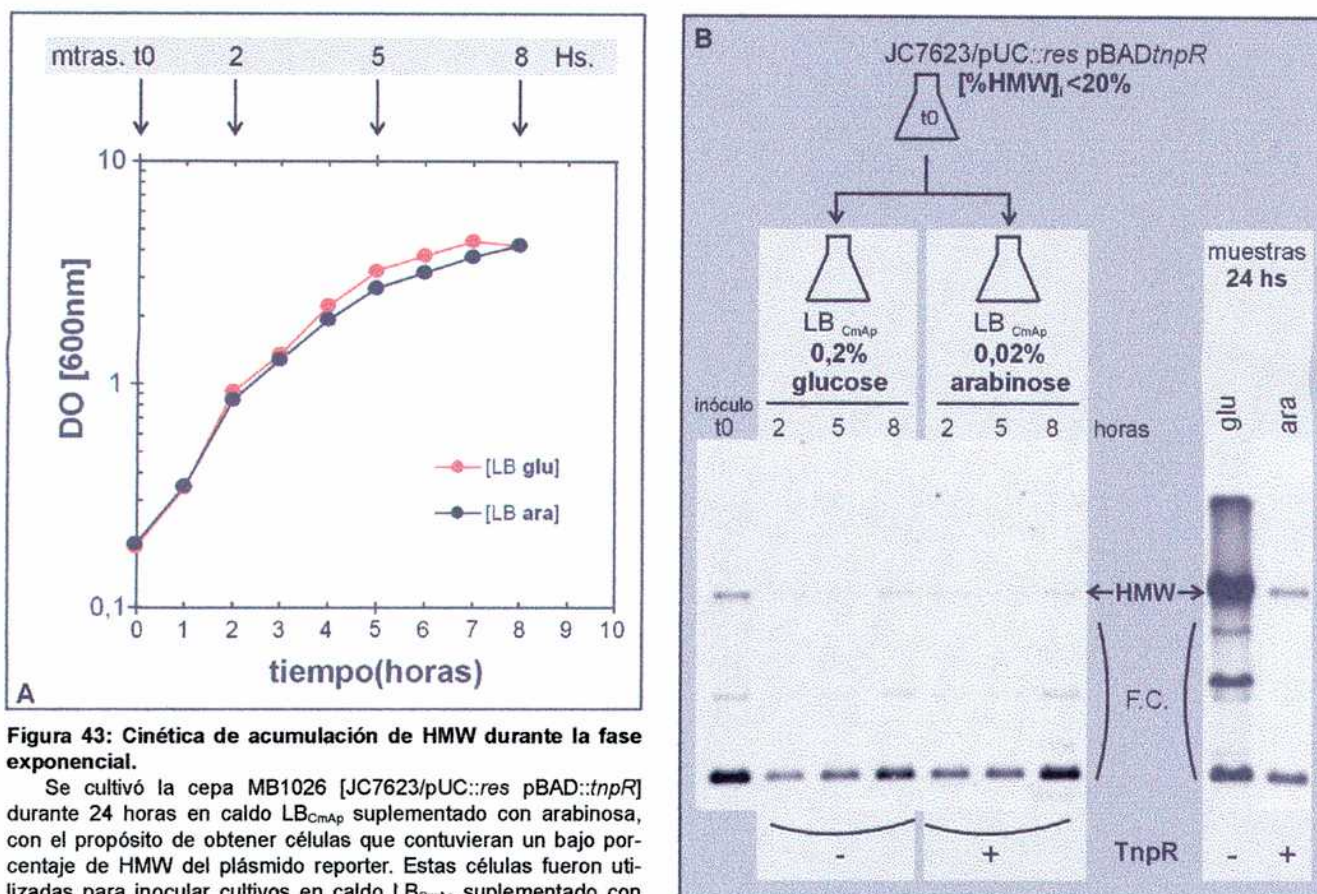


Figura 43: Cinética de acumulación de HMW durante la fase exponencial.

Se cultivó la cepa MB1026 [JC7623/pUC::res pBAD::tnpR] durante 24 horas en caldo LB_{CmAp} suplementado con arabinosa, con el propósito de obtener células que contuvieran un bajo porcentaje de HMW del plásmido reporter. Estas células fueron utilizadas para inocular cultivos en caldo LB_{CmAp} suplementado con glucosa 0,2% o arabinosa 0,02%, que fueron incubados durante 24 horas en un baño a 30 °C, con agitación (180 rpm). Durante el transcurso del experimento se tomaron muestras cada hora para determinar la densidad óptica (DO) y a las 0, 2, 5, 8 y 24 horas para analizar la formas del plásmido reporter. [A] Se presentan las curvas de crecimiento en las dos condiciones de cultivo. En la región superior del gráfico se indican los tiempos de toma de muestras para analizar el plásmido. [B] Análisis de las formas del plásmido pUCres durante el transcurso de la fase exponencial y transcurridas 24 horas de cultivo en cada condición.

1.2 Análisis de la cinética de acumulación de HMW utilizando el sistema de complementación pUCres/pBADtnpR

1.2.1 Cinética de acumulación de HMW durante la fase exponencial

Se cultivó la cepa MB1026 [JC7623/pUC::res pBAD::tnpR] durante 24 horas en caldo LB suplementado con arabinosa, con el propósito de obtener células que contuvieran un bajo porcentaje de HMW del plásmido reporter. Estas células fueron utilizadas para inocular cultivos en caldo LB suplementado con glucosa 0,2% o arabinosa 0,02%. Durante el transcurso del experimento se tomaron muestras cada hora para determinar la densidad óptica (DO) y a las 0, 2, 5, 8 y 24 horas para analizar la formas del plásmido reporter [Figura 43].

Se esperaba observar un incremento en la proporción de HMW del plásmido pUCres durante el crecimiento en [LB glucosa], condición en la cual está reprimida la expresión de TnpR. En la figura puede observarse que, contrariamente a las expectativas, durante el transcurso de la fase exponencial no se registra un aumento significativo en la proporción de multímeros HMW del plásmido reporter en ninguna de las dos condiciones de cultivo. Sin embargo, en la muestra correspondiente a 24 horas de cultivo en [LB glucosa] se detecta un alto porcentaje de HMW.

Estos resultados parecían indicar que en ausencia de un sistema de resolución activo, el plásmido reporter comenzaba a acumular multímeros después de transcurridas 8 horas de cultivo en [LB glucosa], una vez culminada la fase exponencial de crecimiento. Se decidió, entonces, repetir estos experimentos

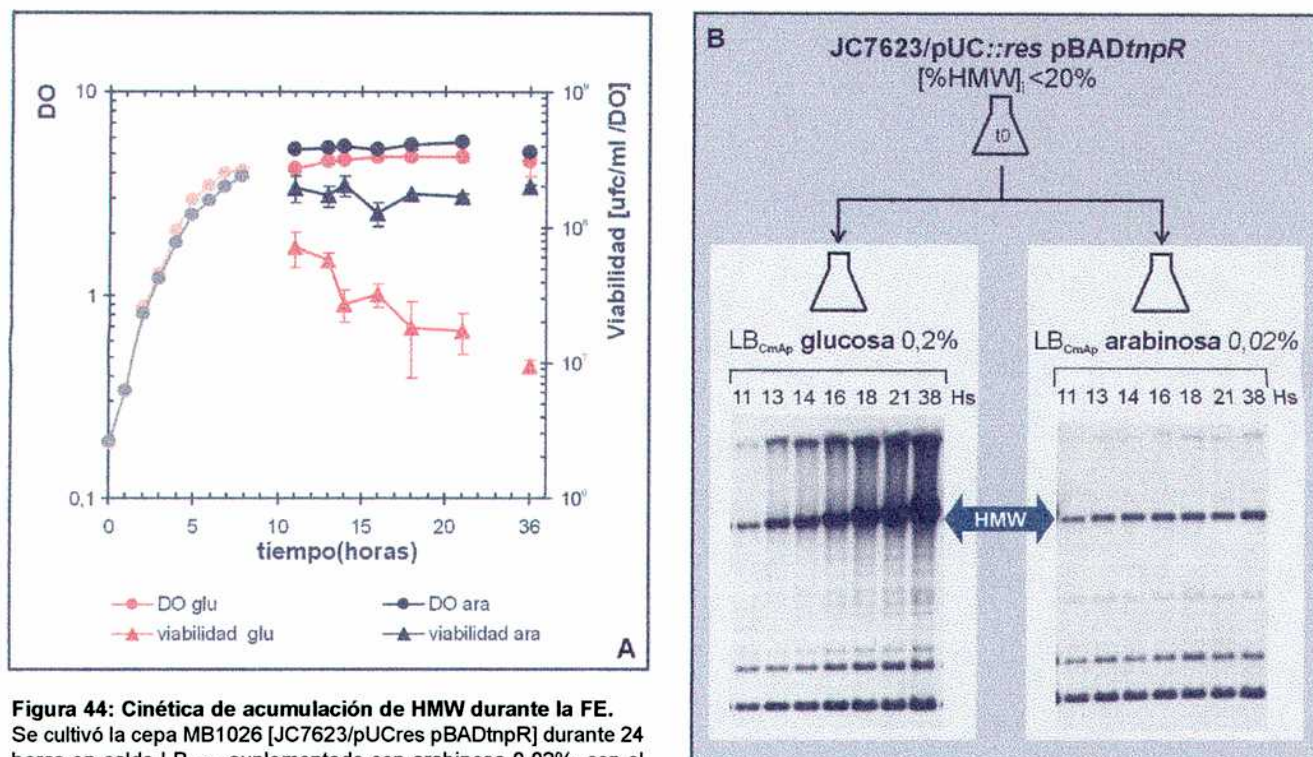


Figura 44: Cinética de acumulación de HMW durante la FE.

Se cultivó la cepa MB1026 [JC7623/pUCres pBADtnpR] durante 24 horas en caldo LB_{ApCm} suplementado con arabinosa 0,02%, con el objeto de obtener células que contuvieran un bajo porcentaje de HMW del plásmido reportero. Estas células fueron utilizadas para inocular erlenmeyers conteniendo caldo LB_{ApCm} suplementado con glucosa 0,2% o arabinosa 0,02% (DO_i 0,2), que fueron incubados en un baño a 30 °C, con agitación (180 rpm). A partir de las 11 horas de cultivo, se tomaron muestras para

- Medir DO a 600nm: Se han solapado las curvas de crecimiento exponencial características para cada condición de crecimiento (en color más claro) a modo de referencia.
- Estimar viabilidad [cfu/ml / DO]: se realizaron diluciones seriadas y plaqueo en LB-agar (SIN antibióticos) para determinar ufc/ml. Luego se calcularon las ufc/ml por unidad de densidad óptica.
- Analizar la distribución del plásmido pUCres en sus distintas formas: se trataron 4 µg de cada lisado total con EcoRV, para digerir el ADN cromosómico y linealizar el plásmido pBAD::tnpR, con el objeto de evitar que interfirieran en la detección del HMW del plásmido reportero. Luego se separó el ADN (2µg ADN total digerido en cada calle) en un gel de agarosa y se transfirió a una membrana de nylon. Se realizó una hibridación con una sonda específica para el plásmido reportero pUCres y se reveló por quimioluminiscencia.

tomando muestras a partir de las 11 horas de cultivo.

1.2.2 Cinética de acumulación de HMW durante la fase estacionaria.

Se repitió el mismo tipo de experimento detallado en la sección anterior, con la diferencia que se comenzó a tomar muestras a partir de las 11 horas de cultivo, una vez que las células habían dejado de dividirse. Se tomaron muestras durante las primeras 10 horas de la fase estacionaria [FE] para medir densidad óptica [DO], analizar la distribución del plásmido pUCres en sus distintas formas y estimar la viabilidad del cultivo.

En la Figura 44 queda en evidencia que, al cultivar la cepa MB1026 en un medio rico suplementado con glucosa 0,2% [LB glu], condición en la cual está

reprimida la expresión de TnpR, se generan y acumulan multímeros HMW del plásmido pUCres entre las 11 y las 20 horas de cultivo, ya dentro de la fase estacionaria. El aumento en la proporción de HMW se correlaciona con una disminución de la viabilidad del cultivo. Si se prosigue analizando las formas del plásmido pUCres en los días sucesivos, la proporción de multímeros no continúa incrementando (datos no mostrados), de manera que la acumulación de HMW parece ser un fenómeno que se desarrolla durante las primeras horas de la fase estacionaria.

Por el contrario, después del crecimiento en [LB arabinosa], condición en la cual se induce la expresión de TnpR, no se registra un aumento neto en la proporción de HMW durante la FE y la viabilidad del cultivo se mantiene constante.

Se ha reportado que *E. coli* experimenta un pico de actividad replicativa al entrar en FE luego de un 'up-shift' nutricional de medio mínimo a caldo LB. Dicha actividad replicativa es transiente, depende de RecA y se ha clasificado como un caso especial de cSDR (replicación estable del ADN, constitutiva) que se da en un contexto salvaje al entrar en la FE después de que las células han sido sometidas a un cambio sustancial en las condiciones nutricionales (transferencia de MM a LB; Hong X. et al. 1996). Se consideró la posibilidad de que las células *recBC sbcBC* experimentaran algún tipo de 'replicación estable del ADN' (SDR) al entrar en fase estacionaria, que diera como resultado la replicación desregulada e indiscriminada tanto del plásmido como del genoma bacteriano. Para descartar esta posibilidad se analizó la actividad replicativa de las cepas MB1026 y JC7623 al entrar en FE.

1.2.3. Evidencias de actividad replicativa durante la fase estacionaria [FE]

Se analizó la actividad replicativa de las cepas MB1026 y JC7623, al entrar en FE después de 9 horas de crecimiento en [LB glucosa]. La cepa MB1026 [JC7623 / *pUCres pBADtnpR*] fue cultivada en LB_{CmAp} glucosa 0,2%, condición en la que se observa máxima acumulación de HMW del plásmido *pUCres* durante la FE. Como control se analizó la cepa JC7623 cultivada en LB glucosa 0,2%. A partir de las 9 horas de cultivo, se tomaron muestras a distintos tiempos para medir DO, analizar las formas del plásmido *pUCres* y estimar la actividad replicativa en cada punto, midiendo incorporación de [³H]-timidina al material precipitable con ácido.

Al analizar la cepa MB1026, se observa un pico de incorporación de [³H]-timidina que se correlaciona en el tiempo con el incremento en la proporción de HMW del plásmido *pUCres* [Figura 45]. Por otro lado la cepa control JC7623 (sin plásmidos) presenta una activi-

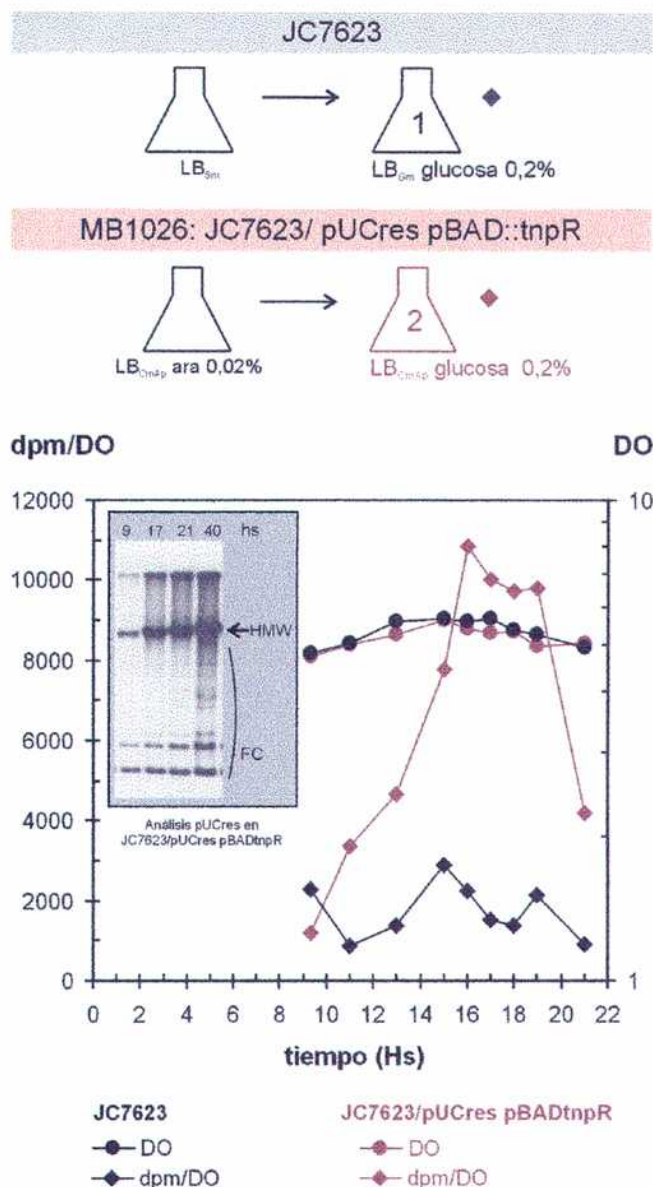


Figura 45: Actividad replicativa y análisis por southern del plásmido *pUCres*:

Para estimar la actividad replicativa a distintos tiempos, se sometió una alícuota de 500 µl del cultivo a un pulso de [³H]-timidina de 10 µCi/ml [82 Ci/mmol] en un baño termostatzado durante 15 minutos. Luego, 100 µl de estas células fueron diluidas en 4 ml de TCA 5%. Finalmente se determinó la [³H]-timidina incorporada al material precipitable en ácido en un contador de centelleo. Para más detalles metodológicos referirse a sección 2.6 de Mat. y Métodos. Se han graficado las curvas de DO y las curvas de dpm/DO para cada cepa. En la figura incorporada dentro del gráfico, se incluyó el análisis por southern blot del plásmido *pUCres* en la cepa MB1026.

dad replicativa basal, aproximadamente 10 veces menor a la registrada para la cepa MB1026. Este nivel de actividad replicativa resulta coherente con una actividad de reparación y mantenimiento del ADN cromosómico, esperable para células que se no están en crecimiento [Foster P-L. 1999, Bridges B.A. 1997, Tang et al. 1979, Bridges B.A. & Ereira S. 1998]. Este

resultado implica que la actividad de síntesis de ADN observada para la cepa MB1026 en [LB glu], durante la fase estacionaria, no se debe a una exacerbada actividad replicativa de fase estacionaria inherente al contexto genético, sino que está disparada por la presencia de los plásmidos. Se descarta la posibilidad de que la generación de HMW sea el resultado de un fenómeno de 'replicación estable del ADN' [SDR] que se dispare en el contexto *recBC sbcBC* al entrar en FE.

Estos resultados confirman que después del crecimiento en [LB glu], el HMW se genera por replicación *de novo* del plásmido, durante las primeras horas de la fase estacionaria. Las referencias existentes en la bibliografía sobre replicación en bacterias que no se encuentran en activa división, están relacionadas con la replicación de plásmidos en células limitadas en aminoácidos [Wróbel B. & G. Wegrzyn, 1998] y también con el fenómeno de amplificación adaptativa [Hastings P.J. et al. 2000].

Utilizando el sistema de complementación [pUCres pBADtnpR] se ha comprobado que cuando las células *recBC sbcBC* alcanzan la FE, después del crecimiento en condiciones que reprimen la expresión de la resolvasa TnpR, se dispara una actividad replicativa transiente que se prolonga durante 10 horas y resulta en un incremento en la proporción de HMW del plásmido reporter pUCres. ¿Qué ocurre después del crecimiento en una condición que induce la expresión de la resolvasa? Se ha comprobado que, en tal condición, no aumenta la proporción de HMW durante la FE. La presencia del sistema de resolución activo podría lograr esto evitando que se dispare la actividad replicativa de FE o simplemente asegurando que la replicación del plásmido se atenga a los controles normales de inicio de la replicación, al garantizar que los multímeros que puedan generarse sean resueltos en monómeros. Si el sistema *res-TnpR* logra evitar que se dispare la actividad replica-

tiva de FE, sería una evidencia de que los multímeros circulares son intermediarios necesarios en la generación de HMW.

1.2.4. ¿ Un sistema de resolución activo evita que se dispare la actividad replicativa de FE ?

Con el objeto de averiguar si un sistema de resolución activo evita que se dispare la actividad replicativa de FE se analizó la cepa MB1026 [JC7623/pUCres pBADtnpR] en tres condiciones de cultivo: [LB], [LB glu] y [LB ara]. Se incluyó como control la cepa JC7623, sin plásmidos, cultivada en [LB glu]. Ver esquema del experimento en la Figura 46.

[LB ara] vs [LB]

Si bien después del crecimiento en [LB Ara], no se observa un incremento importante en la proporción de HMW del plásmido pUCres, se registra un pico de incorporación de [³H]-timidina equivalente al registrado después del crecimiento en [LB], condición en la cual la acumulación de HMW es mayor [Figura 47 A y B]. Cabe recordar, que el plásmido pBADtnpR, utilizado para complementar *en trans* TnpR, carece de sitios y por lo tanto acumula HMW en este contexto genético. De hecho hemos comprobado que el plásmido pBADtnpR acumula HMW independientemente de que el medio sea suplementado con glucosa o arabinosa (datos no mostrados). Por lo tanto, la actividad replicativa de FE, registrada en la condición [LB Ara], podría deberse a generación de HMW por parte del plásmido pBADtnpR.

Se deduce que no es posible contestar el interrogante planteado utilizando este modelo de trabajo.

[LB glu] vs [LB]: 'efecto glucosa'

Después del crecimiento en [LB Glu] se registra un pico de incorporación de [³H]-timidina varias veces superior al observado después del crecimiento en [LB] y se observa una mayor acumulación de HMW del plásmido pUCres [Figuras 47A y B]. Para explicar estas diferencias, se podría especular que en [LB]

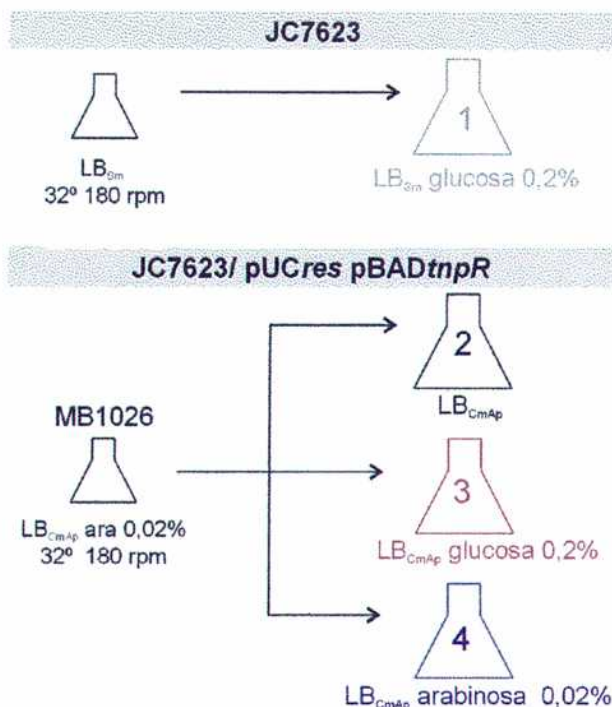


Figura 46: Esquema del experimento.

La cepa control JC7623 fue cultivada durante 24 hs en LB_{sm} y luego fue diluida 1000 veces en LB_{sm} glucosa 0,2% [DOI 0,2]. La cepa MB1026 [JC7623/pUCres pBADtnpR] fue cultivada en LB_{ApCm} arabinosa 0,02% durante 24 hs. Este cultivo fue utilizado para inocular cultivos conteniendo LB_{ApCm}, LB_{ApCm} glucosa 0,2% o LB_{ApCm} arabinosa 0,02% [DOI 0,2%], que fueron incubados en un baño con agitación (180 rpm) a 32°C.

Transcurridas 9 horas de cultivo se tomaron muestras para: medir DO a 600nm y analizar actividad replicativa, a cada hora [ver Figura 47A]; analizar el plásmido pUCres, cada 3 horas [ver Figura 47B]; y analizar expresión de TnpR por western blot, a las 9 y 21 hs de cultivo [ver Figura 47C].

hay mayor escape de TnpR que en la condición [LB Glu]. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada al comprobar en un western-blot, que en las dos condiciones existe un mínimo escape [ver Figura 47 C]. Por lo tanto, la presencia de glucosa en el medio parece ejercer algún efecto que exagera la replicación y la consecuente acumulación de los multímeros en FE.

En relación a este tema, se ha observado que, si bien en [LB] las células también acumulan HMW, la viabilidad del cultivo en [LB] es 10 veces superior a la observada en [LB glu] (ver Tabla 3). Este sería otro indicio de que la presencia de glucosa en el medio ejerce un efecto adicional al de reprimir, vía 'represión catabólica', la expresión de TnpR a partir del promotor P_{BAD}. Incluso la cepa JC7623 conteniendo el plásmido pUCres y el vector pBAD33, que acumula HMW

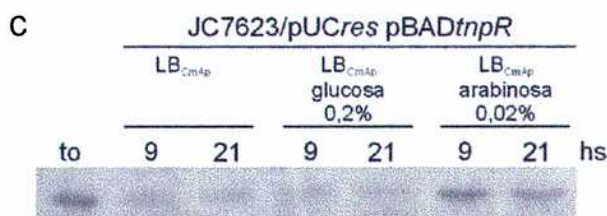
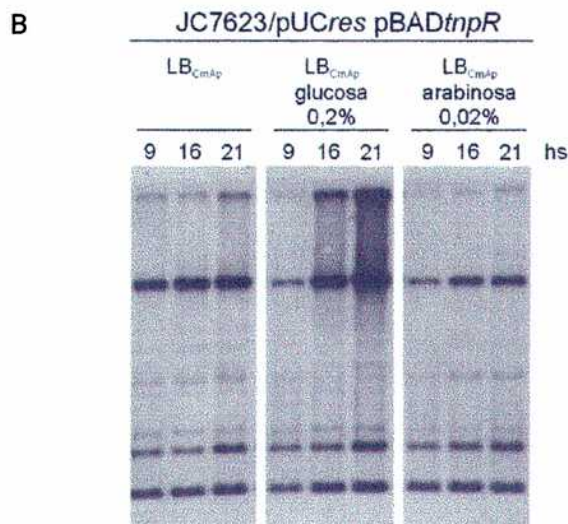
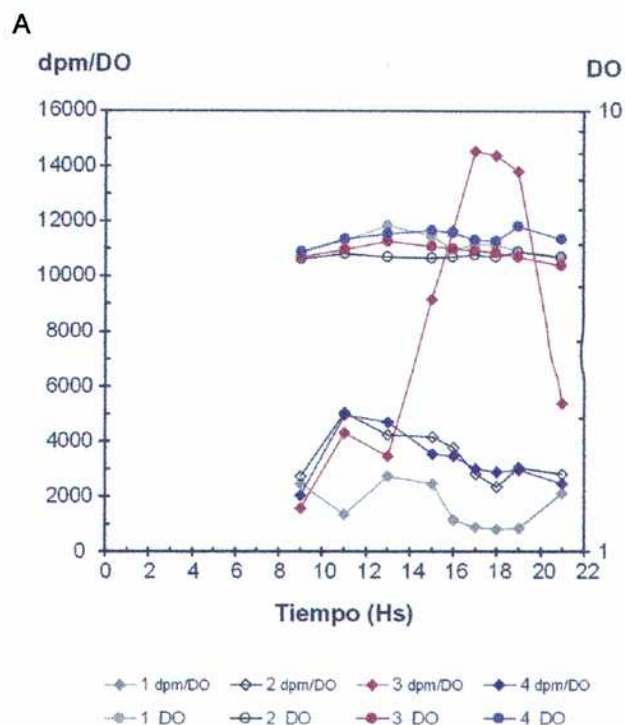


Figura 47: MB1026 en LB, LBglu y LBara.

[A] Curvas de DO e incorporación de [³H]-timidina (en dpm/DO).

[B] Análisis plásmido pUCres por southern (sonda Ap299)

[C] Detección de TnpR por western-blot

JC7623 /	LB _{ApCm}	LB _{ApCm} glucosa 0,2%	LB _{ApCm} arabinosa 0,02%
pUCres pBADtnpR	$2,9 \cdot 10^8 (\pm 6,3 \cdot 10^7)$	$1,2 \cdot 10^7 (\pm 6,1 \cdot 10^6)$	$2,6 \cdot 10^8 (\pm 5,9 \cdot 10^7)$
pUCres pBAD33	$1,3 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8$

Tabla 3: Viabilidad de JC7623/pUCres pBADtnpR en las distintas condiciones de cultivo

Para la cepa JC7623/pUCres pBADtnpR se presentan los datos de viabilidad [en cfu/ml por unidad de DO] en cada condición de cultivo, promediados a partir de 7 experimentos independientes. Los valores entre paréntesis indican el error considerando un intervalo de confianza del 95%. En cada uno de los experimentos, se realizaron diluciones seriadas del cultivo de 24 horas en las condiciones indicadas y plaqueo en placas de LB-agar para estimar los recuentos totales (en ufc/ml). Luego se refirió el valor de ufc/ml a la DO del cultivo.

del plásmido pUCres tanto en [LB] como en [LB glu], también presenta una viabilidad 10 veces menor en [LB glu] que en [LB].

El sistema de complementación [pUCres pBADtnpR] nos permitió demostrar que en ausencia de TnpR, en el contexto *recBC sbcBC* se dispara una actividad replicativa durante las primeras horas de la FE que resulta en la síntesis y acumulación de multímeros HMW del plásmido pUCres en células en 'estasis' (que no están en activo crecimiento). Sin embargo, la presencia de dos plásmidos en la célula y el hecho de que pBADtnpR carezca de sitio *res* y acumule HMW, complica la interpretación de la cinética de incorporación de [³H]-timidina en [LB ara]. Por otro lado, existen varios indicios de que la suplementación del medio con glucosa afecta de por sí la formación de HMW, planteando la posibilidad que los resultados descriptos hasta el momento sean un artefacto del modelo de trabajo.

1.3. Cinética de acumulación de HMW de los plásmidos pUCres y pUCrestnpR

1.3.1. Efecto glucosa

Con el objetivo de confirmar los resultados descriptos con el modelo de complementación pUCres/pBADtnpR y discernir si la suplementación del caldo LB con glucosa amplificaba la actividad replicativa de FE, se decidió volver a trabajar sobre los plásmidos pUCres y pUCres-tnpR. El plásmido pUCres ha sido descripto previamente. El plásmido

pUCrestnpR es un derivado de pUC19 en el que se insertó una región del transposón $\gamma\delta$ que abarca tanto el sitio *res* como el gen *tnpR* y por lo tanto cuenta con un sistema de resolución completo y funcional. Este plásmido expresa TnpR bajo control del promotor original del gen *tnpR*, incluido dentro del mismo sitio *res*. La transcripción a partir de P_{tnpR} se encuentra sometida a regulación negativa por su propio producto, la proteína TnpR.

Se analizaron las cepas MB1042 y MB1119, respecto del control [cepa JC7623 sin plásmido] en dos condiciones LB_{Ap} y LB_{Ap} glucosa 0,2% [ver esquema, Figura 48]. Se analizó la actividad replicativa y la acumulación de multímeros HMW de cada plásmido, durante la fase estacionaria.

Tanto en [LB] como en [LB glu], la cepa control JC7623 presenta un nivel basal de incorporación de [³H]-timidina durante la fase estacionaria [Figura 49A, curvas en negro].

En cuanto a la cepa MB1042 [JC7623 / pUC::res], en la Figura 49C puede observarse que el plásmido pUCres acumula una alta proporción de HMW en las dos condiciones de cultivo evaluadas. En la condición [LB], a las 9 horas de cultivo ya se alcanzó la máxima proporción de HMW para esta condición de crecimiento. Entre las 9 y las 11 horas de cultivo los valores de incorporación de [³H]-timidina, sólo alcanzan a duplicar los obtenidos para el control y luego decaen a los niveles de éste [Figura 49A].

Por otro lado, en la condición [LB glu], a las 9 horas de cultivo la proporción de multímeros HMW del plásmido apenas supera el 50% [Figura 49C]. A par-

tir de las 9 horas se registra un aumento en la proporción de HMW, que se correlaciona con un pico de incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina [aproximadamente 7 veces la incorporación registrada para la cepa control en idénticas condiciones de cultivo] [Figura 49A]; un comportamiento similar al observado para el sistema de complementación pUCres/pBADtnpR después del crecimiento en [LB glu]. Por lo tanto, se convalidan los resultados obtenidos con tal sistema en la condición [LB glu].

Tanto los southern como los datos de incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina, parecen indicar que en [LB] la replicación que da como resultado la acumulación de multímeros HMW del plásmido pUCres, es de menor magnitud y se da más temprano que en la condición [LB glu]. Por otro lado, se corroboró que la presencia de glucosa en el medio afecta de por sí la magnitud de la actividad replicativa registrada durante la FE, así como la cinética de acumulación de HMW de un plásmido que carece de sistema de resolución.

Al analizar la cepa MB1119 [JC7623 / pUC::res tnpR], se observa que en la condición [LB] los datos de incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina son equivalentes a los del control [Fig. 49B] y el porcentaje de HMW del plásmido pUCrestnpR se mantiene inferior al 20% [Fig. 49D]. Se deduce que en la condición [LB], la presencia de un sistema de resolución sitio-específico en el plásmido evita que el mismo se involucre en un proceso de replicación que genere multímeros. En esta condición, mantener el plásmido como monómero circular asegura que no se genere HMW.

Sin embargo, en la condición [LB glu] la suplementación del medio con glucosa resulta en cierta actividad replicativa de FE, que si bien es menor a la observada para el plásmido pUCres en la misma condición, es significativamente mayor que la registrada para el control [Fig. 49B]. Esta actividad replicativa de FE resulta en acumulación de un 50% de las formas del plásmido pUCrestnpR como HMW [Fig. 49D]. Al

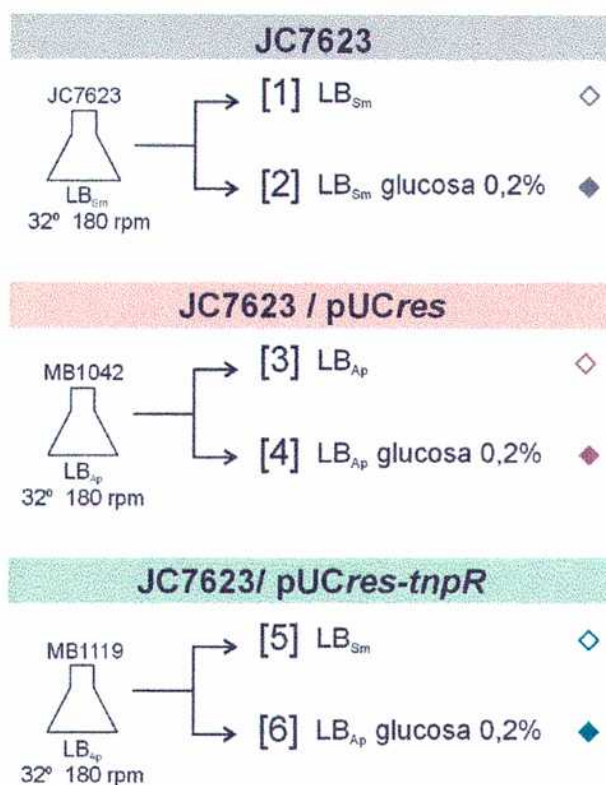


Figura 48: Esquema del experimento

La cepa control JC7623 fue cultivada durante 24 hs en LB_{Sm} y luego fue diluida 1000 veces en LB_{Sm} glucosa 0,2% [DOi 0,2]. Las cepas MB1042 [JC7623/pUCres] y MB1119 [JC7623/pUCrestnpR] fueron cultivadas en LB_{ApCm} arabinosa 0,02% durante 24 hs. Estos cultivos se utilizaron para inocular erlenmeyers conteniendo LB_{ApCm}, o LB_{ApCm} glucosa 0,2% [DOi 0,2], que fueron incubados a 32°C en un baño con agitación (180 rpm). Transcurridas 9 horas de cultivo se comenzó a tomar muestras para medir DO a 600nm [cada hora], analizar actividad replicativa [cada hora] y analizar el plásmido pUCres [cada 3 horas] por southern e hibridación con la sonda Ap299. Los resultados se presentan en la Figura 49.

comparar con JC7623/pUCres en las mismas condiciones de cultivo, es evidente que JC7623/pUCrestnpR experimenta una actividad replicativa en FE de menor magnitud y acumula menor proporción de HMW (en ningún momento se alcanza un porcentaje de HMW superior al 50%). Por lo tanto, en la condición [LB Glu], el poseer un sistema de recombinación específico-de-sitio activo solo le permite al plásmido controlar parcialmente la replicación que genera multímeros HMW durante la FE.

En síntesis, en la condición [LB] un sistema de resolución activo permite evitar que el plásmido acumule HMW. Por otro lado, en la condición [LB glu] el sistema res-TnpR solo logra reducir la replicación de FE y la acumulación de HMW.

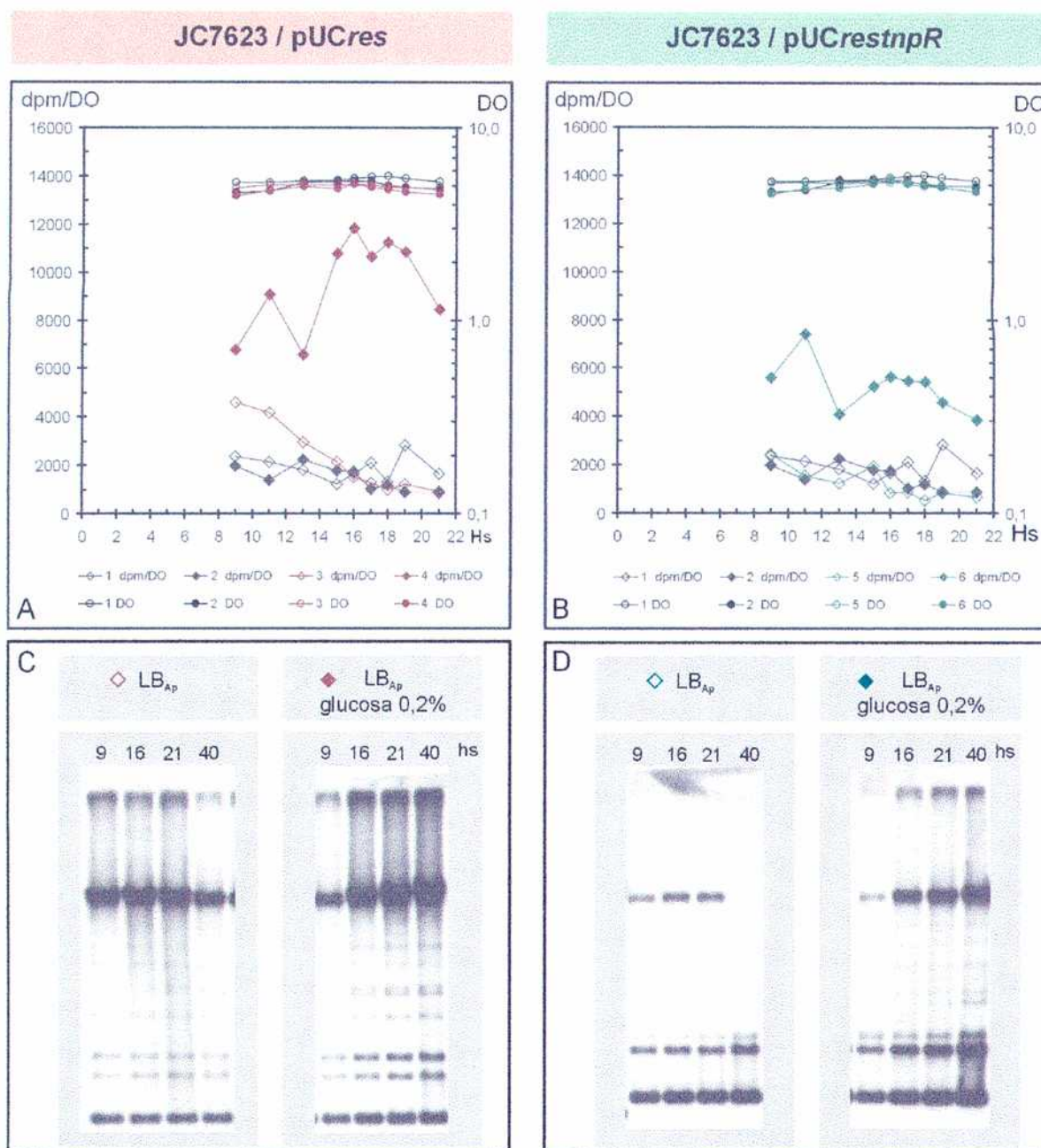


Figura 49: Actividad replicativa de FE y acumulación de HMW. Siguiendo el esquema de la Figura 48, se realizaron cultivos a 32°C en baño con agitación (180 rpm). A partir de las 9 horas de cultivo, se tomaron muestras para medir DO (600nm), estimar actividad replicativa midiendo incorporación de [3 H]-timidina y analizar acumulación de HMW por southern.

[A y B]: Curvas de DO e Incorporación de [3 H]-timidina (en dpm/DO). [D y E]: Análisis de los plásmidos pUCres y pUCrestnpR por southern. Se trataron los lisados totales con EcoRV, que no digiere los plásmidos pero sí el cromosómico, para evitar que éste interfiriera con la detección del HMW. Se utilizó una sonda específica para el plásmido [Ap299].

La suplementación del medio con glucosa retrasa la amplificación hasta haberse establecido la FE, mientras que en [LB], a las 9 horas de cultivo ya se produjo la máxima amplificación alcanzable en esta condición.

A fin de intentar visualizar la cinética de acumulación de HMW en la condición [LB], se repitió el mismo

tipo de experimento, con la diferencia que se comenzó a tomar muestras a partir de las 5 horas de cultivo, tal como se detalla en la siguiente sección, al pie de la Figura 50.

1.3.2. ¿Cuál es la cinética en LB?

Se analizaron las cepas MB1042 y MB1119, respecto del control [cepa JC7623 sin plásmido] en dos condiciones LB_{Ap} y LB_{Ap} glucosa 0,2%, siguiendo un esquema idéntico al del experimento anterior, con la diferencia de que se comenzó a tomar muestras a partir de las 5 horas de cultivo. Además de analizar la actividad replicativa y la acumulación de HMW, se analizó la cinética de amplificación de cada plásmido.

Para estimar el nivel de amplificación de cada plásmido respecto del ADN genómico, se trataron las preparaciones de ADN total con una enzima de restricción que posee un único sitio de corte en el plásmido y la hibridación se realizó con dos sondas: una sonda específica para el plásmido y una segunda sonda específica para un gen cromosómico (que da una única señal con un fragmento cromosómico, al digerir el ADN con dicha enzima de restricción). Dado que las dos sondas tienen actividades específicas diferentes y desconocidas, no es posible determinar el número de copias del plásmido por equivalente genómico. La relación de intensidades plásmido/cromosómico se expresa en unidades arbitrarias, sin embargo puede utilizarse para comparar el nivel de amplificación de un mismo plásmido en las dos condiciones de cultivo o en una determinada condición a lo largo de un lapso de tiempo [cinética de amplificación del plásmido respecto del ADN genómico]. Asimismo, puede utilizarse para comparar los dos plásmidos en una misma condición de cultivo, con el propósito de evaluar el efecto del sistema de resolución en el nivel de amplificación alcanzado por el plásmido en una condición dada.

En las imágenes incluidas en las secciones E y F de la Figura 50, se incluyó la relación de intensidades plásmido/cromosómico [Ip/Icr] bajo cada calle. Estos datos también han sido volcados en la Figura 51B, para representar la cinética de amplificación de cada plásmido en una condición dada de crecimiento.

Condición [LB]

Al evaluar los resultados correspondientes a la condición [LB], se observa que durante la transición hacia la FE a partir de las 6 horas de cultivo, la cepa JC7623/pUCres registra una actividad replicativa ligeramente superior a la del control. Sin embargo, esto no se traduce en un incremento evidente en la proporción de HMW ni en el nivel de amplificación del plásmido respecto del cromosómico. La generación de HMW parece darse con anterioridad, posiblemente a lo largo de la fase exponencial y la proporción de HMW, así como el nivel de amplificación alcanzado, son menores a los registrados en la condición [LB Glu]. Esto queda en evidencia al comparar las muestras correspondientes a las 31 horas de cultivo del plásmido pUCres en [LB] y [LB Glu] (comparar secciones C/D y E/F de la Figura 50).

Por otro lado, si se compara el plásmido pUCres con el plásmido pUCrestnpR en la misma condición, el nivel de amplificación alcanzado es de dos veces el de éste (comparar southern de la sección E); indicando que en la condición [LB] la ausencia de un sistema de resolución se traduce en una mayor amplificación del plásmido. De hecho, en esta condición la cepa JC7623/pUCrestnpR presenta una actividad de síntesis de ADN indistinguible de la del control y no acumula HMW [Figura 50 A y C].

Condición [LB glu]

En la condición [LB Glu], la cepa JC7623/pUCres comienza a aumentar la proporción de HMW a partir de las 9 horas de cultivo. La generación de HMW se traduce en un incremento progresivo en el nivel de amplificación del plásmido [Figura 51D y F].

En el caso de JC7623/pUCrestnpR, en [LB glu] la cinética de incorporación de ³H-timidina se diferencia de la del control a partir de las 6 horas de cultivo [Figura 50B]. A partir de las 9 horas de cultivo la actividad replicativa de FE se ve reflejada en la generación de HMW [Fig. 50D] y un incremento en el nivel

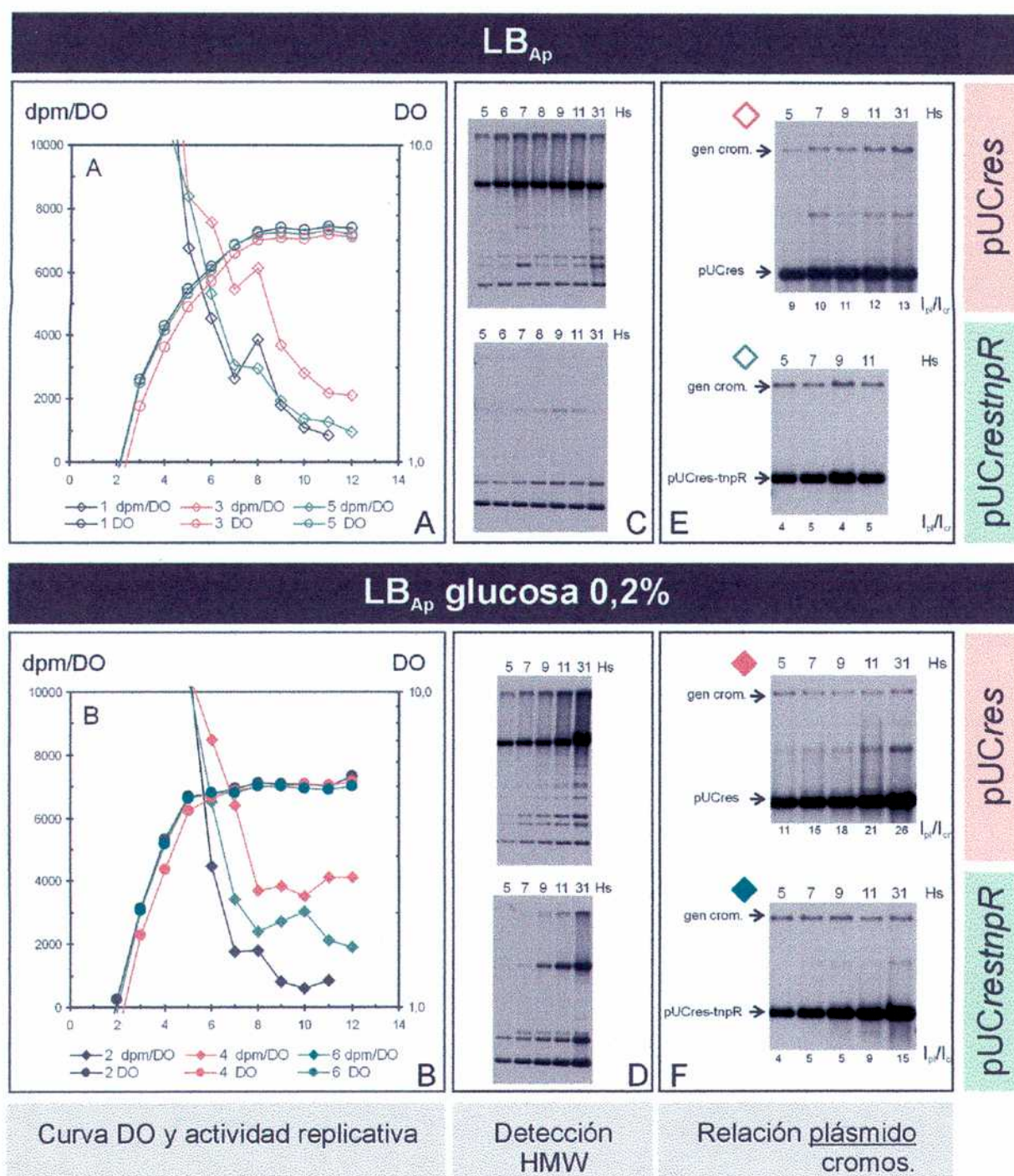


Figura 50: pUCres y pUCrestnpR durante la transición hacia FE
[A y B] Curvas de DO e incorporación de [³H]-timidina.

[C y D] Detección de HMW: tratamiento del lisado total con EcoRV y revelado con sonda específica para el plásmido [Ap299].

[E y F] Nivel de amplificación del plásmido estimado en función de la relación de intensidades plásmido/cromosómico: tratamiento de los lisados con HindIII y revelado con una sonda específica para el plásmido [Ap299] + una sonda específica para un gen cromosómico [priA]. En estos gráficos se incluyó la relación de intensidades plásmido/cromosómico [I_{pl} / I_{cr}] bajo cada calle.

	condición	
	LB	LB glu
JC7623	[1]	[2]
MB1042: JC7623 / pUC::res	[3]	[4]
MB1119: JC7623 / pUC::res-tnpR	[5]	[6]

de amplificación del plásmido [Fig. 50F].

En resumen, al analizar la cepa JC7623 conteniendo un único plásmido que exprese o no un siste-

ma de resolución, se confirmó que el fenómeno de replicación en FE se verifica después del crecimiento en [LB glucosa]. Hasta este punto no se puede discer-

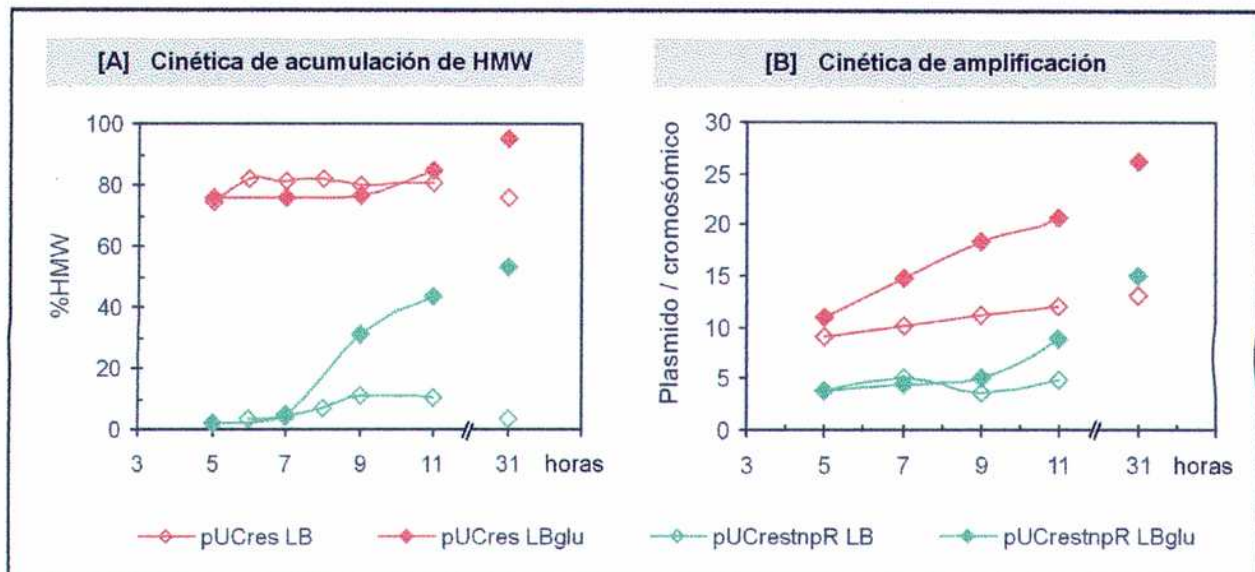


Figura 51: Cinética de acumulación de HMW y de amplificación de los plásmidos pUCres y pUCrestnpR a lo largo del experimento. Se ha graficado los datos de %HMW y la relación de intensidades plásmido/cromosómico para cada cepa en las dos condiciones de crecimiento. [A] Cinética de acumulación de HMW. [B] Cinética de amplificación del plásmido respecto del cromosómico.

nir si esto implica la existencia de mecanismos alternativos de generación de HMW que poseen distintas 'eficiencias' y/o parten de distintos sustratos; o si el crecimiento en presencia de glucosa afecta la actividad metabólica celular al entrar en FE de manera tal de generar mayor cantidad de intermediarios del plásmido con tendencia a involucrarse en síntesis de HMW.

La presencia de un sistema de resolución activo evita que, durante el crecimiento en [LB], se dispare la replicación alternativa del plásmido que genera acumulación de HMW. Sin embargo, después del crecimiento en [LB glu], se detecta cierta actividad replicativa de FE, que lleva a la acumulación del 50% del plásmido *pUCrestnpR* como HMW. De manera que, un sistema de resolución activo puede prevenir la replicación desregulada del plásmido y consecuentemente la acumulación de multímeros durante el crecimiento en [LB]; pero solo puede reducir estos fenómenos después del crecimiento en [LB glu]. Este sería un indicio de que los multímeros circulares son un intermediario esencial para la generación de HMW únicamente en [LB].

La incapacidad de *res-TnpR* de controlar la formación de HMW en [LB Glu] podría responder a diversos

factores: dado que en [LB Glu] se registra mayor actividad replicativa de FE, podría ocurrir que la expresión de *TnpR* a partir de su propio promotor no alcance para catalizar la resolución de los multímeros que se generan. Esta posibilidad ha sido descartada, ya que la complementación del plásmido pUCres con el plásmido *pACYCtnpR* que expresa altos niveles de *TnpR* constitutivamente, tampoco logra evitar que pUCres acumule cierta proporción de HMW después del crecimiento en [LB glu].

Una segunda posibilidad es que dado que en [LB glu] la replicación que da como resultado la generación de HMW se dispara más tardíamente, la degradación de *TnpR* durante la FE disminuya la cantidad de *TnpR* disponible al momento de la generación de los multímeros. Esto parece poco probable, ya que por western-blot se detectan cantidades importantes de *TnpR* aún después de transcurridas 36 horas de cultivo.

Una tercera posibilidad es que, al progresar la fase estacionaria, la topología del sustrato se modifique de manera tal de volverse inadecuado para que *TnpR* lo resuelva. Se sabe que durante la transición hacia la FE, se va modificando el grado de superenrollamiento, y esto podría afectar la eficiencia de resolución del

sistema *res-TnpR*.

Por último, cabe considerar que en la condición [LB glu] exista un mecanismo de generación de multímeros alternativo que sea insensible a la acción de *res-TnpR*. Tal mecanismo no requeriría de la participación de multímeros circulares como sustratos necesarios para la generación de HMW. Por lo tanto, el sistema de resolución no podría evitar la formación de HMW por dicho mecanismo. Este caso se discute en más detalle al analizar los requerimientos genéticos, que probaron ser diferentes para las dos condiciones de cultivo.

Si el HMW fuera un sustrato adecuado para el sistema de resolución y el efecto de *res-TnpR* consistiera en resolver esos multímeros en multímeros de menor tamaño y monómeros circulares, se esperaría el mismo nivel de amplificación independientemente de que el plásmido expresara o no un sistema de resolución. En otras palabras, si en presencia de un sistema de resolución activo, el HMW se sintetizara de todas maneras pero luego o paralelamente fuera convertido en multímeros de menor tamaño y monómeros por el sistema de resolución, sería de esperar que la relación *lpl/lcr* para pUCres y pUCres*tnpR* fuera la misma.

Este no fue el caso. El plásmido pUCres, carente del sistema de resolución, alcanzó un mayor nivel de amplificación que pUCres*tnpR* en las dos condiciones de cultivo [Figura 51B]. Aparentemente *res-TnpR* solo puede resolver las multímeros circulares generados por recombinación homóloga en monómeros y esta disminución en la cantidad de multímeros circulares logra prevenir o al menos reducir, según la condición de cultivo, la replicación alternativa de FE que lleva a la acumulación de HMW. Los multímeros circulares parecen ser intermediarios importantes en la generación de HMW, principalmente en la condición LB.

1.3.3 Subcultivos sucesivos en LB no logran erradicar el HMW por segregación.

Dado que cultivando la cepa JC7623/pUCres en [LB], fue imposible precisar la cinética de amplificación del plásmido ya sea durante la fase estacionaria o en la etapa de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria, se analizó si era factible inducir la pérdida de HMW por segregación mediante subcultivos sucesivos en LB. Durante el crecimiento exponencial, resultaría prácticamente imposible repartir equitativamente, las múltiples copias de plásmido que conforman el HMW, entre las células hijas, al momento de la división celular y esto redundaría en pérdida del HMW por segregación. Por lo tanto, si las células en activo crecimiento no pueden sintetizar HMW y se mantiene el cultivo en fase exponencial por más de ocho generaciones, el HMW debería perderse por segregación, resultando en una disminución importante en la proporción de HMW. Esta hipótesis se verificaría únicamente en caso de que las células en crecimiento fueran incapaces de sintetizar HMW para compensar la pérdida por segregación.

Con el objeto de desafiar esta hipótesis, se cultivó la cepa JC7623/pUCres en LB_{Ap} en un baño con agitación durante la noche. Al día siguiente se diluyó el cultivo 15 veces en medio LB_{Ap} fresco, y se incubó en las mismas condiciones. Se tomaron muestras a cada hora para medir la densidad óptica del cultivo y se realizaron subcultivos sucesivos cada tres horas, siguiendo el mismo procedimiento. Al final de cada subcultivo se tomó una muestra para analizar el plásmido por southern.

En la Figura 52 se puede observar que aún después de cuatro subcultivos (y transcurridas más de 15 generaciones) se mantiene una alta proporción de HMW. Por lo tanto las células creciendo en [LB] parecen tener la capacidad de generar HMW, si bien el nivel de amplificación que producen es significativamente menor al que se alcanza durante la FE

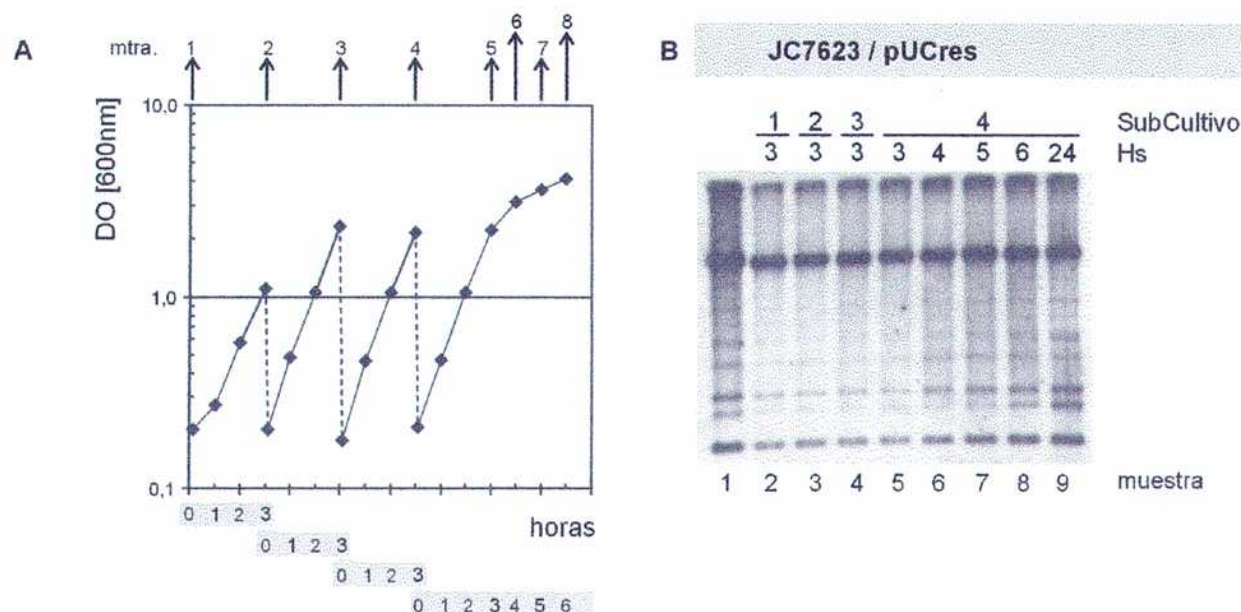


Figura 52: Durante el crecimiento en LB, la síntesis de HMW parece compensar la pérdida por segregación.

Se cultivó la cepa JC7623/pUCres en LB_{Ap} en un baño con agitación (180rpm) a 32°C durante la noche. Al día siguiente se diluyó este cultivo 15 veces en medio LB_{Ap} fresco, y se incubó en las mismas condiciones. Se tomaron muestras cada hora para medir la densidad óptica del cultivo. A las tres horas se tomó una muestra para analizar el plásmido y se volvió a diluir el cultivo en medio fresco precalentado a 32°C. Se realizaron subcultivos sucesivos cada tres horas siguiendo el mismo procedimiento. Al final de cada subcultivo se tomó una muestra para analizar el plásmido. Durante el cuarto subcultivo se tomaron muestras a las 3, 4, 5, 6 y 24 horas para analizar el plásmido. [A] Curvas de DO. Se indican con flechas los puntos en los que se tomó muestra para analizar el plásmido. [B] Southern para analizar las formas del plásmido pUCres en los sucesivos subcultivos. Se utilizó la sonda Ap299.

después del crecimiento en [LB glu]. Estas diferencias se podrían explicar en los siguientes términos: una vez alcanzada la fase estacionaria la célula ha dejado de dividirse y replicar su genoma, por ende el plásmido tendrá a su disposición la maquinaria replicativa y la célula acumulará todo el HMW que pueda generar. Por el contrario, durante la etapa de crecimiento parte de las células no recibirán HMW por la imposibilidad de repartir equitativamente los multímeros y la maquinaria de replicación estará involucrada en la replicación del genoma, restando recursos para la replicación descontrolada del plásmido.

1.3.4. Efecto glucosa y daño oxidativo

En las secciones 1.2.2. y 1.2.4., se reportó que el crecimiento de la cepa JC7623/pUCres pBADtnpR en [LB glu] resulta en una disminución paulatina de la viabilidad a medida que progresa la FE, alcanzándose una viabilidad 10 a 50 veces menor a la registrada en [LB]. El mismo efecto se verifica para la cepa

JC7623/pUCres [ver tabla 4]. La viabilidad de un cultivo de 24 horas en [LB glu] es 10 a 50 veces menor a la registrada para un cultivo en [LB].

Al analizar la viabilidad de la cepa control JC7623, carente de plásmidos después de 24 horas de crecimiento en [LB] o [LB glu], también se observan diferencias pero menos marcadas. La viabilidad del cultivo de 24 horas en [LB glu] es 4 veces menor a la registrada para un cultivo equivalente en [LB]. Por lo tanto, la presencia del plásmido parece exacerbar el efecto negativo que tiene el crecimiento en [LB glu] en la viabilidad del cultivo al entrar en FE.

Durante la transición hacia FE las células modifican su metabolismo para adaptarse a las condiciones de hambre y restringir la generación de especies reactivas de oxígeno [EROs]. El sistema de dos componentes ArcA / ArcB disminuye la producción de sustratos para la cadena respiratoria, reprimiendo la expresión de genes que codifican distintas enzimas del ciclo de Krebs y componentes de la cadena de

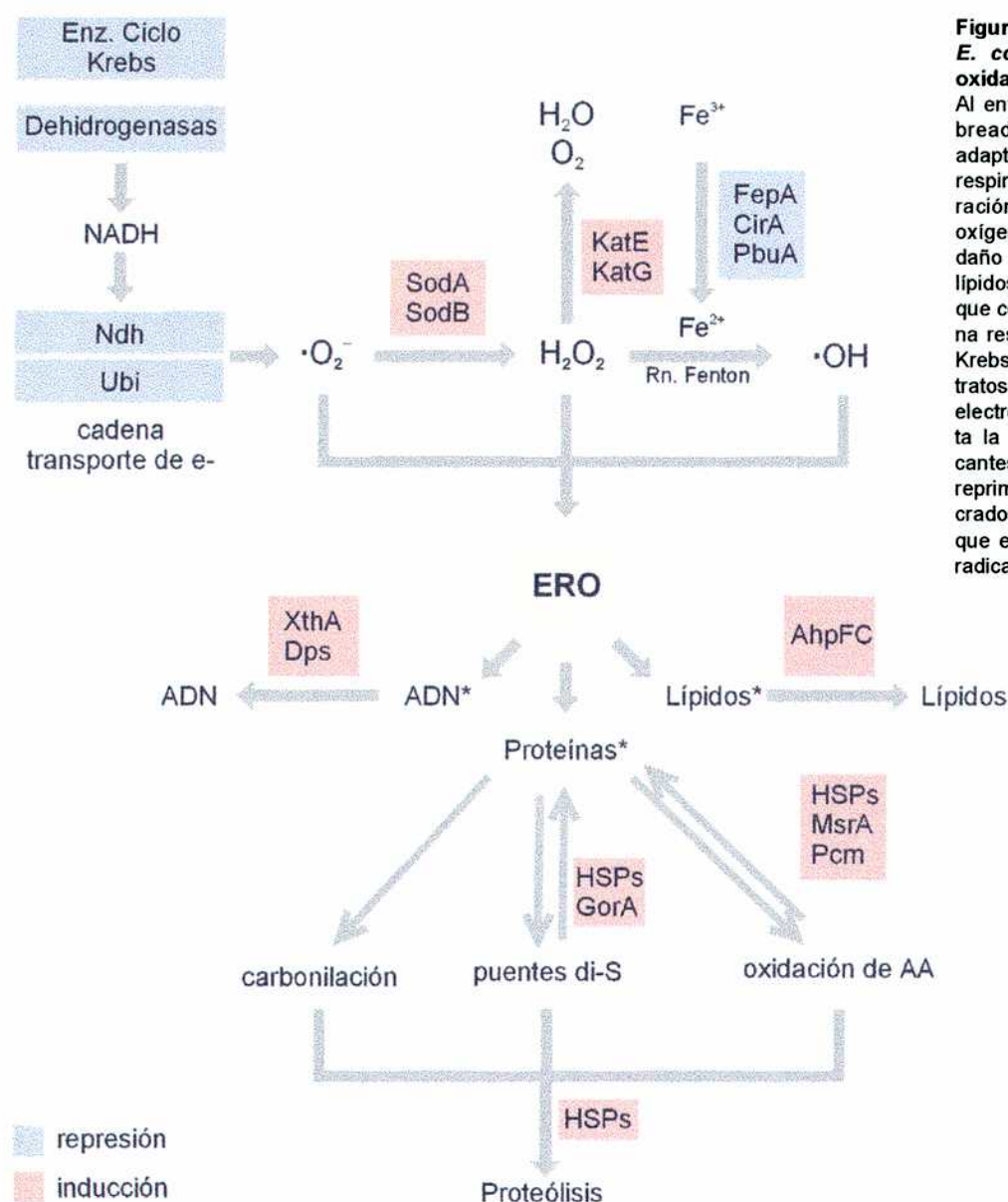


Figura 53: Estrategias utilizadas por *E. coli* para defenderse del daño oxidativo durante la FE.

Al enfrentarse a condiciones de hambre, parte de la estrategia de adaptación implica apagar la cadena respiratoria, para disminuir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que puedan causar daño oxidativo sobre las proteínas, los lípidos y el ADN. Se silencian genes que codifican componentes de la cadena respiratoria, y enzimas del ciclo de Krebs que contribuyen a generar sustratos para la cadena de transporte de electrones. Por otro lado, se incrementa la producción de enzimas detoxificantes, como la catalasa y la SOD y se reprime la expresión de genes involucrados en el transporte de hierro, ya que el Fe^{2+} favorece la generación de radicales hidroxilo por la reacción de Fenton. También se induce la expresión de proteínas que protegen y/o reparan macromoléculas oxidadas o favorecen la proteólisis de proteínas inactivadas (HSPs: heat-shock proteins).

Los * indican oxidación de las macromoléculas. Los recuadros rojos y azules, indican inducción y represión durante la FE. AhpFC: alquil-hidroperóxido reductasa; Dps: proteína de unión a ADN de FE; FepA, CirA y PbuA son proteínas de transporte de Fe de membrana externa; GorA: glutatión reductasa; Kat: catalasa; MsrA: péptido-metionina-sulfóxido reductasa; Ndh: NADH dehidrogenasa; Pcm: L-isoaspartil proteína metil-transferasa; Sod: superóxido dismutasa; Ubi: ubiquinona; XthA: exonucleasa III. Figura adaptada a partir de Nystrom T., 1999.

transporte de electrones. De esta manera, se minimiza la generación de especies reactivas de oxígeno, que pueden inactivar distintos componentes celulares esenciales por oxidación. Los regulones RpoS, SoxR y OxyR, inducen la expresión de enzimas detoxificantes, como la superóxido-dismutasa (sodA, sodB) y la catalasa (katG, katE) y silencian genes involucrados en el transporte de hierro, para evitar la generación de grupos hidroxilo reactivos por la reacción de Fenton, que requiere Fe^{2+} (genes fepA, cirA y pbuA). Por otro lado, vía los regulones RpoH, OxyR y RpoS, se incrementa la síntesis de proteínas involucradas en la reparación y la protección del ADN, las

proteínas y los lípidos celulares [ver Figura 53] (Nystrom T., 1999; Nystrom T. et al., 1996).

Una hipótesis para intentar explicar las diferencias de viabilidad registrada para cultivos de 24 horas en [LB] y [LB glu], sería suponer que después del crecimiento en [LB glu], durante la transición hacia la FE la bacteria posee un excedente de poder reductor que genera cierto escape de electrones de la cadena respiratoria hacia la producción de radicales peróxido, con potencial para generar daño oxidativo. El daño oxidativo sobre proteínas y lípidos celulares redundaría en una disminución de la viabilidad del cultivo, mientras que el daño oxidativo sobre el ADN incre-

cepa	viabilidad [ufc/ml / DO]	
	LB _(Ap)	LB _(Ap) glucosa 0,2%
JC7623	$1,2 \times 10^9 (\pm 3,2 \times 10^8)$	$2,7 \times 10^8 (\pm 8,7 \times 10^7)$
JC7623 / pUCres	$5,3 \times 10^8 (\pm 1,0 \times 10^8)$	$2,1 \times 10^7 (\pm 8,1 \times 10^6)^*$

Tabla 4: Viabilidad de las cepas JC7623 y JC7623/pUCres, después de 24 horas de crecimiento en LB y LB glu.

Se realizaron recuentos en placas de LB agar (Incubadas durante 24 horas a 32°C) y se calculó la viabilidad del cultivo refiriendo los valores de ufc/ml a la DO de cada cultivo. En el caso de JC7623 se presenta el promedio de tres experimentos independientes, y en el caso de JC7623/pUCres se han promediado cinco experimentos independientes. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

* El error es relativamente alto, dado que hay bastante diferencia en los valores de viabilidad en [LB glu] en los distintos ensayos (que van de 2×10^6 a 6×10^7 ufc/ml/DO). Sin embargo, en los cinco experimentos realizados la diferencia en viabilidad entre las dos condiciones es ≥ 1 log. En algunos experimentos la viabilidad en LB es 10 veces mayor y en otros hasta 50 veces mayor a la registrada en [LB glu].

cepa	crecimiento durante 24 horas en	viabilidad [ufc/ml / DO] calculada a partir de recuentos en placas de LB agar incubadas en	
		presencia de O ₂	anaerobiosis
JC7623	LB	$1,2 \times 10^9 (\pm 3,2 \times 10^8)$	-----
	LB glucosa 0,2%	$2,7 \times 10^8 (\pm 8,7 \times 10^7)$	$2,0 \times 10^8 (\pm 7,3 \times 10^7)$
JC7623 / pUCres	LB _{Ap}	$3,4 \times 10^8 (\pm 1,3 \times 10^8)$	$3,9 \times 10^8 (\pm 9,1 \times 10^7)$
	LB _{Ap} glucosa 0,2%	$2,2 \times 10^7 (\pm 5,4 \times 10^6)$	$3,2 \times 10^7 (\pm 7,1 \times 10^6)$

Tabla 5: La incubación de las placas de recuento en anaerobiosis no incrementa la eficiencia de plaqueo de la cepa JC7623/pUCres crecida en [LBglu].

Se incubaron las cepas JC7623 y JC7623/pUCres en LB y LB glucosa 0,2%, durante 24 horas a 32°C y se realizaron recuentos por duplicado de cada cultivo en placas de LB agar. Un juego de placas fue incubado en presencia de oxígeno y el otro se incubó en bolsas selladas conteniendo anaerocult® para generar anaerobiosis. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 32°C y luego se calculó la viabilidad del cultivo refiriendo los valores de ufc/ml obtenidos en cada condición a la DO de cada cultivo. Se presentan promedios de tres experimentos independientes. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

mentaría la generación de intermediarios de replicación dañados del plásmido que podrían involucrarse en replicación desregulada y generación de HMW.

Distintas cepas de *E. coli*, deficientes en funciones celulares relacionadas con la protección frente al daño oxidativo, presentan mayor supervivencia durante la FE si son incubadas en condiciones que restrinjan la disponibilidad de oxígeno; y exhiben recuentos totales significativamente mayores al incubar las placas de recuento en anaerobiosis (Touati D. et al., 1995; Moreau P.L. et al., 2001).

En un intento de relacionar la caída de viabilidad en [LB glu] con el daño oxidativo, se realizó una serie de experimentos en los cuales se cultivaron las cepas

JC7623 y JC7623/pUCres en [LB glu] durante 24 horas, se realizaron diluciones seriadas y dos juegos de recuentos en placas de LB agar. Uno de éstos, se incubó en anaerobiosis y el otro en presencia de oxígeno. En la tabla 5, se puede ver que la incubación de las placas en anaerobiosis no incrementó significativamente los recuentos.

Sin embargo, no puede descartarse que el daño se acumule durante el cultivo en medio líquido. En ese caso, la ausencia de oxígeno durante el crecimiento en la placa no podría revertir ese daño ni prevenir que al intentar reiniciar el crecimiento en la placa y comenzar a replicar el ADN dañado, se genere una serie de lesiones doble cadena que resulten letales para la célula.

JC7623/pUCres cultivada en LB _{Ap} glucosa 0,2%	viabilidad [ufc/ml / DO]	%HMW	nivel de amplif. plásmido / crom.
a 180 rpm	$2,2 \times 10^6$	≥ 90	+++++
estufa s/agitacion	$5,6 \times 10^7$	≤ 50	+

Tabla 6: Incubación de la cepa JC7623/pUCres en [LB glu], con y sin agitación.

La incubación en [LB glu] sin agitación, restaura parcialmente la viabilidad del cultivo, reduce la proporción de HMW acumulado y el nivel de amplificación del plásmido respecto del ADN cromosómico.

Cuando se cultivó la cepa JC7623/pUCres durante 24 horas en [LB glu] en estufa o en un baño con agitación (180 rpm), observamos que la distinta disponibilidad de oxígeno generaba diferencias en la viabilidad del cultivo, el nivel de amplificación del plásmido respecto del ADN cromosómico y el porcentaje de HMW acumulado.

Estos datos serían el único indicio indirecto que relaciona, en cierta medida, al oxígeno con el efecto tóxico de la glucosa [ver tabla 6]. Sería interesante analizar el efecto de inactivar genes involucrados en la prevención contra el daño oxidativo y la reparación de daño al ADN, para determinar si realmente existe una conexión.

1.4 Sinopsis

Se puso a punto un sistema de complementación basado en el sistema de resolución del transposón $\gamma\delta$, que permitió analizar la cinética de acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*. El sistema de complementación está integrado por un plásmido reporter conteniendo el sitio *res* y un segundo plásmido compatible que expresa TnpR en forma regulable (pBADtnpR). Se puede reprimir la expresión de TnpR, a partir de pBAD-tnpR, mediante el agregado de glucosa al medio de cultivo; o inducir su expresión mediante el agregado de arabinosa. El sistema [pUCres / pBADtnpR] permitió generar un cultivo conteniendo una mínima proporción de HMW del plásmido reporter, para luego estudiar la cinética de acumulación de estos multímeros en la condición de cultivo que anula el sistema de resolución.

Utilizando esta estrategia, se descubrió que las células *recBC sbcBC* creciendo en [LB glu] no generan y/o acumulan cantidades apreciables de HMW hasta alcanzar la fase estacionaria. Se pudo comprobar que durante las primeras horas de la fase estacionaria, las células en 'estasis' (que no están en crecimiento) son capaces de sintetizar ADN plasmídico descontroladamente, dando lugar a la acumulación de multímeros de alto peso molecular. Este fenómeno redundaba en un incremento de la relación plásmido / cromosómico de 2,5 a 3 veces.

Dado que el agregado de glucosa al medio, con el objeto de reprimir vía 'represión catabólica' la expresión de TnpR a partir del plásmido pBAD-tnpR, parecía exacerbar de por sí la actividad de síntesis de ADN plasmídico durante la FE, se intentó desafiar las conclusiones generadas utilizando el sistema de complementación, analizando los plásmidos pUCres y pUCrestnpR. Se corroboró que el crecimiento en presencia de glucosa determina que las células al entrar en FE disparen una actividad de síntesis de ADN que amplifica únicamente al plásmido. Si el plásmido posee un sistema de resolución activo, la replicación de FE es de menor magnitud y se alcanza una menor proporción de HMW.

Por el contrario, el crecimiento en [LB] resulta en una síntesis más acotada de HMW. Aparentemente, la generación de multímeros en esta condición de crecimiento no se da principalmente durante la FE, sino paulatinamente a lo largo del cultivo. De ahí que no sea posible precisar la cinética de amplificación en esta condición de crecimiento. Resulta evidente que

existe una correlación entre la condición fisiológica del cultivo y la posibilidad de disparar la replicación alternativa del plásmido que resulta en la acumulación de HMW.

El sistema de resolución es 100 % efectivo en prevenir la replicación alternativa que genera los multímeros durante el crecimiento en [LB]; pero sólo puede controlar parcialmente el fenómeno de replicación de FE que se da después del crecimiento en [LB glu]. Esto puede interpretarse como un indicio de la existencia de dos mecanismos alternativos para la generación de HMW. Uno involucraría la participación

de multímeros circulares del plásmido como intermediarios, mientras que el otro no y por lo tanto sería inerte al control por *res-TnpR*.

En el siguiente capítulo, se presenta la caracterización de las funciones celulares esenciales para la generación de HMW. En lo referente a las funciones de recombinación, se encontraron diferencias en cuanto a la dependencia de RecA para generar HMW en las condiciones [LB] y [LB glu], que le dan sustento a la hipótesis de la existencia de dos mecanismos alternativos para disparar la generación de HMW.

Resultados - Capítulo 2

No habrá nunca una puerta. Estás adentro
Y el alcázar abarca el universo
Y no tiene ni anverso ni reverso
Ni externo muro ni secreto centro.
No esperes que el rigor de tu camino
Que tercamente se bifurca en otro,
Que tercamente se bifurca en otro,
Tendrá fin. Es de hierro tu destino
Como tu juez.

J.L.B., Laberinto.

Análisis genético

1. Requerimientos genéticos I:

Funciones de recombinación involucradas en el procesamiento de un horquilla de replicación dañada.	94
1.1 RecA y proteínas pre-sinápticas de la vía RecF	94
1.2 ¿Se requiere RecA por su actividad recombinasa o como disparador de la respuesta SOS ?	97
1.3 RpoS: Fase estacionaria y la 'Respuesta General al Estrés'	98

2. Requerimientos genéticos II:

Funciones involucradas en el ensamblaje de un primosoma de reparación y el reinicio de la replicación.	
2.1 Funciones que intervienen en el ensamblaje de un primosoma de reparación	103
2.1.1. PriA: el nexo entre la recombinación y la replicación.	103
2.1.2. Sobre-expresar PriA a partir de un plásmido incrementa la acumulación de HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i> .	104
2.1.3. ¿Puede generarse HMW en ausencia de PriA funcional ?	106
2.1.3.1 No es posible introducir la mutación $\Delta priA$ en el contexto <i>recBC sbcBC</i>	106
2.1.3.2 Generación de un fenotipo transiente RecBCD ⁻ en el contexto $\Delta priA sbcBC sbcCD$	112
2.1.4. Las vías alternativas para generar un primosoma de reparación: mutantes <i>priC</i> y <i>rep</i> .	115
2.1.4.1 La vía independiente de PriA: mutantes <i>rep</i> .	115
2.1.4.2. La vía PriA/PriC: mutantes <i>priC</i> .	118
2.2. Vía RecB Vs Vía RecF: mutantes <i>recC₁₀₁₀</i>	118
2.3. Reinicio de la replicación: Pol III sintetiza los multímeros HMW.	119

3. Discusión	121
--------------	-----

Figuras

Figura 54 Importancia de RecA y proteínas presinápticas de la vía RecF [RecF y RecR]	95
Figura 55 ¿ Qué función de RecA se requiere para generar HMW en el contexto <i>recBC sbcBC</i> ?	98
Figura 56 Activación de la RGE mediada por el incremento en los niveles de σ^S .	100
Figura 57 Mutante <i>rpoS</i> .	101
Figura 58 Proteína PriA y mutantes PriA[K230D] y PriA[CA]	104
Figura 59 Sobre expresión de PriA: curvas de crecimiento en LB _{AP} .	105
Figura 60 Análisis de los plásmidos por southern-blot	106
Figura 61 La sobre-expresión de PriA triplica la relación HMW/FC en el contexto <i>recBC sbcBC</i> .	106
Figura 62 Mapa de restricción del locus <i>priA</i> salvaje y el alelo $\Delta priA1::kan$.	107
Figura 63 Estrategia para generar una cepa $\Delta priA1kan recBC sbcBC$.	108
Figura 64 Cinética de segregación: esquema de la metodología empleada.	109
Figura 65 Verificación del plásmido pGB ₂ -priA	110
Figura 66 La mutación <i>priA</i> resulta letal en el contexto <i>recBC sbcBC</i> .	111
Figura 67 la cepa JC7623/pGB2-priA mantiene el plásmido como un replicón extracromosómico.	111
Figura 68 Plásmidos pWSK-117 y pWSK-119	112
Figura 69 Verificación de los plásmido pWSK-117 y pWSK-119.	113
Figura 70 La inactivación de RecBCD en un contexto <i>sbcBC ΔpriA</i> no induce acumulación de HMW.	114
Figura 71 Mutantes <i>rep</i> : esquema del experimento.	116
Figura 72 Mutantes <i>rep</i> : viabilidad, mantenimiento del plásmido y análisis del plásmido pUCres.	117
Figura 73 Mutantes <i>priC</i> y mutantes <i>recC</i> ₁₀₁₀ .	118
Figura 74 Mutante <i>dnaE(Ts)</i> : esquema del experimento.	119
Figura 75 Mutante <i>dnaE(Ts)</i> : la inactivación de Pol III anula la generación de HMW durante la FE.	120

Tablas

Tabla 7 La inactivación de RecBCD en un contexto <i>sbcBC ΔpriA</i> no induce acumulación de HMW.	114
---	-----

Análisis genético

En función de los resultados presentados en la sección anterior [Resultados, capítulo 1] y teniendo en cuenta la teoría vigente sobre la interrelación replicación / recombinación, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo: en el contexto *recBC sbcBC* se acumulan intermediarios de replicación dañados del plásmido, debido a la incapacidad que tienen estas células de degradar moléculas de ADN lineales o que contengan extremos doble cadena. Estos intermediarios de replicación dañados, al ser procesados por la maquinaria de recombinación celular, generan intermediarios de recombinación sobre los cuales podrá reiniciarse la replicación ectópicamente, por un mecanismo alternativo que sería inerte a los controles de inicio de la replicación del plásmido, y resultaría en la replicación desregulada del mismo y la acumulación de HMW.

Con el objeto de definir las funciones esenciales para la generación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*, se inactivaron genes involucrados en los procesos celulares de recombinación y reinicio de la replicación y se analizó el efecto que producía la inactivación de estas funciones en la acumulación de HMW. Las distintas mutaciones fueron introducidas en la cepa JC7623 por transducción, utilizando un lisado del fago P1_{wt} preparado en la cepa correspondiente.

El sistema de resolución demostró distinta eficiencia para controlar la generación de HMW durante el crecimiento en [LB] o [LB glu], planteando la posible existencia de dos mecanismos alternativos para generar HMW. Uno de éstos sería controlable por el

sistema de resolución, mientras que el otro no. Según esta hipótesis, el crecimiento en presencia de glucosa dispararía el mecanismo de generación de HMW inerte al control por el sistema de resolución.

En los experimentos descritos en este capítulo solo se analizan plásmidos carentes de un sistema de resolución (derivados de ColE1, pSC101 y R1, según especificado en cada experimento). No obstante, se analizaron los distintos mutantes en las dos condiciones de cultivo, con el propósito de evidenciar diferencias en cuanto a los requerimientos genéticos para generar HMW en una y otra condición, que permitieran definir si realmente existe más de una vía para producir estos multímeros.

Las funciones celulares a evaluar se definieron en función de la hipótesis de trabajo planteada. La reparación de horquillas de replicación puede dividirse arbitrariamente en dos etapas. La primera etapa consistiría en procesar la horquilla de replicación dañada o colapsada mediante regresión de la horquilla (para formar una 'pata de gallo') o por recombinación con la cromátide hermana. Mientras que la segunda etapa abarcaría el ensamblaje de un primosoma de reparación y el posterior reinicio de la replicación. Se han dividido las mutaciones a evaluar en dos grupos siguiendo esta clasificación.

Por último, dado que en [LB glu], la replicación descontrolada del plásmido que deriva en la acumulación de HMW se desarrolla durante la FE, en la sección 1.4 del presente capítulo se evalúa si la inactivación del regulador global de la respuesta de FE (σ^S) afecta la generación de HMW.

1. Requerimientos genéticos I:

Funciones de recombinación involucradas en el procesamiento de una horquilla de replicación dañada.

La horquilla de replicación dañada o colapsada puede ser procesada mediante recombinación con la cromátide hermana o por regresión de la horquilla para formar una 'pata de gallo' (ver sección 4.1 Introducción). Las dos opciones permiten superar el lugar del daño u obstáculo para que pueda reiniciarse la replicación e involucran a la maquinaria celular de recombinación homóloga.

1.1 RecA y proteínas pre-sinápticas de la vía recF

Tanto la reversión de la horquilla como la invasión de la cromátide hermana, pueden ser catalizadas por RecA. Con el objetivo de analizar el papel de RecA y las proteínas de la vía RecF que normalmente asisten a RecA en el proceso de generar un filamento nucleoproteico sobre una región de ADNsc, se construyeron derivados de la cepa JC7623 en los que se inactivaron los genes *recA*, *recF* o *recR*. Las cepas se construyeron por transducción con el fago P1vir; se seleccionaron los transductantes en función del marcador de resistencia asociado a la mutación y se confirmó el fenotipo Rec⁻ mediante la determinación de la sensibilidad al UV. Puede encontrarse más detalles sobre la construcción de las cepas en la sección 2.10. de Mat. y Métodos.

En el caso de RecA, analizamos dos alelos que generan un fenotipo nulo: una mutación puntual (*recA56*) y una delección completa del gen (Δ *recA306*). La mutación *recA56* genera la mutante RecA[R60C] que posee una sustitución de la arginina 60 por cisteína, dentro del motivo MAW (makes ATP work), un dominio muy conservado de RecA que abarca los residuos 42 a 65 [42-tgxxldxalxxGGlxxgxiy-65]. Esta región parece estar involucrada en el cambio

conformacional inducido por ATP, que le permite a la proteína adoptar una conformación activa para el intercambio de cadenas. La cepa *recA56* presenta un fenotipo nulo *in vivo* (equivalente al de una delección), que incluye sensibilidad exacerbada al UV, deficiencia en recombinación e incapacidad para: inducir profagos, inducir la respuesta SOS o promover la mutagénesis característica de la 'síntesis tendiente a errores' [error prone DNA synthesis] que se dispara durante la respuesta SOS como resultado del auto-procesamiento de UmuD facilitado por RecA. *In vitro*, RecA56 no puede unirse a ADNsc en presencia de ATP, ni hidrolizar ATP. Esta mutante es incapaz de adoptar una conformación activa para el intercambio de cadenas en presencia de ATP (A.I. Roca and M.M.Cox, 1997).

En el caso de RecF analizamos dos alelos: *recF149* y *recF349*. *recF149* es una mutación sin sentido que resulta en una proteína con cierta actividad residual. Sin embargo, en el contexto *recBC sbcBC* genera sensibilidad exacerbada al UV y deficiencia en recombinación. El alelo *recF349* genera un fenotipo nulo (S.J.Sandler 1996).

Se analizó la cepa JC7623 y derivados de la misma deficientes en RecA, RecF o RecR, conteniendo el plásmido pUCres. Se cultivó cada una de las cepas en LB_{Ap} y LB_{Ap} glucosa 0,2%, en un baño termostatzado con agitación. Transcurridas 24 horas de cultivo, se tomaron muestras para determinar DO, analizar la distribución del plásmido en sus distintas formas y estimar la viabilidad del cultivo y el porcentaje de células que mantenía el plásmido. En la Figura 54 se han resumido los datos referentes a viabilidad [en LB y LB_{Ap}] y %HMW del plásmido pUCres para

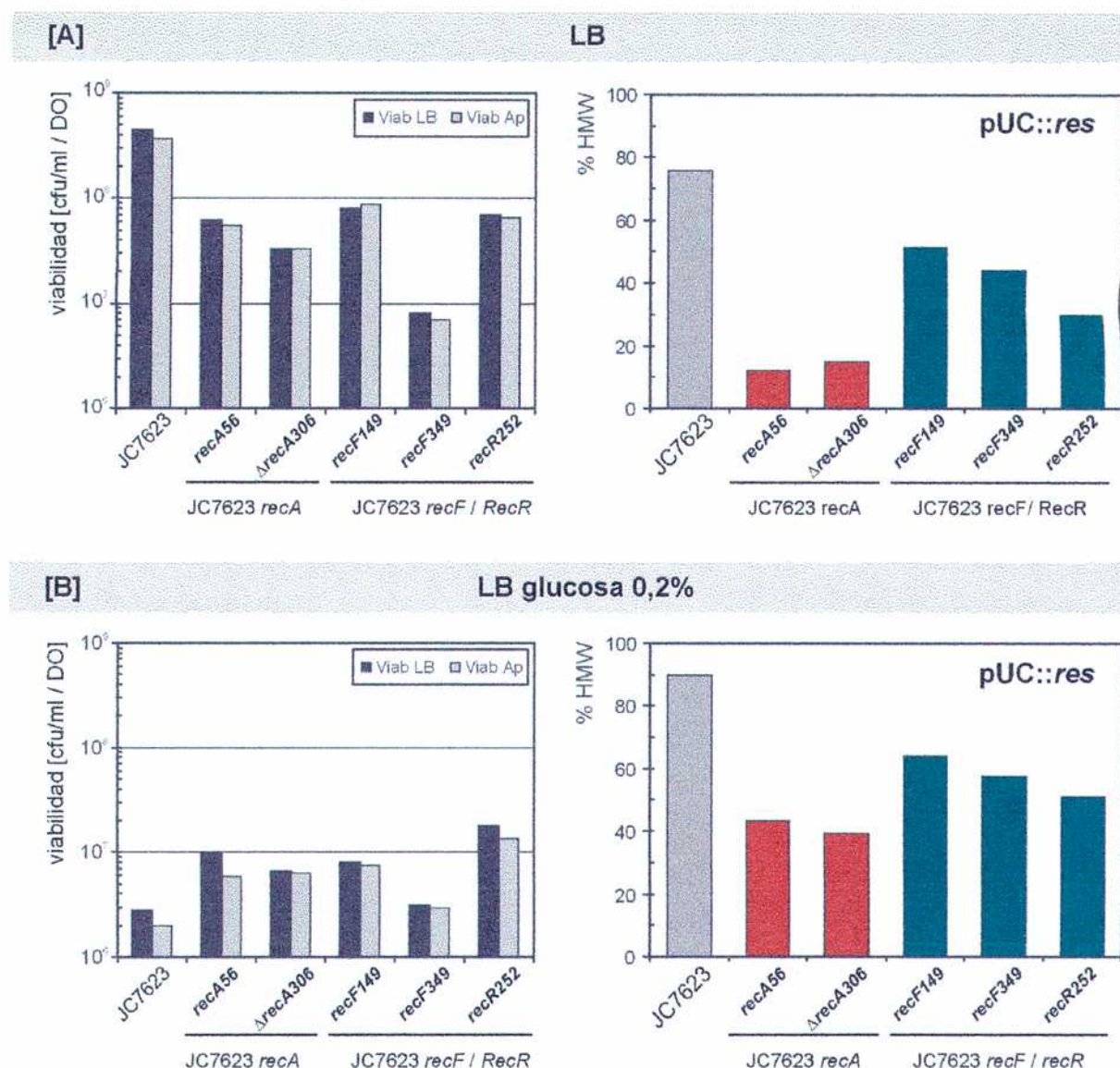


Figura 54: Importancia de RecA y proteínas presinápticas de la vía RecF [RecF y RecR]

Se analizó la cepa JC7623 y derivados deficientes en RecA, RecF o RecR, conteniendo el plásmido pUCres. [A] Condición LB [B] condición LB glucosa 0,2%. Dado que no todas las cepas alcanzan la misma DO, se ha graficado la viabilidad en LB y LB_{Ap} a fin de poder comparar entre cepas. Para estimar la viabilidad de cada cultivo se realizan recuentos en placas de LB y LB_{Ap} y se refieren los datos de ufc/ml a la DO del cultivo, para determinar las ufc/ml por unidad de DO. Los valores de %HMW se obtuvieron por análisis densitométrico a partir de los southern correspondientes. Se realizaron tres experimentos independientes. Se presentan los resultados de un experimento representativo.

cada cepa en las dos condiciones de cultivo.

En los derivados de JC7623 deficientes en RecA, después de 24 horas de cultivo en [LB] solo el 10 % del plásmido se acumula como HMW, indicando que la proteína RecA juega un papel esencial en la generación de HMW en esta condición de cultivo. Cabe recordar que en esta condición de crecimiento el sistema *res*-TnpR logra evitar que se acumule HMW.

Después del crecimiento en [LB glucosa] las mutantes JC7623 *recA* acumulan hasta un 40% del

plásmido como HMW. Si se compara con el 90% de HMW acumulado en JC7623, se puede deducir que en esta condición de cultivo aproximadamente la mitad de los multímeros HMW se genera por un mecanismo independiente de RecA. Recordemos que en esta condición de cultivo, el sistema de resolución sólo logra reducir a la mitad el fenómeno de replicación de FE y la acumulación de HMW.

Al complementar la información aportada por los derivados de JC7623 deficientes en RecA cultivados

en [LB] y [LB glucosa], con los resultados obtenidos al evaluar la capacidad del sistema de resolución de evitar que se formen multímeros HMW en una u otra condición, resulta evidente la existencia de por lo menos dos mecanismos alternativos de generación de HMW.

Analicemos primero la condición LB. Aparentemente, la inmensa mayoría de los multímeros HMW se genera por un mecanismo dependiente de RecA. Supongamos que durante el crecimiento en [LB] se generan multímeros circulares del plásmido por recombinación homóloga. Estos multímeros circulares podrían sufrir colapso de sus horquillas de replicación, dando lugar a la formación de multímeros lineales, que se acumularían debido a la deficiencia en ExoV característica de este contexto genético. Cada multímero lineal, a su vez podría invadir otra molécula lineal de plásmido, generando un D-loop en un proceso mediado por RecA. El D-loop generado podría dar lugar al inicio de la replicación, disparando un proceso de replicación dependiente de recombinación [RDR]. Ahora bien, si un monómero lineal invade a otro monómero lineal, el resultado de esta replicación iniciada sobre un intermediario de recombinación sería la generación de otro monómero (aunque con un extremo conteniendo una región simple cadena). En cambio si por ejemplo, un trímero invade a un pentámero se pueden generar desde trímeros hasta octámeros, dependiendo de dónde se produzca la invasión.

El hecho de que existan en la célula multímeros circulares, que puedan dar lugar a la formación de multímeros lineales, favorecería el aumento progresivo del tamaño de los multímeros por replicación mediada por recombinación [equivalente a lo que genera el genoma lineal con extremos redundantes en el fago T4]. Si el plásmido cuenta con un sistema de resolución activo que logre resolver los multímeros circulares en monómeros, eliminaría los intermediarios

necesarios para generar el HMW, evitando que se dispare la replicación alternativa que sintetiza los multímeros lineales. En otras palabras, en [LB] los multímeros circulares serían intermediarios esenciales en la generación de HMW. De ahí, que un sistema de resolución pueda impedir que se genere HMW en esta condición de cultivo.

Cabe aclarar, que si los monómeros del plásmido se linealizan con igual frecuencia en cualquier región del plásmido, se generará una población de monómeros con extremos circularmente permutados, que también podrían permitir la generación de multímeros; pero se requerirían muchos ciclos de RDR sobre monómeros lineales de este tipo para lograr generar multímeros de mayor tamaño que condujeran eventualmente a la formación de HMW.

Por otro lado, en [LB glucosa] la generación de HMW podría darse por dos mecanismos: un mecanismo dependiente de RecA, equivalente al que tiene lugar en [LB] y un segundo mecanismo independiente de esta proteína, que al no involucrar multímeros circulares como intermediarios sería insensible al control por un sistema de resolución. Por ende, en la condición [LB glucosa], un sistema de resolución sólo podría reducir la acumulación de HMW y la actividad replicativa de FE, ya que sería capaz de controlar únicamente una de las vías de generación de este tipo de multímeros. Esta predicción coincide con nuestras observaciones.

Las proteínas RecF y RecR son responsables de asistir a RecA en el ensamblaje del filamento nucleoproteico de RecA sobre una región de ADNsc. Por lo tanto, fue sorprendente encontrar que en los derivados *recF* y *recR* de JC7623, la acumulación de HMW no estuviera tan disminuida como en JC7623 *recA*. En las dos condiciones de cultivo, RecA parece ser capaz de generar HMW independientemente de RecF y RecR, aunque con menor eficiencia. Tanto, *in vivo* como *in vitro*, se ha descrito una serie de reacciones

y procesos que puede catalizar RecA, independientemente de RecFOR. De particular importancia es la demostración *in vitro*, de que RecA es capaz de catalizar la regresión de una horquilla de replicación independientemente de RecF y RecO/R (Robu M.E. et al., 2001).

Por otro lado, B. Michel y colaboradores demostraron *in vivo*, que en las mutantes *dnaB(ts)* la mayor parte de los cortes introducidos por RuvABC depende de la presencia de RecA funcional, pero no requiere de las proteínas pre-sinápticas RecF/RecO o RecBCD. Esto sugiere que, en estas mutantes el bloqueo de la horquilla por inactivación de DnaB, es superado por la formación de una EH catalizada por RecA, independientemente de las proteínas pre-sinápticas (Seigneur M. et al., 2000). En la Discusión se desarrollará en más detalle los posibles mecanismos de generación de HMW por la acción de RecA independientemente de RecFOR.

1.2 ¿Se requiere RecA por su actividad recombinasa o como disparador de la respuesta SOS ?

En la sección anterior se comprobó que la proteína RecA cumple un rol importante en el proceso de generación de multímeros HMW en el contexto *recBC sbcBC*. RecA podría ser necesaria *per se*, por su función de recombinasa o como parte de la señal necesaria para despertar la respuesta SOS. En este último caso, se requeriría RecA para inducir el regulón SOS, permitiendo que aumente la expresión de determinadas proteínas entre las cuales se encontraría(n) la(s) proteína(s) necesaria(s) para generar HMW del plásmido.

Recordemos que RecA forma parte de la señal que dispara la respuesta SOS. Cuando se expone a las células a un agente que produzca un daño masivo en el ADN, dado que las bacterias intentan continuar replicando el ADN dañado, se generan regiones de ADNsc. RecA polimeriza sobre estas regiones de

ADNsc y el filamento nucleoproteico RecA/ADNsc constituye una señal que dispara la respuesta SOS. El filamento *recA/ADNsc*, al facilitar la autoprocésamiento de LexA (el represor del regulón SOS) libera de represión transcripcional a los distintos *loci* que conforman este regulón [ver sección 4.4 Introducción].

Para poder diferenciar si RecA se requería únicamente como recombinasa o como sensor/transductor de la señal que induce la expresión de proteínas pertenecientes al regulón SOS, se analizaron los derivados *lexA3* y *lexA3 recAo98* de JC7623. La mutación *lexA3* genera un represor LexA incapaz de autoprocésarse. Por lo tanto los mutantes *lexA3* no pueden disparar la respuesta SOS.

Dado que la expresión de RecA también está bajo control de LexA, se analizó el derivado *lexA3 recAo98* de JC7623, con el objeto de diferenciar si los efectos observados en la mutante *lexA3* se deben a la incapacidad de la mutante de inducir la respuesta SOS o a los bajos niveles de RecA. La mutación *recAo98* permite expresión constitutiva de altos niveles de RecA, en contextos LexA⁺ o *lexA3*. Por lo tanto el derivado *lexA3 recAo98* de JC7623 expresa constitutivamente altos niveles de RecA a pesar de que no puede inducir la respuesta SOS.

En cuanto a las diferencias en los niveles de expresión de RecA, existen varios reportes en la bibliografía. Según cuantificaciones hechas por ELISA, el nivel basal de RecA en una cepa salvaje oscila alrededor de las 1200 molec/cel durante la fase exponencial y se incrementa 10 veces, llegando a niveles de 12000 molec/cel, al alcanzar la densidad óptica de saturación, previo a la entrada en FE. Ante un tratamiento con un agente que dañe al ADN, tales como la mitomicina C o el ácido nalidíxico, la expresión de RecA se induce entre 20 y 50 veces alcanzándose niveles de 24000 a 60000 molec/cel durante la respuesta SOS (A.E. Karu & Belk E.D., 1982).

Los experimentos realizados para evaluar cuál es la función de RecA esencial para la generación de HMW consisten en analizar las distintas cepas (cuyo genotipo se especifica en los gráficos de barras), conteniendo el plásmido pUCres, de la siguiente manera. Se realizaron cultivos en dos condiciones: LB_{Ap} y LB_{Ap} glucosa 0,2%, en un baño con agitación. Transcurridas 24 horas de cultivo, se tomaron muestras para medir DO y analizar la distribución del plásmido pUCres en las distintas formas [Figura 55].

En la condición [LB] la mutante *lexA3* acumula una alta proporción de multímeros, al igual que el control. Dado que en esta condición de cultivo, hasta un 90 % del HMW se genera por un mecanismo dependiente de RecA, el resultado obtenido con la mutante *lexA3* de JC7623 indica que el nivel 'basal' de RecA, característico del contexto *recBC sbcBC*, es suficiente para proveer la función recombinasa necesaria para dar lugar a la formación de HMW. En otras palabras, en la condición [LB] no se requiere un aumento importante en la expresión de RecA, mediado por la inducción del regulón SOS, para generar HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

En [LB glucosa] la mutante *lexA3* acumula 50% del plásmido como HMW. Recordar que en una mutante *recA* también se alcanza 50% de HMW en esta condición de cultivo. Por lo tanto, en [LB glu] sería necesario inducir la respuesta SOS o simplemente expresar mayores niveles de RecA, para generar parte de los HMW. En la mutante *lexA3 recAo98*, la sobre-expresión de RecA restaura parcialmente la capacidad de sintetizar HMW en ausencia de respuesta SOS. El hecho de que no logre restaurar totalmente la capacidad de generar HMW, indica que en esta condición de cultivo las funciones SOS contribuirían al proceso, si bien claramente no son esenciales. Al parecer, en [LB glu] se requerirían las dos funciones de *recA* para alcanzar los niveles de %HMW característicos de esta condición de cultivo.

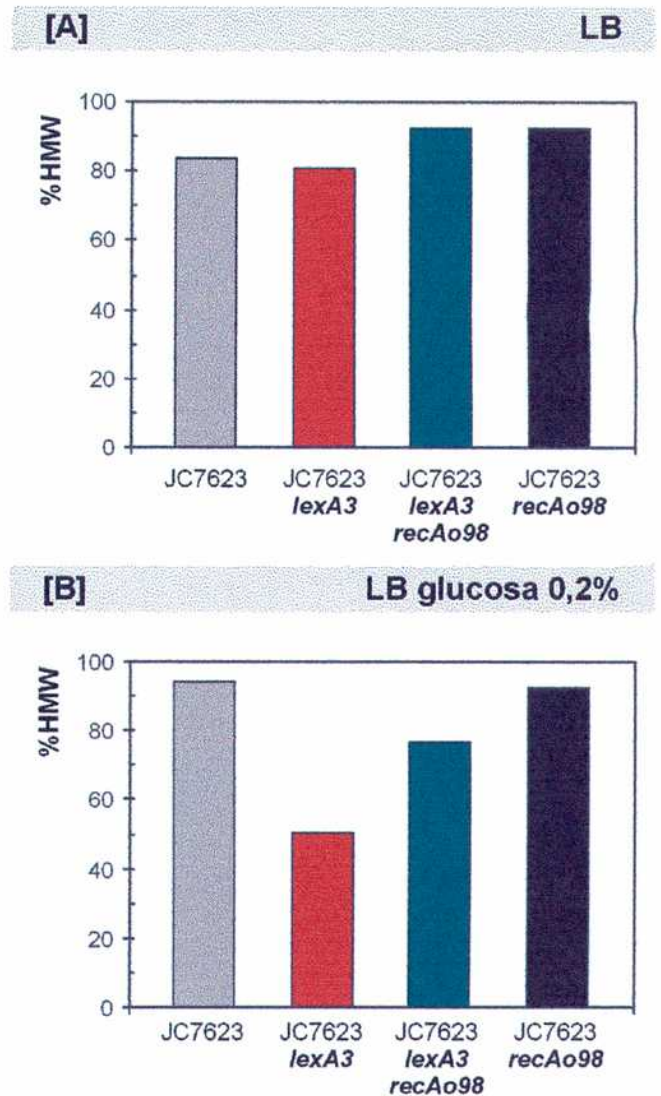


Figura 55: ¿ Qué función de RecA se requiere para generar HMW en el contexto *recBC sbcBC* ?

Se introdujo el plásmido pUCres en la cepas cuyo genotipo se especifica en cada gráfico de barras. Se cultivó las distintas cepas en dos condiciones: LB_{Ap} y LB_{Ap} glucosa 0,2%, en un baño a 30°C con agitación rotatoria (180rpm). Transcurridas 24 horas de cultivo, se tomaron muestras para medir DO y analizar la distribución del plásmido pUCres en las distintas formas. [A] resultados correspondientes a la condición LB. [B] resultados correspondientes a la condición LB glucosa 0,2%. Se realizaron dos experimentos independientes. Las cepas *lexA3* y *lexA3 recAo*, en la condición [LB glu], se analizaron en 4 exp. indep. Se presentan los resultados de un experimento representativo.

1.3 RpoS: fase estacionaria y la 'respuesta general a estrés' [RGE].

Tradicionalmente, la caracterización genético-molecular de los mecanismos de regulación de la expresión génica en bacterias, se realizaba en células en crecimiento exponencial. Por lo tanto, en una primera etapa, sólo se obtuvo información referente a

la regulación de genes relacionados con el crecimiento exponencial. Pronto se descubrió que las bacterias son capaces de adaptarse y sobrevivir a distintas situaciones de estrés; y se comprobó que la respuesta a cada situación de estrés involucra una alteración en el patrón de expresión de un conjunto de genes, que implica el silenciamiento o la represión parcial de la expresión de genes relacionados con el crecimiento y el encendido de genes necesarios para la adaptación a la condición de estrés (Ishihama A., 1999).

Cuando un cultivo de *Escherichia coli* entra en fase estacionaria, la mayor parte de los genes que se expresan activamente durante el crecimiento exponencial deja de expresarse, al tiempo que se enciende un grupo de genes específicos de FE. El encendido de genes de FE parece seguir un programa específico que enciende en forma escalonada distintos grupos de genes, de manera tal de maximizar la supervivencia a largo plazo del cultivo, en esta nueva situación. La modificación del patrón global de expresión génica, que tiene lugar cuando *Escherichia coli* entra en FE, involucra cambios radicales tanto en las maquinarias de transcripción y traducción, como en la estructura del nucleóide y la composición de las proteínas unidas al mismo (Ishihama A., 1999). A continuación, se sintetizan los mecanismos responsables de modificar el patrón de expresión génica durante la transición hacia la FE.

El factor σ^S (sigma S) es el principal regulador de la respuesta de FE, entendida como el conjunto de mecanismos adaptativos que pone en juego la célula al enfrentarse a la limitación en algún nutriente esencial. σ^S es el producto del gen *rpoS* y actúa como una subunidad σ de la RNA-polimerasa. La holoenzima RNA-Polimerasa es un complejo proteico compuesto por el **complejo base** $\alpha_2\beta\beta'$, que posee actividad catalítica y una **subunidad** σ , que le confiere especificidad para reconocer determinados promotores.

Escherichia coli posee siete subunidades σ diferentes, cada una de las cuales reconoce una secuencia promotora consenso y por ende es responsable de la transcripción de un determinado grupo de genes. La mayor parte de los genes que se expresan durante el crecimiento exponencial son transcritos por la holoenzima $E\sigma^{70}$, es decir la RNA-polimerasa conteniendo σ^{70} (producto del gen *rpoD*). Por otro lado, la holoenzima $E\sigma^S$ es esencial para la transcripción de la mayoría de los genes específicos de FE. Los genes involucrados en las respuestas a las distintas situaciones de estrés, se transcriben por acción de la holoenzima conteniendo alguna de las subunidades σ minoritarias ($E\sigma^N$: respuesta a la disponibilidad de N; $E\sigma^H$: respuesta a choque térmico; $E\sigma^F$: genes involucrados en quimiotaxis; $E\sigma^E$: respuesta al daño de proteínas extracitoplasmáticas).

En células en activo crecimiento no se detecta σ^S . Los niveles de σ^S se incrementan durante la transición hacia la FE, pero también puede darse en células en activo crecimiento expuestas a distintas situaciones de estrés. Entre las situaciones que disparan una rápida acumulación de σ^S se puede mencionar: el hambre en fuente de carbono, nitrógeno, fósforo o aminoácidos; la transferencia de las células a una temperatura por encima de 42°C o por debajo de 30°C; condiciones de pH ácido; condiciones de alta osmolaridad o el crecimiento continuo en esta condición.

El nivel celular de σ^S está controlado a distintos niveles, que incluyen la transcripción, la traducción y la proteólisis de σ^S ; y las diversas condiciones de estrés afectan distintos niveles de control [esquematisado en la figura 56]. En términos generales, las condiciones de estrés potencialmente letales, que requerirían una respuesta más instantánea, afectan la proteólisis de σ^S ; mientras que aquellas situaciones que producen un deterioro gradual de las condiciones ambientales tienden a estimular la transcripción o tra-

ducción de *rpoS* (Hengge-Aronis R., 2000; Lange R. & Hengge-Aronis R., 1991).

Actualmente se considera a σ^S como un regulador maestro de la **respuesta general al estrés [RGE]**, definida por un conjunto de alteraciones en la fisiología celular que acrecientan la supervivencia del cultivo en distintas situaciones. Esta respuesta se dispara ante diferentes situaciones de estrés entre las que se incluyen: el hambre que resulta en la fase estacionaria, la exposición a alta osmolaridad, baja / alta temperatura y pH ácido. Todas estas condiciones resultan en un incremento en el nivel de σ^S que se refleja en la inducción de más de 50 genes que confieren resistencia a estrés, modifican las características morfológicas y estructurales de la célula y redireccionan el metabolismo.

Sin embargo, el incremento en el nivel de σ^S inducido por dos efectores de estrés diferentes, no necesariamente resultará en el encendido de los mismos genes. Muchos de los genes dependientes de σ^S son controlados también por diversos co-reguladores que pueden o no estar presentes o activos en distintas situaciones de estrés. Por lo tanto, las consecuencias fisiológicas de la RGE, no será obligatoriamente idéntica bajo condiciones diferentes de estrés. La interpretación se complica aún más por el hecho de que ciertas condiciones de estrés no sólo disparan la RGE, sino que inducen también respuestas específicas, independientes de σ^S .

Asimismo, cabe mencionar que la RGE puede ser utilizada por la bacteria como una respuesta de emergencia o como un programa a largo plazo de adaptación al hambre u otros efectores de estrés. Una situación en la que la RGE se dispara como una respuesta de emergencia, sería la inducción rápida e inmediata de σ^S y distintos genes regulados por el mismo, al comienzo de la fase lag diáuxica durante el crecimiento en presencia de glucosa y lactosa. Por el contrario, la transición hacia la FE que se desencade-

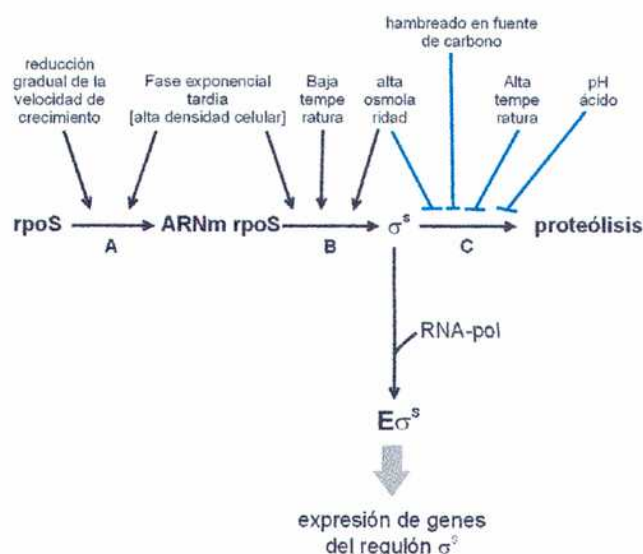


Figura 56: Activación de la RGE mediada por el incremento en los niveles de σ^S .

Distintos efectores de estrés pueden activar la RGE (Respuesta General al Estrés) al afectar la transcripción, la traducción o la proteólisis del regulador maestro σ^S .

[A] Regulación de la transcripción del gen *rpoS*: los niveles del RNAm aumentan durante la fase exponencial tardía y la entrada en FE. Por otro lado existen reguladores positivos (+) y negativos (-), tales como cAMP-CRP (-) y la molécula ppGpp (+), que parecen afectar la transcripción del gen *rpoS*. La mayoría de los efectores de estrés no afectan los niveles del RNAm.

[B] Regulación de la traducción: mediante modificaciones de la estructura secundaria del RNAm que estimulan la traducción.

[C] Regulación de la proteólisis: en condiciones normales σ^S es reconocido por el regulador Rssb-fosforilado y esta interacción facilita el reconocimiento y/o la degradación de σ^S por el complejo ClpXD. Distintos efectores de estrés inducen la defosforilación de Rssb (por un mecanismo de transducción de señales que aún no ha sido caracterizado), disminuyendo su afinidad por σ^S y por lo tanto reduciendo la proteólisis del mismo. Figura adaptada a partir de Hengge-Aronis R., 2000.

na ante el agotamiento de un nutriente esencial, se caracteriza por una fase de adaptación que dura aproximadamente cuatro horas. Durante este período de transición se inducen proteínas de hambre, siguiendo un programa que incrementa gradualmente la resistencia a múltiples efectores de estrés. σ^S cumple un rol esencial en el desarrollo de este programa genético, que se produce durante la FE temprana y asegura la supervivencia a condiciones de hambre prolongadas.

La RGE se puede diferenciar de las respuestas específicas a un efector de estrés, en que estas últimas le permiten a la célula manejar una situación aguda de estrés eliminando el efector y reparando el daño generado por el mismo; mientras que la RGE

tiene un carácter predominantemente preventivo. Es decir, modifica a la célula de manera tal de evitar que distintos efectores puedan dañarla, en vez de reparar el daño una vez concretado el mismo. Gran parte de los genes clasificados dentro del regulón σ^S confieren 'tolerancia' al estrés. En el caso del estrés oxidativo, se puede mencionar el gen *dps*, que codifica una proteína que se une inespecíficamente al ADN y lo protege del daño oxidativo; y los genes *katG* y *katE* que codifican catalasas responsables de degradar H_2O_2 . En cuanto al estrés osmótico, se puede mencionar el operón *otsBA*, que codifica enzimas involucradas en la producción de trehalosa, un importante osmoprotector. σ^S también es responsable de los cambios morfológicos que se observan en células en FE, que están relacionados con el morfogen *bolA*. A nivel metabolismo, se puede mencionar el gen *acs*, que codifica la acetil-CoA sintasa. Este gen está sujeto a control por σ^S y es importante para la reutilización del acetato que se produce y excreta al medio durante el crecimiento rápido en presencia de glucosa.

Por último, varios genes controlados por σ^S cumplen funciones regulatorias, y establecen cascadas regulatorias dentro del regulón σ^S .

En la sección 1.3.1 (Resultados-Cap.1), se demostró que las células *recBC sbcBC* creciendo en [LB glu], generan y acumulan HMW principalmente durante la FE temprana. Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que la síntesis de HMW en tal condición, dependiera de la inducción de genes dependientes de σ^S . De hecho, Villarroya y colaboradores reportaron que durante la transición hacia la FE, se induce la transcripción de *dnaN* y *recF*. Dicha inducción depende de σ^S . La participación de RecF en recombinación y replicación ha sido descrita en la Introducción. El gen *dnaN* codifica la subunidad β , que dimeriza para formar el 'clamp' de procesividad de la holoenzima Pol III. Estos investigadores postularon que la inducción de *recF* y *dnaN* durante la tran-

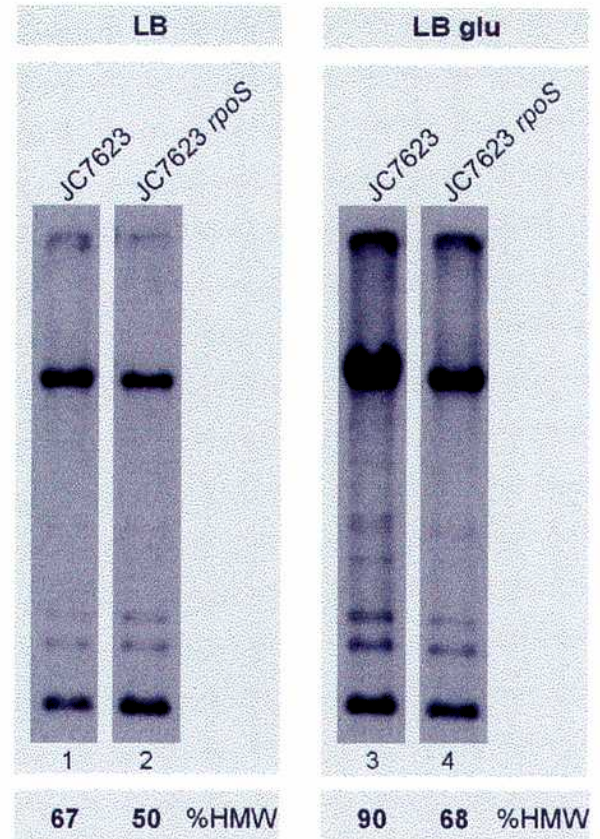


Figura 57: Mutante *rpoS*.

Se cultivó las cepas JC7623 y MB1190, conteniendo el plásmido pUCres, en LB_{tetAp} o LB_{tetAp} glucosa 0,2%, en un baño a 32°C con agitación (180 rpm). Transcurridas 24 horas de cultivo, se tomaron muestras para analizar el plásmido pUCres por southern, hibridando con la sonda Ap299.

sición hacia la FE, le permitiría a la célula culminar exitosamente el ciclo de replicación en marcha y completar la duplicación del genoma antes de dividirse por última vez y entrar en 'estasis' (arresto del crecimiento). Dado que el clamp β no sólo interactúa con Pol III, sino que también interacciona con otras polimerasas involucradas en reparación (López de Saro F. & O'Donnell M, 2001), la acumulación de esta proteína podría estar relacionada con procesos de reparación y mantenimiento del ADN durante la FE (Villarroya M. et al., 1998).

Estas y otras funciones inducidas por σ^S , podrían estar involucradas en la síntesis de ADN plasmídico que tiene lugar durante las primeras horas de la FE y derivan en la acumulación de multímeros HMW después del crecimiento en [LB glu]. Para analizar esta posibilidad, se introdujo la mutación *rpoS359*, en

el contexto JC7623 y se analizó la capacidad de las células deficientes en el regulador global de la RGE, de generar HMW al crecer en [LB] y [LB glu]. Como control se analizó en paralelo la cepa JC7623. En la figura 57, se muestra el análisis del plásmido pUCres, después de cultivar las cepas JC7623 y MB1190 [JC7623 *rpoS*] durante 24 horas en [LB] y [LB glu].

En las dos condiciones de cultivo, la mutante *rpoS* acumula una menor proporción de HMW que el control [Figura 57]. Dado que en [LB glu] la generación de HMW se da principalmente durante la FE, se esperaba que la mutante *rpoS* exhibiera mayores diferencias respecto del control en dicha condición. Sin embargo, en las dos condiciones de cultivo, las células deficientes en σ^S , no logran alcanzar el máximo nivel de amplificación y acumulación de HMW que presenta la cepa control.

De todas maneras, la cepa JC7623 *rpoS* acumula mayor proporción de HMW en [LB glu] que en [LB], por lo tanto la inactivación de *RpoS* no anula por completo el 'efecto glucosa'. Partiendo de la suposición que el denominado efecto glucosa implica un cambio fisiológico disparado por una situación de estrés generada por el metabolismo de la glucosa o el agotamiento de la misma hacia el final de la fase exponencial, que exacerba la replicación descontrolada del plásmido; y tomando en consideración que las distintas respuestas a estrés forman parte de una red regulatoria única altamente interconectada, en cierta

forma era previsible que la inactivación del regulón σ^S fuera compensado parcialmente por mecanismos de adaptación inducidos por otro regulón.

En otras palabras, el 'efecto glucosa' tendría dos facetas. Una estaría relacionada con cambios metabólicos inducidos por el crecimiento en presencia de glucosa (o por la generación de acetato al final de la fase exponencial), que serían responsables de generar mayor cantidad de intermediarios de replicación dañados del plásmido tendientes a involucrarse en la generación de HMW. Esta no se vería afectada por la inactivación de *rpoS* y explicaría porqué la mutante *rpoS* presenta mayor proporción de HMW en [LB glu] que en [LB].

La segunda tendría que ver con los cambios de expresión génica que adoptan las bacterias para adaptarse a las condiciones de fase estacionaria. Estos cambios están regulados por σ^S y por otros reguladores que se inducen en función de la situación de estrés característica, que determina que se detenga el crecimiento. Dado que la inactivación de *rpoS* disminuye la proporción de multímeros que puede acumular la cepa JC7623 en [LB glu], es evidente que alguno(s) de los genes pertenecientes al regulón σ^S contribuye(n) a la generación de HMW durante la FE. Su participación en el fenómeno podría estar incluso subestimada, si en la mutante *rpoS* puede(n) inducirse por acción de otro regulador de estrés.

2. Requerimientos genéticos II: funciones involucradas en el ensamblaje de un primosoma de reparación y el reinicio de la replicación.

2.1 Funciones que intervienen en el ensamblaje de un primosoma de reparación

2.1.1. PriA: el nexo entre la recombinación y la replicación.

La proteína PriA fue descrita por primera vez, como uno de los factores bacterianos necesarios para reconstituir *in vitro* la síntesis de la cadena complementaria del fago Φ X174. Análisis bioquímicos revelaron que PriA era necesaria para la formación de un primosoma, que demostró ser diferente del ensamblado en *oriC* para iniciar la replicación del genoma bacteriano. Este tipo de primosoma originalmente se denominó 'primosoma Φ X174' [Schekman, R. et al. 1975; Wicker, S. & Hurwitz, J. 1975].

Más tarde se descubrió que los plásmidos de tipo ColE1 también utilizaban el primosoma Φ X174 para iniciar la síntesis de la cadena retrasada. PriA reconoce la estructura secundaria adoptada por el sitio PAS sobre la cadena desplazada del R-loop generado por el RNA II (el ARN-primer que permite el inicio de la cadena líder), y permite el ensamblaje del primosoma que habilita el inicio de la cadena retrasada (desarrollado en la sección 1.2.1 de la Introducción).

Recientemente, Jones J. y Nakai H. demostraron que PriA permite iniciar la síntesis de ADN necesaria para completar la transposición replicativa del fago Mu. En este caso PriA reconoce la estructura en forma de Y adoptada por el intermediario de transposición e inicia el ensamblaje de un primosoma sobre el mismo (desarrollado en la sección 1.3.1. de la Introducción).

PriA no participa del ensamblaje de la horquilla de replicación en *oriC*, ni es necesaria para iniciar la síntesis de los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada durante la etapa de elongación de la síntesis

de ADN genómico. Tampoco se han encontrado secuencias homólogas a la secuencia PAS consenso en el genoma de *E.coli*. Por muchos años nadie pudo explicar qué función cumplía PriA en el metabolismo bacteriano. Finalmente cuando se logró clonar *priA* y se construyeron mutantes nulos, las múltiples deficiencias exhibidas por estos mutantes demostraron que PriA debía cumplir un rol celular muy importante. Los mutantes *priA* presentan una viabilidad extremadamente baja, y exhiben un alto grado de filamentación y niveles inducidos del regulón SOS. Son deficientes en reparación de daños al ADN generados por radiación UV, crecen muy mal en medio rico y son deficientes en recombinación homóloga, en reparación de cortes doble cadena generados por radiación ionizante, y en fenómenos tales como iSDR y cSDR (que involucran replicación a partir de D-loops y R-loops).

Evidencias recientes indican que bajo condiciones de crecimiento aeróbico normal, la mayor parte de las horquillas de replicación requiere de reparación por recombinación en alguna etapa del ciclo de replicación. Es decir que, la mayoría de las veces, las horquillas de replicación ensambladas en el origen, encuentran algún tipo de impedimento antes de llegar al *terminus*. Cuando el replisoma encuentra una lesión que no ha sido reparada o un nick en el ADN molde, se produce el bloqueo o colapso de la horquilla. La maquinaria de recombinación debe entonces procesar la horquilla para reconstituirla. Una vez superado el impedimento, ya sea por recombinación con el cromosoma hermano o por reversión de la horquilla, es necesario volver a ensamblar la maquinaria de replicación en ese lugar. El proceso de ensamblaje del primosoma depende de la proteína PriA, que es capaz de reconocer la estructura de la horquilla blo-

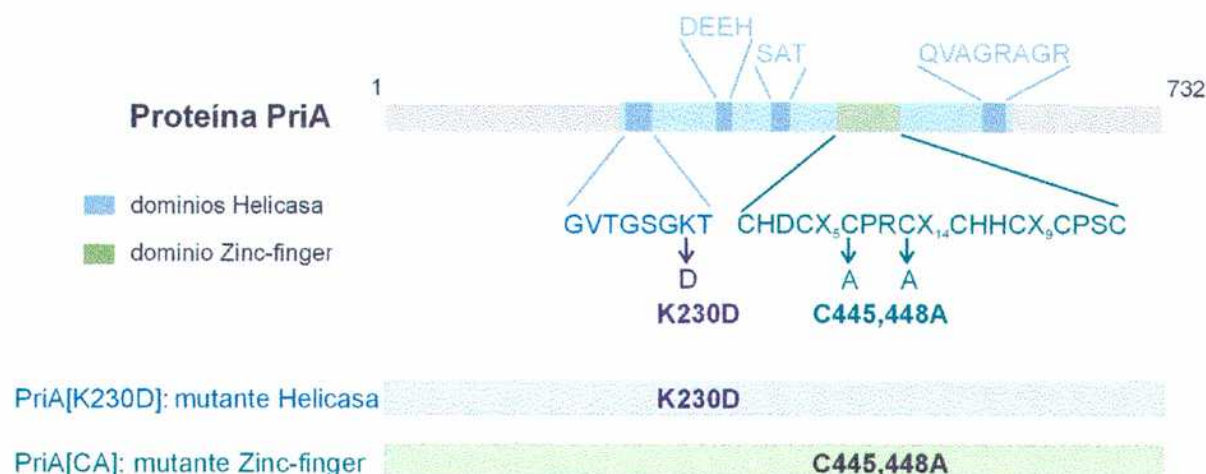


Figura 58: Proteína PriA y mutantes PriAK230D y PriACA

queada o de algún intermediario de recombinación generado por acción de las proteínas de recombinación sobre la misma, unirse a estas estructuras y comenzar a reclutar las proteínas necesarias para ensamblar el primosoma que permitirá re-iniciar la replicación. Al develarse la función fisiológica de PriA y el resto de la proteínas que conforman el primosoma Φ X174, este primosoma fue rebautizado 'primosoma de reparación'.

Las múltiples deficiencias que exhiben las mutantes *priA* están relacionadas con la incapacidad de reiniciar la replicación ante el bloqueo o colapso de horquillas de replicación, que se produce con alta frecuencia, aún en células que no hayan estado expuestas a un agente exógeno que dañe el ADN. Las horquillas de replicación pueden bloquearse o colapsar debido a la presencia de lesiones o discontinuidades en las cadenas molde (generadas por especies reactivas de oxígeno producto del metabolismo aeróbico celular), o por la presencia de proteínas unidas al ADN que bloqueen el progreso del replisoma.

Tomando como hipótesis de trabajo que el HMW se genera por replicación iniciada sobre un intermediario de recombinación o sobre estructuras en Y generadas por un bloqueo de la horquilla de replicación, se consideró que PriA podría ser el nexo entre la recombinación y la replicación en el proceso de

generación de multímeros. Por lo tanto, se analizó el papel de la proteína PriA en la formación de multímeros HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

2.1.2 Sobre-expresar PriA a partir de un plásmido incrementa la acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*.

Se analizó el efecto de sobre-expresar PriA a partir de un plásmido, sobre la generación de multímeros HMW en el contexto *recBC sbcBC*. Se utilizó el vector pHM6050, que posee un origen R1 y por lo tanto replica independientemente de PriA; y tres derivados del mismo que expresan la proteína PriA salvaje o dos mutantes funcionales PriA[K230D] y PriA[CA] en las que están afectados los dominios Helicasa/ATPasa y Zinc Finger respectivamente (provistos por el Dr. Masai, Masai H. et al., 1999).

La proteína PriA posee varios motivos helicasa y un dominio zinc-finger [ver Figura 58]. El plásmido pHM-priA_{K230D} expresa una mutante de PriA con una sustitución de la lisina 230 por ácido aspártico, dentro del dominio conservado de tipo Walker A [GXXXXGKTS]. Esta mutante es deficiente en hidrólisis de ATP y actividad helicasa. Sin embargo, la introducción del plásmido pHM-priA_{K230D} en una mutante Δ priA suprime la filamentación y la deficiencia en viabilidad; permite el establecimiento de bajos niveles de

iSDR y la replicación de plásmidos dependientes de PriA (aunque con baja eficiencia). En síntesis, la mutante K230D mantiene cierta actividad de 'ensamblaje de primosoma', a pesar de su nula actividad helicasa y ATP-hidrolasa [fenotipo Hel⁻ EP⁺] (Masai H. et al. 1999).

El plásmido pHM-priA_{CA} expresa una mutante de PriA en la que se han sustituido dos residuos conservados de cisteína en las posiciones 445 y 448, dentro del dominio zinc-finger, por alaninas. Esta mutante mantiene intacta su actividad helicasa, sin embargo no puede complementar las múltiples deficiencias de una mutante $\Delta priA$ (en cuanto a viabilidad, sensibilidad al medio rico, filamentación y sensibilidad al UV). La complementación de una cepa $\Delta priA$ con esta mutante no permite que se establezca la replicación estable del ADN en condiciones que inducen la respuesta SOS (iSDR) ni el establecimiento de plásmidos dependientes de PriA (Masai H. et al. 1999). Por lo tanto, ésta sería una mutante más relevante, ya que carece de la actividad de 'ensamblaje de primosomas', que postulamos, sería la responsable de ensamblar el primosoma que dispara la replicación alternativa del plásmido que genera los multímeros HMW.

Con el objeto de evaluar el efecto de sobre-expresar la proteína PriA o las dos mutantes arriba detalladas en el contexto *recBC sbcBC*, se introdujeron los plásmidos pHM6050, pHM-priA, pHM-priA_{K230D} y pHM-priA_{CA} en la cepa JC7623 y se analizó el crecimiento de estas cuatro cepas en LB_{Ap}.

Cultivos ON en LB_{Ap} se inocularon en 20 ml de LB_{Ap} a una DO inicial de 0,02 (dil 1/150) y se incubaron a 30°C en un baño con agitación (180 rpm). Se monitoreó la DO de cada cultivo durante la fase exponencial y se calculó el tiempo de duplicación de cada cepa. Transcurridas 29 horas de cultivo, se analizó la distribución de los plásmidos en las distintas formas por southern-blot.

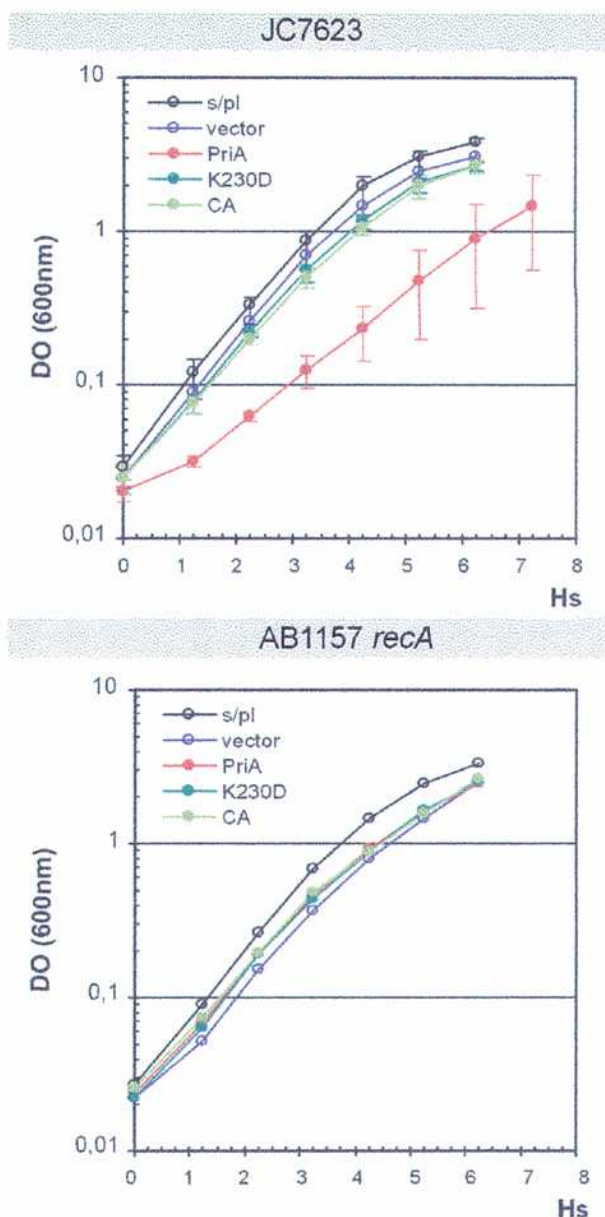


Figura 59: Curvas de crecimiento en LB_{Ap}. Se realizaron cultivos de la cepa JC7623 y AB1157 *recA* conteniendo el vector pHM6050 o sus derivados pHM-priA, pHM-priA_{K230D} y pHM-priA_{CA}, en medio LB suplementado con Ap, a 32°C con agitación (180rpm). Se partió de una DO inicial de 0,02, y se tomaron muestras cada hora para medir la DO a 600nm. Las curvas representan los promedios de tres experimentos independientes y las barras de error representan la DS.

En la Figura 59, puede verse claramente que la sobre-expresión de PriA salvaje en el contexto *recBC sbcBC* retarda significativamente el crecimiento en LB_{Ap}. Se duplica el tiempo de duplicación en comparación con la cepa JC7623 conteniendo el vector o sus derivados que expresan mutantes de PriA. Por el contrario, en AB1157 *recA* o en un contexto salvaje la sobre-expresión de PriA no modifica en absoluto la

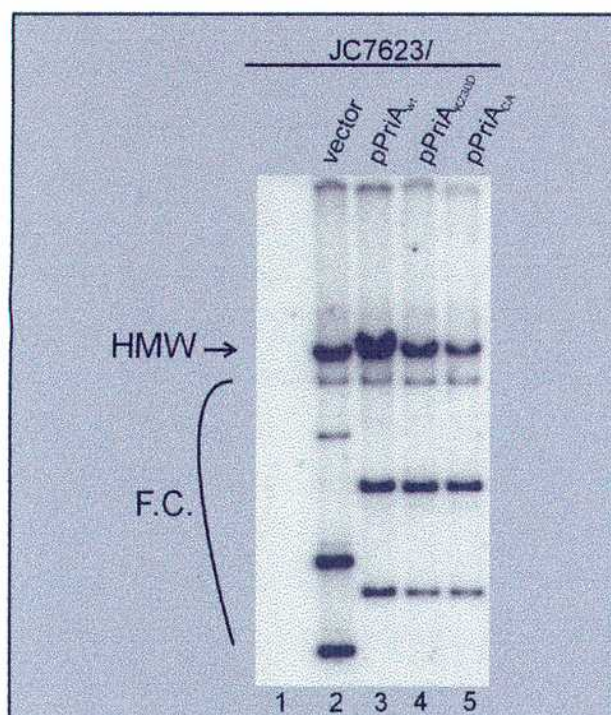


Figura 60: Análisis de los plásmidos por southern-blot

A las 24 horas de cultivo se tomaron muestras de cada cepa para preparar lisados totales. Los lisados fueron digeridos con *SacI*, para fraccionar el ADN genómico. Se sembró 2 µg de ADN total en cada calle. La hibridación se realizó con la sonda Ap299.

velocidad de crecimiento. Por lo tanto, el efecto negativo producido por la expresión de PriA salvaje a partir del plásmido pHM-priA es inherente al contexto *recBC sbcBC*.

Al evaluar el comportamiento de los distintos plásmidos en la cepa JC7623 se comprobó que la sobre-expresión de PriA salvaje resulta en una mayor relación HMW/FC. Por el contrario, la sobre-expresión de la mutante PriA_{CA}, que es incapaz de permitir el ensamblaje de un primosoma, no tiene ningún efecto [ver Figuras 60 y 61]. Al referir las relaciones de HMW/FC de cada plásmido a los valores obtenidos para el vector, se puede ver que la expresión de PriA salvaje triplica la relación HMW/FC. En términos de porcentaje de HMW, la cepa JC7623 acumula un 80% del plásmido pHM-priA como HMW, mientras que solo acumula 40% del vector (o de pHM-priA_{CA}) como HMW.

Dado que el vector pHM6050 carece de secuencias PAS y normalmente replica de manera indepen-

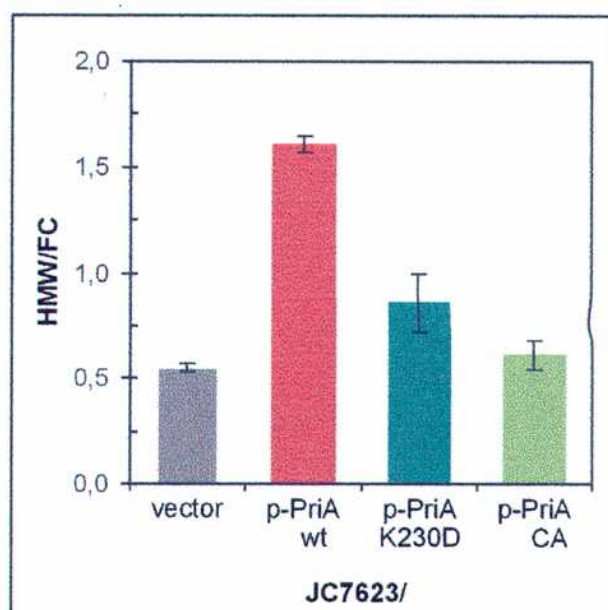


Figura 61: La sobre-expresión de PriA triplica la relación HMW/FC en el contexto *recBC sbcBC*.

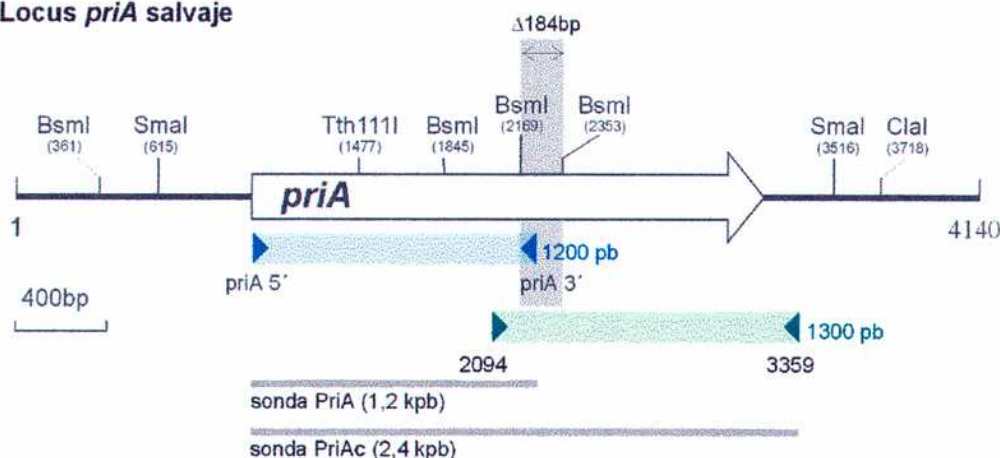
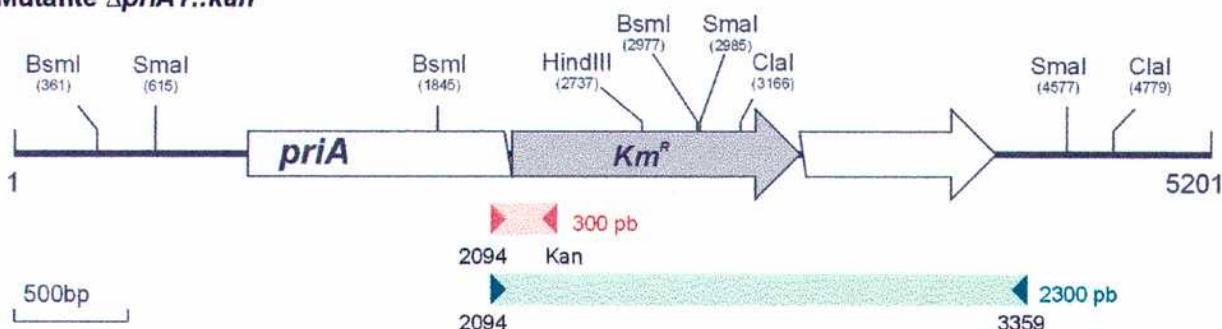
Se analizó la relación HMW/FC, por densitometría a partir de los southern correspondientes a 3 experimentos independientes. Las columnas indican el valor promedio de la relación HMW/FC para cada plásmido. Las barras de error representan la desviación estándar. La sobre-expresión de PriA salvaje induce un aumento de la relación HMW/FC, mientras que la sobre-expresión de la mutante PriA_{CA}, incapaz de ensamblar un primosoma, genera una relación HMW/FC equivalente a la del vector.

diente de PriA, la proteína PriA expresada a partir del plásmido pHM-priA tendría que ser reclutada por una estructura alternativa para lograr influenciar la replicación del plásmido y generar una mayor proporción de multímeros HMW. Esta estructura podría ser un intermediario de recombinación o una horquilla de replicación bloqueada del plásmido. Estos resultados constituyen un primer indicio de que PriA podría estar involucrada activamente en la síntesis de HMW. Para analizar esta posibilidad es necesario evaluar si es posible generar HMW en ausencia de PriA funcional.

2.1.3. ¿Puede generarse HMW en ausencia de PriA funcional ?

2.1.3.1 No es posible introducir la mutación $\Delta priA$ en el contexto *recBC sbcBC*:

A comienzos de los 90, dos grupos de investigación construyeron mutantes *priA* nulos. A. Kornberg y colaboradores generaron la mutante $\Delta priA1::kan$, que

[A] Locus *priA* salvaje**[B] Mutante $\Delta priA1::kan$** **Figura 62: Mapa de restricción del locus *priA* salvaje y el alelo $\Delta priA1::kan$.**

[A] En el mapa del locus *priA* salvaje se indica el fragmento BsmI de 184 pb, eliminado durante la construcción de la mutante $\Delta priA1::kan$. En azul y en verde se muestran los productos de amplificación esperados con los pares de cebadores *priA5'*/*priA3'* y 2094/3359, de 1,2 y 1,3 kpb respectivamente. La sonda PriAc (de 2,4 kpb) utilizada para verificar por southern las mutantes $\Delta priA1::Kan$, se genera por PCR a partir de ADN cromosómico de una cepa salvaje utilizando los primers *priA5'*/3359, y abarca todo el gen *priA*. [B] En el mapa de la mutante $\Delta priA1::Kan$ se indica la inserción del gen de resistencia a kanamicina en el sitio de la delección del fragmento BsmI de 184 pb. En rojo y en verde se muestran los productos de amplificación esperados con los pares de cebadores 2094/Kan y 2094/3359, de 300 pb y 2300 pb respectivamente. Si se digiere el ADN cromosómico de una cepa salvaje y de una cepa $\Delta priA1::Kan$ con SmaI y se analizan por southern blot, revelando con la sonda PriAc se revela un único fragmento de 2,9 kpb en el caso de la cepa salvaje y dos fragmentos de 2,4 y 1,6 en el caso de la mutante $\Delta priA1::Kan$.

contiene una delección de los codones 406 a 466 y una inserción de un cassette de resistencia a kanamicina río abajo del codón 405 [Figura 62] (Lee E.H. & Kornberg A., 1991). Paralelamente en el laboratorio de K. Mariani, se construyó la mutante *priA2::kan*, en la que se insertó el cassette de resistencia a kanamicina (en sentido inverso al de la transcripción de *priA*) entre los codones 154 y 155 (Nurse P. et al., 1991).

Los extractos proteicos, preparados a partir de estas dos cepas son incapaces de permitir la replicación *in vitro* del fago $\Phi X174$. *In vivo*, las dos mutantes exhiben un fenotipo nulo, que incluye: muy baja viabilidad, extensa filamentación, sensibilidad al UV y a la radiación ionizante (que indica incapacidad para reparar daños al ADN), respuesta SOS inducida constitutivamente, deficiencias en recombinación

homóloga (estimada en ensayos de transducción y conjugación), deficiencia en iSDR y cSDR y marcada sensibilidad al medio rico. Estas cepas tampoco permiten el establecimiento de plásmidos PriA-dependientes, tales como pBR322, pUC19 o pACYC184 ni la replicación de los fagos $\Phi X174$ y Mu (Lee E.H. & Kornberg, 1991; Nurse P. et al., 1991; Kogoma T. et al. 1996; Masai H. et al. 1994).

Dadas las múltiples deficiencias de estas mutantes, se deben tomar recaudos para evitar acumular mutaciones supresoras en el locus *dnaC*. Se presume que estas mutaciones suprimen las múltiples deficiencias de las mutantes *priA*, al permitir que DnaC cargue a la helicasa DnaB sobre el molde de la cadena retrasada, independientemente de PriA (Sandler S. et al., 1996).

Se encontraron dos trabajos publicados en los que se reporta la utilización de una mutante *recBC sbcBC priA*. En un caso se trata de la mutación *priA2::Kan* (cepa PN101, Nurse P. et al. 1991) y en el otro del alelo $\Delta priA1::kan$ (cepa AQ10429, Kogoma T. et al. 1996). Sin embargo, al solicitar estas cepas a los laboratorios correspondientes, el laboratorio del Dr. Kogoma no pudo reconstituir la cepa a partir del stock congelado y el laboratorio de K. Mariani manifestó la inquietud de que la cepa PN101 contuviera una mutación supresora en *dnaC*. Por lo tanto, se intentó construir la cepa *recBC sbcBC priA* en nuestro laboratorio, por transducción de la cepa JC7623 con un lisado del fago P1_{vir} preparado en distintas cepas que portaban la mutación *priA2::kan* o $\Delta priA1::kan$. Dado que las mutantes *priA* generan lisados de P1 con títulos muy bajos, para preparar los lisados transductores se utilizaron las cepas MB1188, MB1189 y MB1223, que portan la mutación *priA* en el genoma, pero en función de la mutación supresora en *dnaC* o del aporte plasmídico de *PriA*, generan lisados aceptables como lisados transductores (con títulos del orden de 10^9 - 10^{10} ufp/ml).

Se realizaron repetidos intentos de introducir los alelos $\Delta priA1::kan$ o *priA2::kan* en el contexto *recBC sbcBC* por transducción, tomando todos los recaudos para evitar la selección de supresores en *dnaC*. Sin embargo, no fue posible aislar ningún transductante Km^R que portara la mutación $\Delta priA1$ o *priA2::kan* en el genoma, a pesar de que los mismos lisados transductores permitían introducir estas mutaciones, con alta eficiencia, en un contexto salvaje. En función de lo descripto, se planteó la posibilidad de que la ausencia de *PriA* funcional fuera letal en el contexto *recBC sbcBC*. Con el objeto de desafiar esta hipótesis se diseñó la estrategia delineada en la Figura 63, que ha sido adaptada a partir de B. Michel et al. 2000.

Básicamente consiste en introducir en el contexto *recBC sbcBC* un plásmido con un origen termosensi-

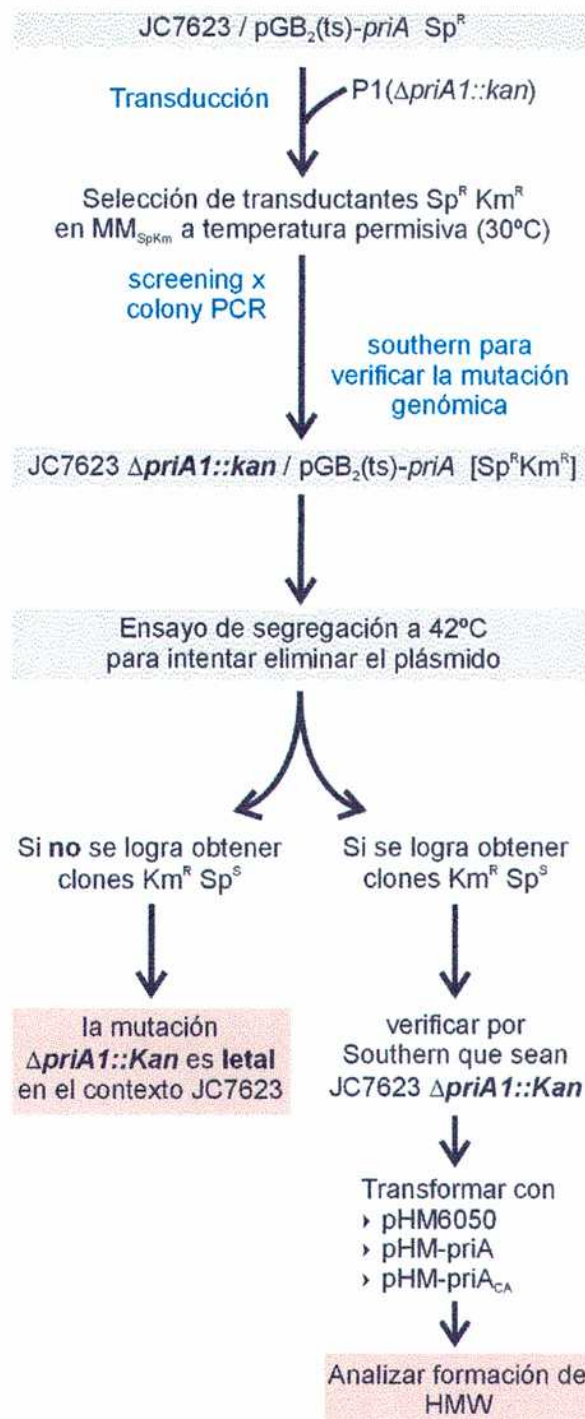


Figura 63: Estrategia para generar una cepa $\Delta priA1kan$ *recBC sbcBC*.

Transducción de la cepa JC7623/pGB₂-priA con un lisado de P1_{vir} preparado en una cepa $\Delta priA1::kan$ y selección de transductantes en medio M9_{SpKm}, a temperatura permisiva (30°C), para mantener el plásmido que expresa *PriA*. Screening por colony-PCR, para seleccionar aquellos clones $Sp^R Km^R$ que hayan incorporado el alelo $\Delta priA1::kan$ y verificación por southern. Una vez seleccionado un clon JC7623 $\Delta priA1::kan$ / pGB₂-priA, se realiza un ensayo de segregación a temperatura restrictiva para intentar eliminar el plásmido [ver detalles en Fig. 64]. En caso de aislar algún clon $Km^R Sp^S$, que pruebe por southern mantener la mutación $\Delta priA1::kan$ y no contener ninguna copia salvaje del gen *priA* en el genoma, se procede a analizar si los plásmidos pHM y pHM-priA pueden acumular HMW en este contexto genético. Si, por el contrario, no se logra aislar ningún clon $Km^R Sp^R$ implica que la mutación $\Delta priA1::kan$ es letal en el contexto *recBC sbcBC*.

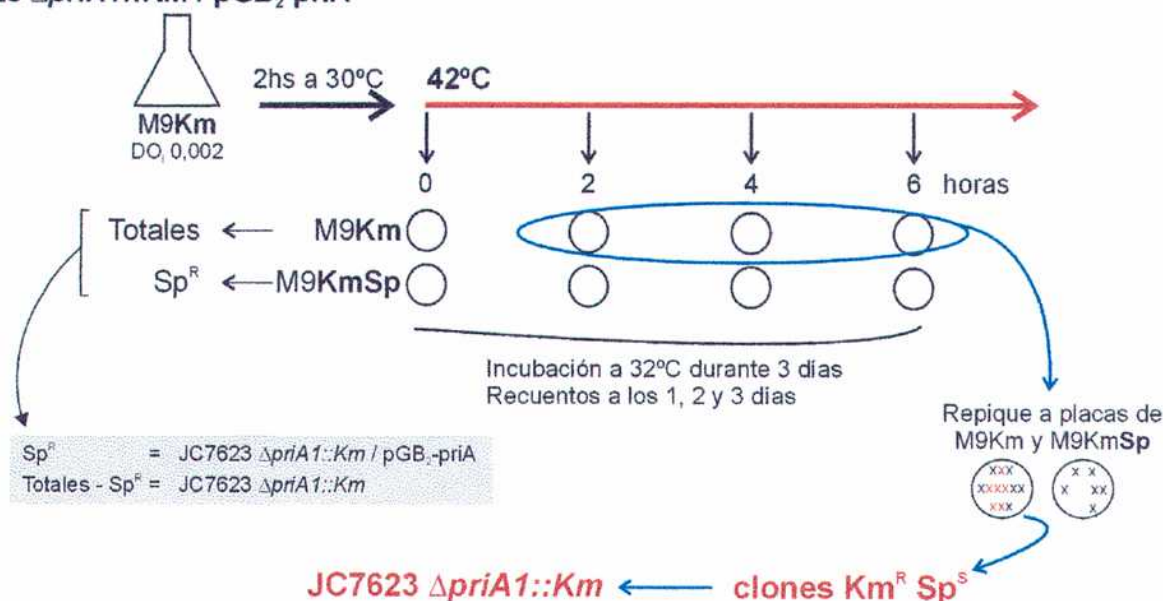
JC7623 $\Delta priA1::Km$ / pGB₂-priA

Figura 64: Cinética de segregación: esquema de la metodología empleada.

Se cultivó la cepa JC7623 $\Delta priA1::Kan/pGB_2-priA$ en M9_{KmSp} a 30°C durante la noche (ON). Se diluyó 1000 veces el cultivo en medio M9_{Km} [DOi 0,002], se incubó durante 2 horas a 30° y luego se transfirió a 42°C. Durante seis horas, se tomaron alicuotas del cultivo cada dos horas para realizar recuentos en placas de M9_{Km} y M9_{KmSp}. Las placas se incubaron a 32°C y se realizaron recuentos después de 1, 2 y 3 días. Luego se repicaron colonias de las placas de M9_{Km} correspondientes a las 2, 4 y 6 horas, a placas de M9_{Km} y M9_{KmSp}, para identificar aquellas que hubieran perdido el plásmido. A partir de los recuentos en las placas de M9_{Km} se determinó el valor de ufc/ml total (es decir células con y sin pGB₂priA), mientras que a partir de los recuentos en placas de M9_{KmSp} se calculó las ufc/ml Sp^R [JC7623 $\Delta priA1::kan/pGB_2-priA$]. Para determinar las ufc/ml de células JC7623 $\Delta priA1::kan$ carentes de plásmido [JC7623 $\Delta priA1::kan$] se restó el recuento de Sp^R al recuento de totales y se corroboró que la fracción correspondiente de colonias crecidas en las placas de M9_{Km} fuera sensible a Sp, repicando las colonias a placas de M9_{Km} y M9_{KmSp}. Cada experimento de segregación se realizó por lo menos 3 veces.

ble, que exprese PriA funcional. Introducir el alelo $\Delta priA1::kan$ por transducción, aprovechando la complementación de PriA aportada por el plásmido. Finalmente, intentar eliminar el plásmido por segregación incubando las células a temperatura restrictiva, para seleccionar algún clon *recBC sbcBC* $\Delta priA1::kan$ que haya perdido el plásmido.

Se construyó el plásmido pGB₂-priA, subclonando el gen *priA* en el vector pGB₂, que posee un origen pSC101 termosensible y un marcador de resistencia a espectinomicina (Sp^R). El crecimiento a temperatura restrictiva (42°C) le impide al plásmido replicar y conduce a la aparición de células carentes de plásmido. Para corroborar que el plásmido construido expresara PriA funcional, se verificó que fuera capaz de complementar ciertas deficiencias de una mutante $\Delta priA$. La introducción del plásmido pGB₂-priA en una cepa $\Delta priA$ favorece el crecimiento de la misma en medio rico, permite la generación de colonias visibles en 24 horas en placas de medio mínimo, y restituye la

resistencia a la luz UV al nivel de la cepa salvaje.

Se introdujo el plásmido pGB₂-priA en la cepa JC7623 por transformación. Luego se realizó un experimento de transducción de la cepa JC7623/pGB₂-priA con un lisado de P1_{vir} preparado en la cepa MB1188 [$\Delta priA1::kan/pEL042$], seleccionando los transductantes en placas de M9_{KmSp} a temperatura permisiva (30°C), para aprovechar la complementación de PriA funcional que aporta el plásmido pGB₂-priA. Se repicaron las colonias crecidas en 24 horas a nuevas placas de M9_{KmSp}. Se realizó un screening de los potenciales transductantes por PCR a partir de colonia, para identificar clones que hubieran incorporado la mutación $\Delta priA1::kan$ en el cromosoma. Los cebadores utilizados (2094 y Kan) reconocen una región de 300 pb que abarca parte de la región 5' del gen *priA* y parte del gen de resistencia a kanamicina [ver Figura 62B, fragmento rojo de 300 pb]. Este par de cebadores no produce ningún producto de amplificación a partir del gen *priA* salvaje. Al analizar los pro-

ductos de amplificación en un gel de agarosa, se comprobó que la mayoría de los clones daba un fragmento amplificado del tamaño esperado, 300 bp. Se seleccionaron 2 clones JC7623 $\Delta priA1::kan$ / pGB₂-priA para continuar con el análisis.

Estos fueron sometidos a un ensayo de segregación del plásmido a temperatura restrictiva (cada clon fue analizado en tres experimentos independientes). El objetivo de dicho experimento consiste en evaluar si es posible aislar clones que mantengan la mutación $\Delta priA1::kan$ cromosómica, a pesar de haber perdido el plásmido pGB₂-priA, debido a la incapacidad del mismo de replicar a temperatura restrictiva. En caso de aislarse algún clon que probara ser JC7623 $\Delta priA1::kan$, se podría introducir los plásmidos pHM6050 y pHM::priA, pHM::priA_[CA] en este contexto para determinar si la función PriA es esencial para la generación de HMW. Se esperaba que el vector pHM6050 no acumulara multímeros mientras que su derivado expresando PriA salvaje sí lo hiciera. En el caso de no lograr aislar un clon *recBC sbcBC* $\Delta priA$, se podría concluir que la mutación $\Delta priA$ es letal en el contexto *recBC sbcBC*, y sería necesario recurrir a otra estrategia para analizar el papel de PriA en la generación de HMW.

En la Figura 64, se ha descrito la metodología empleada para realizar los ensayos de segregación. Como primer control se sometió la cepa AB1157 $\Delta priA1::kan$ /pGB₂-priA al experimento de segregación, con el objeto de verificar que el experimento de segregación, tal como estaba planteado condujera a la segregación del plásmido y permitiera aislar clones $\Delta priA$ curados del mismo. También se analizó la cepa AB1157 $\Delta recA$ / pGB₂-priA, para determinar si exhibía diferencias en la cinética de pérdida del plásmido respecto del contexto deficiente en PriA.

Como puede verse en la figura 65, el experimento permite inducir la pérdida del plásmido y la recuperación de células curadas del mismo, independien-

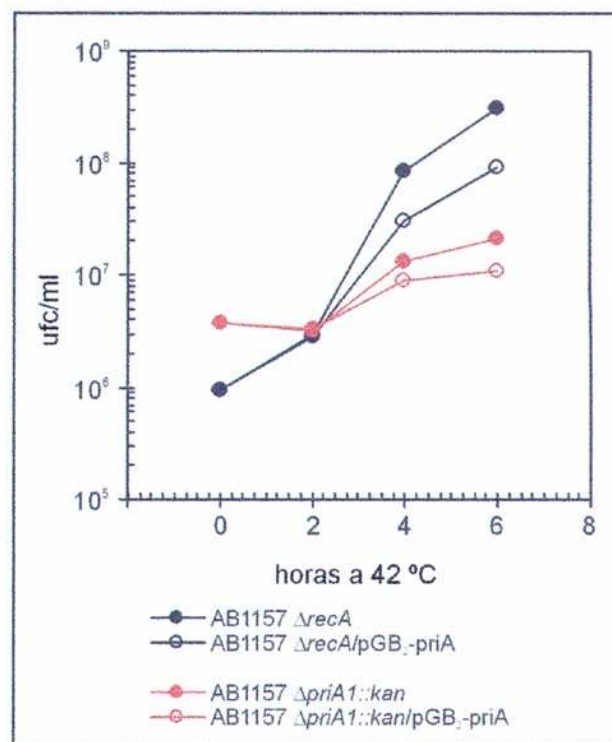


Figura 65: Verificación del plásmido pGB₂-priA y de la metodología empleada para inducir la segregación del plásmido.

Los círculos sólidos indican células curadas de pGB₂-priA y los círculos vacíos indican células que mantienen el plásmido. Se sometieron las cepas AB1157 $\Delta recA$ /pGB₂-priA y AB1157 $\Delta priA$ /pGB₂-priA a la cinética de segregación descrita en la Figura 64.

Se corroboró que mediante dicha metodología es posible inducir la pérdida del plásmido pGB₂-priA durante el crecimiento a temperatura restrictiva. En los dos casos, después de 6 horas a 42 °C se recuperan células curadas de plásmido.

temente de que las células expresen o no PriA endógeno. En el caso de la cepa AB1157 $\Delta priA$ /pGB₂-priA, después de 6 horas de crecimiento a 42 °C, un 60 % de las células está curada del plásmido. De esta manera, se corroboró que siguiendo la metodología descrita en la figura 64, es posible inducir la pérdida del plásmido pGB₂-priA por segregación, incluso de una mutante $\Delta priA$ para la cual la pérdida del plásmido que expresa PriA representa una seria desventaja.

Finalmente se sometió la cepa JC7623 $\Delta priA$ /pGB₂-priA a la cinética de segregación. En la figura 66 se han graficado los resultados obtenidos con esta cepa y su control JC7623/pGB₂-priA. En tres experimentos independientes, después de 6 horas de crecimiento a temperatura restrictiva, no se logró recuperar ningún clon JC7623 $\Delta priA$ que hubiera perdido

el plásmido. Por otro lado, a partir de las 2 horas de cultivo a 42°C los recuentos dejan de aumentar, indicando claramente que la deficiencia en PriA resulta letal en el contexto *recBC sbcBC*. Al incubar las células a temperatura restrictiva durante el crecimiento exponencial, la inactivación de la replicación del plásmido induce su segregación y las células JC7623 $\Delta priA$ curadas de plásmido que van surgiendo son incapaces de multiplicarse como para dar colonias en las placas de M9_{Km}.

No obstante, el comportamiento del control JC7623/pGB₂-priA resultaba intrigante. Este control isogénico PriA⁺ se evaluó en paralelo para corroborar que el plásmido se perdiera rápidamente al inactivar su replicación, dado que la complementación con PriA no depararía ninguna ventaja en estas células que expresan PriA endógeno. En la figura 66, puede observarse que durante la incubación a 42°C los recuentos aumentan normalmente. Sin embargo, aún después de 6 horas a temperatura restrictiva, el 100 % de las células mantiene la resistencia a espectinomicina. Este resultado tiene dos explicaciones posibles: el plásmido se integra al genoma por recombinación homóloga con el gen *priA* cromosómico, o por el contrario se mantiene como un replicón extracromosómico pero inicia su replicación independientemente de su origen.

Por southern-blot se comprobó que estas células mantenían el plásmido como una entidad independiente del genoma, aunque se acumula casi exclusivamente como HMW [Figura 67]. Por lo tanto puede descartarse la posibilidad de que el plásmido se haya integrado al genoma.

Analicemos entonces la segunda posibilidad. Si bien la temperatura restrictiva esta inactivando la replicación normal del plásmido a partir de su origen, en el contexto *recBC sbcBC* el plásmido podría replicar por el mecanismo dependiente de recombinación que se viene proponiendo e intentando probar duran-

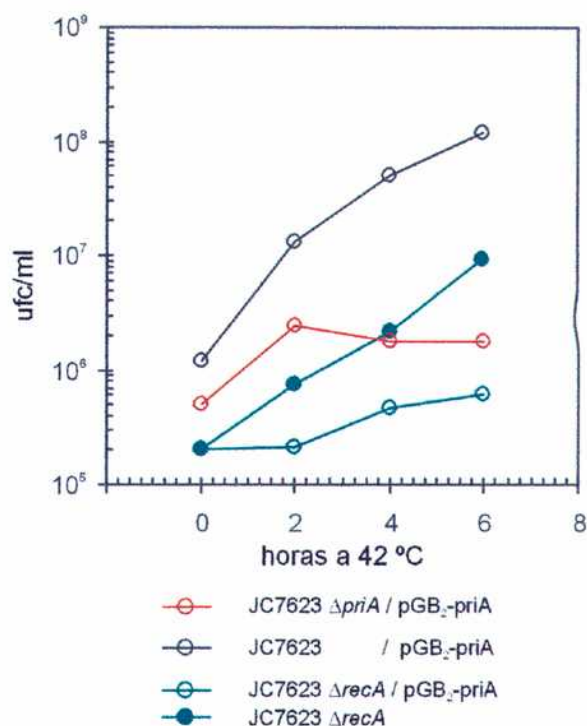


Figura 66: La mutación *priA* resulta letal en el contexto *recBC sbcBC*.

Se sometieron las cepas JC7623 $\Delta priA$ /pGB₂-priA, JC7623/pGB₂-priA y JC7623 $\Delta recA$ /pGB₂-priA a una cinética de segregación siguiendo la metodología delineada en la Figura 64. La pérdida del plásmido pGB₂-priA resulta letal en el contexto JC7623 $\Delta priA$. Por otro lado, en el contexto JC7623, no es posible inducir la segregación del plásmido, a no ser que se inactive también la replicación dependiente de recombinación anulando la actividad RecA (contexto JC7623 $\Delta recA$). Para cada cepa se realizaron 3 experimentos independientes. Se muestran los resultados de un experimento representativo. Los círculos sólidos indican células curadas de pGB₂priA y los círculos vacíos indican células que mantienen el plásmido.

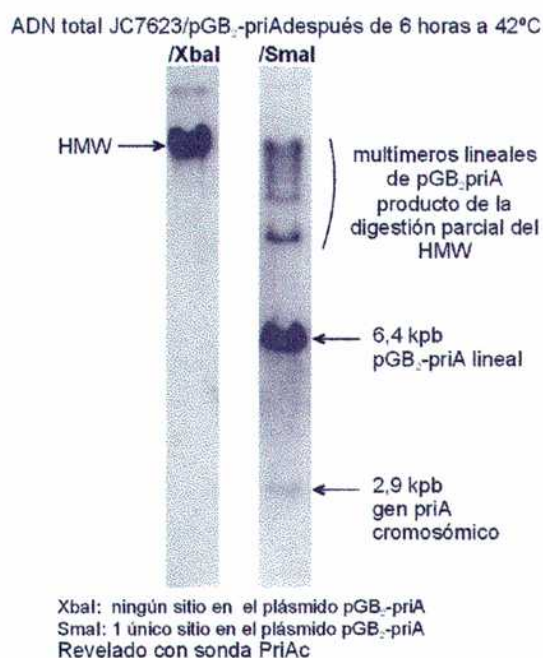


Figura 67: la cepa JC7623/pGB₂-priA mantiene el plásmido como un replicón extracromosómico.

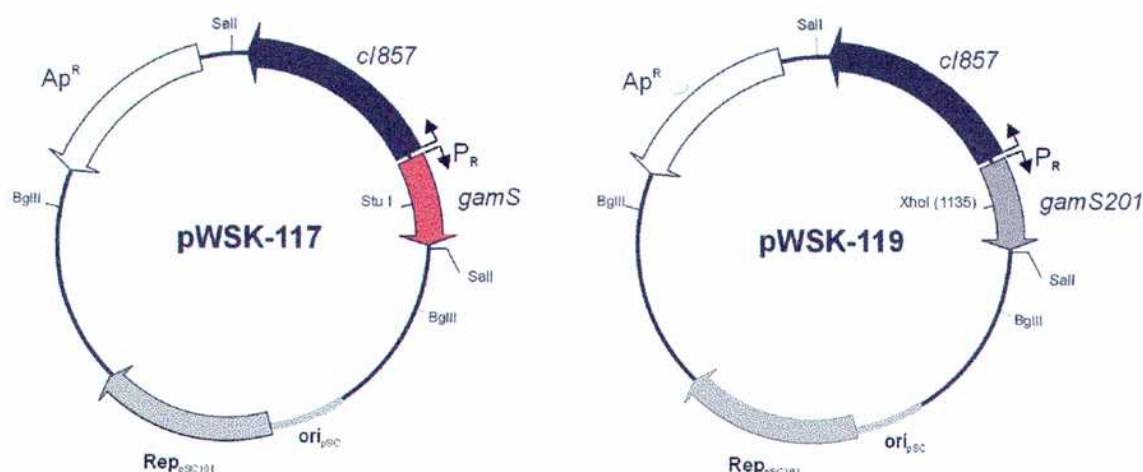


Figura 68: Plásmidos pWSK-117 y pWSK-119. Para detalles de construcción referirse a la sección 1.3.2.6 de Mat. y Met.

te el transcurso de este trabajo.

Para investigar esta posibilidad, se analizó el comportamiento del plásmido pGB₂-*priA* en un contexto JC7623 $\Delta recA$, en el cual el mecanismo de replicación mediado por recombinación debería estar anulado o al menos seriamente reducido. En la figura 66 se puede observar que, efectivamente la cepa JC7623 $\Delta recA$ /pGB₂-*priA* pierde el plásmido rápidamente durante el crecimiento a temperatura restrictiva. Después de 6 horas a 42 °C, apenas el 0,4% de las células mantiene la resistencia a espectinomicina. Por lo tanto, en ausencia de RecA funcional, las células *recBC sbcBC* no pueden mantener el plásmido durante el crecimiento a temperatura restrictiva.

Estos resultados constituyen otra comprobación de que en la cepa *recBC sbcBC* un plásmido puede replicar independientemente de su origen de replicación por un mecanismo que involucra a RecA. En cuanto al requerimiento de PriA, los experimentos detallados anteriormente no son concluyentes. Dado que la deficiencia en PriA resulta letal en la cepa JC7623 no fue posible analizar el comportamiento de los plásmidos en dicho contexto. Fue necesario recurrir a otra estrategia, que se describe en la siguiente sección.

2.1.3.2 Generación de un fenotipo transiente RecBCD⁻ en el contexto $\Delta priA$ *sbcBC sbcCD*:

Dado que la inactivación de *priA* en un contexto *recBC sbcBC* resulta letal, se recurrió a la siguiente estrategia para averiguar si en ausencia de PriA funcional pueden sintetizarse multímeros HMW en un contexto *recBC sbcBC*. Se introdujo la mutación $\Delta priA$ en el contexto *sbcBC* y luego se transformó la cepa resultante con un plásmido que expresa GamS del fago lambda en forma condicional. La proteína GamS es capaz de inhibir al complejo RecBCD. En pocas palabras, se utilizó la expresión inducible de GamS para generar un fenotipo transiente RecBCD⁻ en el contexto $\Delta priA$ *sbcB sbcCD*.

La mutante $\Delta priA$ *sbcBC sbcCD* se construyó por transducción de la cepa JC11451 [*sbcB sbcCD*] con un lisado transductor de P1 preparado en la cepa MB1188 [AB1157 $\Delta priA1::Kan$ /pEL042]. Se obtuvieron numerosos transductantes Km^R en placas de M9_{Km}, a los que se les practicó un screening por PCR a partir de colonia (utilizando los cebadores 2094 y Kan), para seleccionar aquellos que hubieran incorporado el alelo $\Delta priA1::Kan$. Un alto porcentaje de los clones analizados dió un resultado positivo en el screening por PCR (un fragmento amplificado de 300 pb), y presentaba el fenotipo característico de una mutante *priA* (tardan más de 24 horas en dar colonias visibles en

MM, presentan sensibilidad al medio rico, no permiten el establecimiento de plásmidos dependientes de PriA y presentan sensibilidad exacerbada al UV). Estos fenotipos podían ser suprimidos por transformación con un plásmido expresando PriA funcional.

Se seleccionó un clon y para comprobar que portara únicamente el alelo mutante, se corroboró por PCR que amplificaba un único fragmento de 2300 pb con los cebadores 2094 y 3359, y se verificó por southern-blot con la sonda PriAc, que el ADN cromosómico digerido con SmaI daba dos fragmentos de 2,4 y 1,6 kpb respectivamente.

En cuanto a los plásmidos utilizados para expresar GamS en forma condicional, el plásmido pSF117 es un derivado de ColE1, que porta el gen *gamS* del fago λ bajo control del promotor P_R y el represor termosensible *cl857*. La incubación a temperatura restrictiva (37°C) inactiva el represor, permitiendo la expresión de la proteína GamS que es capaz de inactivar al complejo RecBCD. Este plásmido permite generar un fenotipo RecBCD⁻ a temperatura restrictiva. Por otro lado, el plásmido pSF119 es un derivado de pSF117 que contiene un linker XhoI insertado en el sitio StuI dentro del gen *gamS* (*gamS201*). Por lo tanto expresa una proteína GamS trunca e inactiva, incapaz de inhibir a RecBCD. Este plásmido se utiliza normalmente como control negativo en aquellos experimentos que utilizan el plásmido pSF117 para inactivar a RecBCD (Friedman S.A. & Hays S.J., 1986).

Dado que el plásmido pSF117 posee un origen de tipo ColE1, es incapaz de replicar en una mutante $\Delta priA$. Por lo tanto se transfirió el fragmento de pSF117 conteniendo $\lambda cl-P_R::gamS$, a un plásmido capaz de replicar independientemente de PriA. Se subclonó un fragmento de 1,4 Kbp del plásmido pSF117 conteniendo la región [$\lambda cl-P_R::gamS$] en el sitio de clonado del vector pWSK30, que posee un origen pSC101 y un marcador de resistencia a ampicilina (Wang R.F. & Kushner S.R., 1991). El plásmido

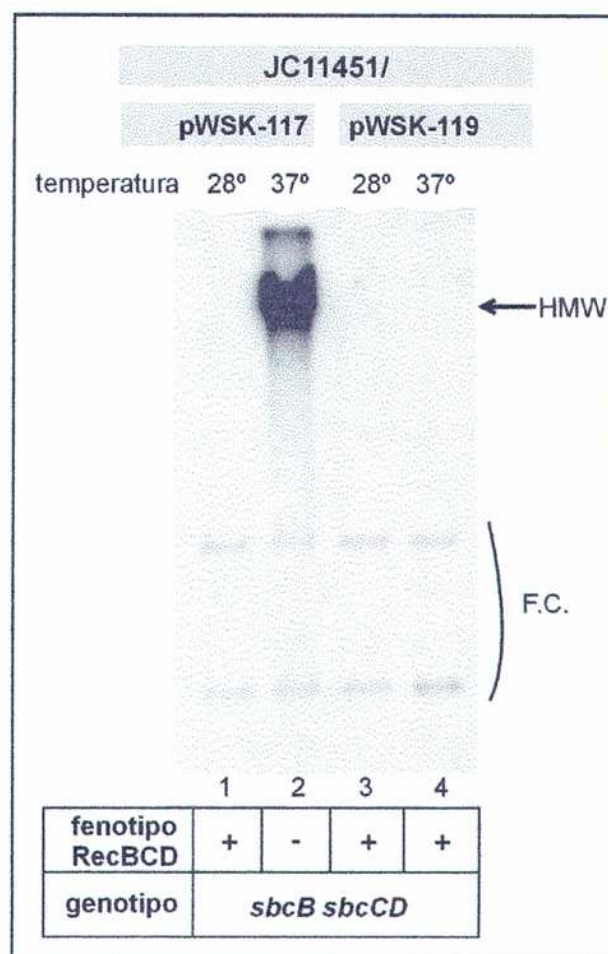


Figura 69: Verificación de los plásmidos pWSK-117 y pWSK-119.

Se cultivó las cepas JC1145/pWSK-117 y JC1145/pWSK-119 en LB_{Ap} a temperatura permisiva (28°C) o restrictiva (37°C). Transcurridas 24 horas, se aisló ADN total de cada cepa, se digirió con SfiI y se analizó por southern revelando con una sonda específica para el plásmido (Ap299).

Se comprobó que a 37°C el plásmido pWSK-117 expresa GamS funcional que inhibe a RecBCD e induce la formación de HMW en el contexto *sbcB sbcBC*. A 28°C no hay expresión de GamS y el plásmido se mantiene como formas circulares. Por otro lado el plásmido pWSK119 se mantiene como formas circulares a las dos temperaturas, dado que la proteína GamS201 que expresa es inactiva.

resultante se denominó pWSK-117. Como control, se construyó el plásmido pWSK-119 a partir del plásmido pSF119. Los plásmidos pWSK-117 y pWSK-119 fueron verificados por PCR y mapeo de restricción [Figura 68].

Para verificar la funcionalidad de los plásmidos construidos, se introdujeron en la cepa JC11451 [*sbcB sbcC*] por transformación y se cultivaron las cepas resultantes en LB_{Ap} a 28°C y 37°C durante 24 horas. Se comprobó que a temperatura permisiva (28°C) el plásmido pWSK-117 se mantiene como for-

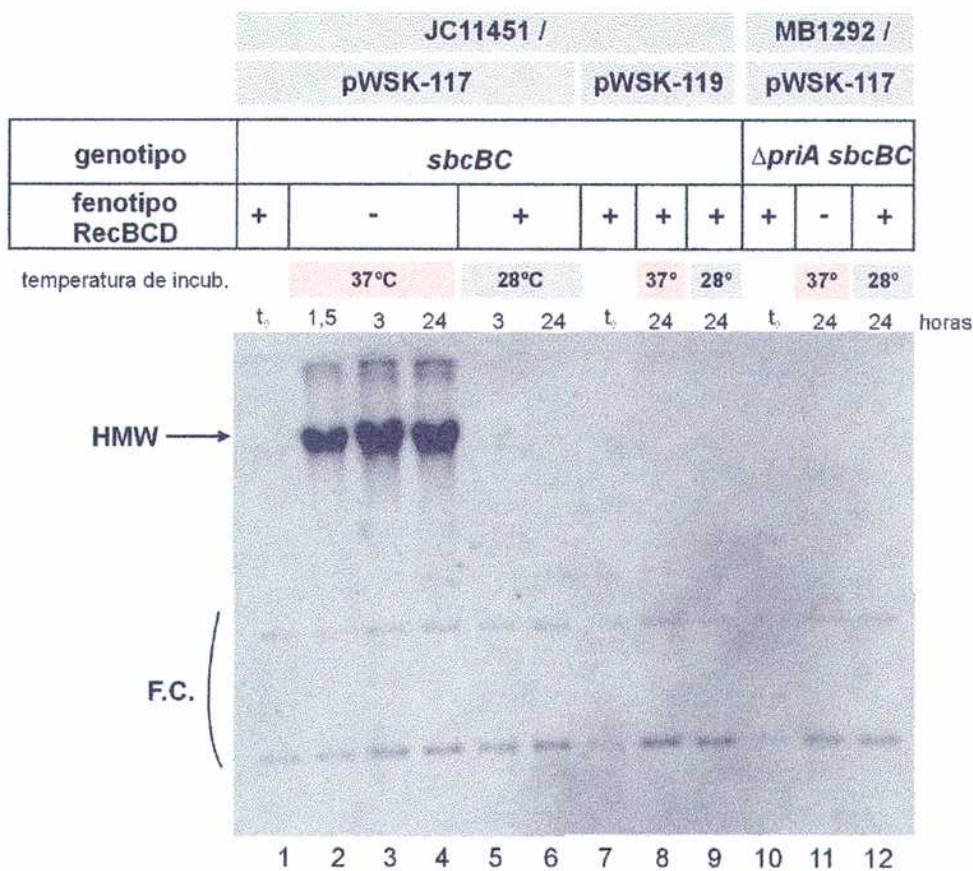


Figura 70 La inactivación de RecBCD en un contexto *sbcBC* $\Delta priA$ no induce acumulación de HMW.
Se realizaron cultivos de las cepas JC11451/pWSK117, JC11451/pWSK119 y MB1292/pWSK117 en M9(Km)Ap a 28°C con agitación (DOI: 0,015). En el caso de la cepa JC11451, cuando alcanzó una DO de 0,8 se tomó la muestra correspondiente al t₀ y se dividió el cultivo en dos partes, una se mantuvo a 28°C y la otra fue transferida a un baño a 37°C. Transcurridas 1,5, 3 y 24 horas se tomaron muestras para analizar el plásmido. Dado que la cepa MB1292 es más lenta para crecer debido a la mutación *priA*, se cultivó durante 9 horas a 28°C, hasta que alcanzó una DO de 0,2. Luego se tomó la muestra correspondiente al t₀ y se dividió el cultivo en dos partes, una se mantuvo a 28°C y la otra se incubó a 37°C. Transcurridas 24 horas se tomaron muestras para analizar el plásmido pWSK117.
Los lisados totales fueron digeridos con la enzima Sfil, que no posee sitios de corte en ninguno de los dos plásmidos y luego fueron separados en un gel de agarosa y sometidos a southern blot. La hibridación se realizó con la sonda Ap299.

contexto genético	plásmido	28°C			37°C		
		GamS	RecBCD	HMW	GamS	RecBCD	HMW
$\Delta priA$ <i>sbcB</i> <i>sbcCD</i>	pWSK-117	-	+	-	+ GamS	-	-
<i>sbcB</i> <i>sbcCD</i>	pWSK-117	-	+	-	+ GamS	-	+
	pWSK-119	-	+	-	+ GamS201	+	-

Tabla 7 La inactivación de RecBCD en un contexto *sbcBC* $\Delta priA$ no induce acumulación de HMW.

mas circulares de bajo peso molecular, mientras que a temperatura restrictiva (37°C) se acumula principalmente como HMW. De esta manera se verificó que el plásmido pWSK-117, a temperatura restrictiva expresa GamS funcional que inactiva a RecBCD, generando el fenotipo RecBCD⁻ SbcB⁻ SbcCD⁻ que resulta en la acumulación de HMW del plásmido. Por otro lado el plásmido control pWSK-119, que expresa GamS201 inactivo, se mantiene como formas circulares tanto a 28°C como a 37 °C [Figura 69].

Finalmente se analizó el comportamiento de estos plásmidos en la cepa MB1292 [$\Delta priA$ *sbcBC*]. Se analizó la cepa JC11451 [*sbcBC*] en paralelo, como control positivo. El experimento se realizó en medio mínimo M9 suplementado con ampicilina (y kanamicina en el caso de la mutante $\Delta priA$). Se realizaron cultivos en medio mínimo con agitación a 28°C hasta promediar la fase exponencial y luego se dividió el cultivo en dos partes: una se mantuvo a 28°C y la otra se transfirió a un baño a 37°C. Se tomaron muestras

a tiempo cero y transcurridas 1,5, 3 y 24 horas para analizar la formación de HMW de los plásmidos a cada temperatura [ver Figura 70].

En la tabla 6 se han resumido los fenotipos de cada cepa en función del genotipo, el plásmido portado y la temperatura de incubación; y los resultados obtenidos en cada caso. Es evidente que el plásmido pWSK-117 puede formar HMW en la cepa JC11451 [*sbcBC*] cultivada a temperatura restrictiva, pero no puede hacerlo en la cepa MB1292 [$\Delta priA$ *sbcBC*] deficiente en PriA. Este resultado demuestra que PriA es indispensable para el proceso que genera multímeros HMW en un contexto *recBC sbcBC*.

2.1.4. Las vías alternativas para generar un primosoma de reparación: mutantes *priC* y *rep*.

En la sección 4.3 de la Introducción se mencionó la existencia de por lo menos tres vías alternativas para ensamblar un primosoma de reparación. Dos de ellas dependientes de PriA (y de PriB o PriC); y una tercer vía independiente de PriA que dependería de PriC y Rep para reconocer la estructura de la horquilla dañada/procesada y ensamblar el primosoma de reparación.

Con el propósito de evaluar la injerencia de las distintas vías alternativas en el inicio de la replicación independiente del origen que conduce a la formación de HMW, se analizó el efecto de inactivar *priC* o *rep* en la acumulación de HMW.

2.1.4.1 La vía independiente de PriA: mutantes *rep*.

En 1997, B. Michel reportó que inactivar *rep* resulta letal tanto en el contexto *recBC* como en uno *recBC sbcB₁₅ sbcC* [JC7623], en el cual la vía RecF de recombinación debería ser capaz de procesar extremos doble cadena con mayor eficiencia, en función de la inactivación de las nucleasas SbcB y SbcCD (Michel B. et al. 1995). Por alguna razón, la ausencia

de Rep funcional le impide a la vía RecF reparar las horquillas bloqueadas y reiniciar la replicación, y esto resulta letal para la célula.

Más tarde se descubrió que era posible introducir la mutación *rep* en un contexto *recBC $\Delta sbcB$ sbcCD*. La delección del gen *sbcB* parecía suprimir la letalidad de combinar la mutación *rep* con una mutación *recBC*. Para explicar estas observaciones, Michel propuso que la mutación *sbcB15* presente en la cepa JC7623, al generar una proteína SbcB inactiva como exonucleasa, pero que mantiene la capacidad de unirse a extremos simple cadena, puede bloquear el procesamiento de la horquilla dañada o el reinicio de la replicación en un contexto deficiente en Rep. En otras palabras, en un contexto en el cual el colapso de horquillas de replicación está exacerbado en función de la deficiencia en RecBCD, se requeriría de Rep para desplazar a SbcB y permitir la reparación de la horquilla. La delección del gen *sbcB* eliminaría la necesidad de desplazar a la nucleasa inactiva. De ahí que las mutantes *rep recBC $\Delta sbcB$ sbcCD* sean viables.

En función de lo expuesto se utilizaron las cepas JJC865 [*recB₂₇₀ recC₂₇₁ $\Delta sbcB$ sbcC*] y JJC892 [JJC865 Δrep] para analizar el papel de Rep en la generación de multímeros. Las mutaciones *recB₂₇₀* y *recC₂₇₁*, generan una mutante *recBCD* termosensible que a temperatura permisiva exhibe un fenotipo ExoV⁻ mientras que a temperatura restrictiva exhibe un fenotipo RecBCD⁻ (ExoV⁻ y Rec⁻) (Kushner S.R., 1994 a y 1994b; Seignerur M. 1999). Se incluyó la cepa JJC858 [*recB21 recC22 $\Delta sbcB$ sbcCD*] para compararla con la cepa JC7623, con el objeto de determinar si la delección del gen *sbcB* afectaba la generación de multímeros. Por otro lado el análisis de JC7623 a 30 y 42 °C nos permitió evaluar si el cambio de temperatura influía de alguna manera en los resultados.

Se analizaron derivados de las cuatro cepas con-

teniendo el plásmido pUCres. Las cepas fueron cultivadas ON a 30°C en caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes [LB_{ATB}] y al día siguiente se diluyeron en dos condiciones distintas [LB_{ATB}] y [LB_{ATB} glucosa 0,2%], para realizar cultivos a 30° y 42°C. Transcurridas 24 horas, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos y plaqueo en LB y LB_{Ap}, para estimar la viabilidad y el % de células Ap^R; y se analizó el plásmido pUCres para evaluar la capacidad de cada cepa de formar HMW en las distintas condiciones de cultivo [ver Figuras 71 y 72].

Si analizamos los resultados correspondientes a la condición [LB] es evidente que la cepa JJC858 acumula tantos multímeros del plásmido pUCres como la cepa JC7623 (Fig. 72, comparar calles 3/4 con 1/2). Por lo tanto, en un contexto Rep⁺, la mutación *sbcB*₂₁ y la delección completa del gen activan o permiten, en igual medida, la formación de HMW en un contexto *recBC sbcC*. Por otro lado, en las dos cepas el choque térmico parece amplificar el fenómeno de acumulación de HMW y reducir la viabilidad del cultivo.

La cepa JJC865, a 30°C acumula una baja proporción de HMW en función de su fenotipo ExoV⁻, pero a temperatura restrictiva llega a acumular un 50% de HMW. Su derivado Δrep , la cepa JJC892, acumula una gran proporción de HMW a temperatura restrictiva. Por lo tanto la vía alternativa dependiente de Rep no parece participar en la formación de HMW [Figura 72 A]. Por el contrario, la ausencia de Rep funcional parece exacerbar la formación de HMW en un contexto $\Delta sbcB sbcC$ al inactivar RecBC.

Al analizar los resultados correspondientes a la condición [LB glucosa], salta a la vista que combinar el agregado de glucosa al medio con el choque térmico, resulta en una caída muy importante de la viabilidad y una disminución en la proporción de HMW respecto del porcentaje observado para el choque térmico en [LB] [Figura 72; comparar calles 2 y 4 de la sección B con las de la sección A]. En esta condición de

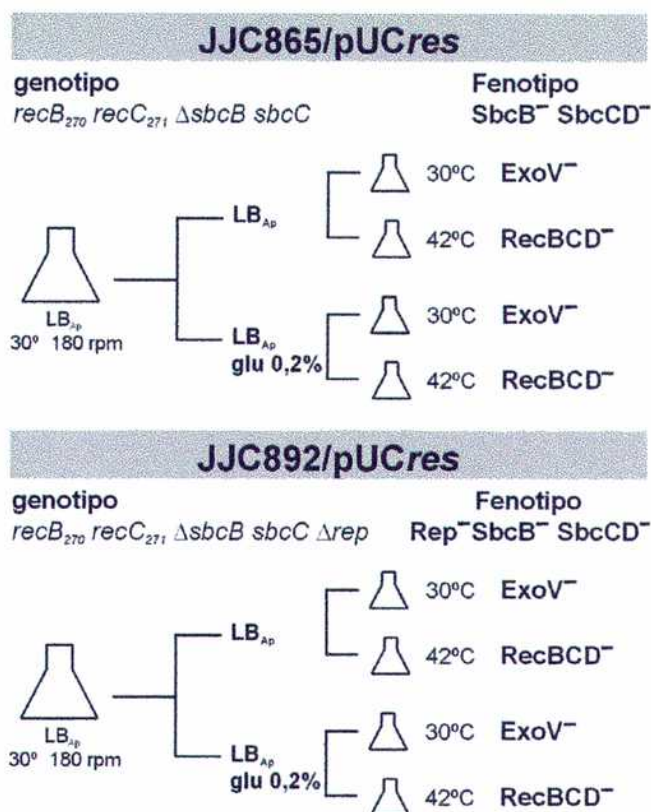


Figura 71 Mutantes *rep*: esquema del experimento.

Las mutaciones *recB*₂₇₀ y *recC*₂₇₁ generan una proteína RecBCD que a 30°C no posee actividad exonucleasa pero mantiene la actividad recombinogénica [ExoV⁻ Rec⁺]; mientras que a temperatura restrictiva (42°C) se comporta como una mutante nula [ExoV⁻ Rec⁻].

Se realizaron cultivos durante 24 horas en LB_{ATB} a 30°C y se utilizaron para inocular cultivos en LB_{ATB} y LB_{ATB} glucosa 0,2%, a 30 y 42 °C. En el borde derecho de la figura se especifica el fenotipo logrado en cada caso.

cultivo, la generación de HMW también sería independiente de Rep.

Existe cierta controversia acerca del papel fisiológico de la helicasa Rep *in vivo*. Por un lado S. Sandler y colaboradores sostienen que Rep participa de una vía alternativa de ensamblaje del primosoma de reparación independiente de PriA, basándose en un análisis genético que indica que la inactivación concomitante de *priA* y *rep* es letal.

B. Michel propone una hipótesis alternativa, en función de evidencias que indican que inactivar RecBCD en un contexto deficiente en Rep es letal. Esta letalidad está relacionada con la generación de rupturas en el genoma por acción de RuvABC y puede suprimirse inactivando *ruvAB*. Las mutantes *rep* replican su genoma con mucha menor velocidad

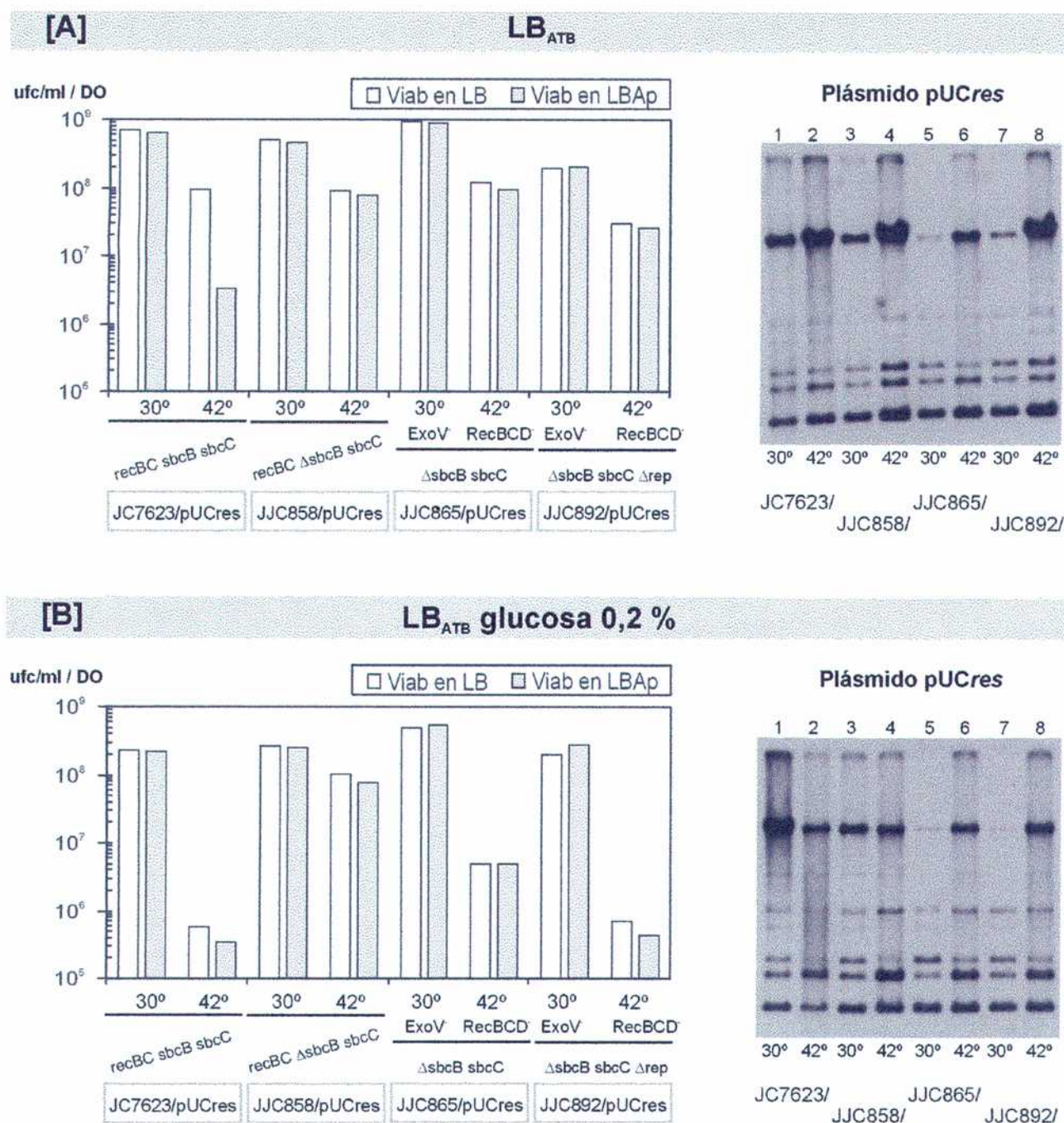


Figura 72 Mutantes *rep*: viabilidad, mantenimiento del plásmido y análisis del plásmido pUCres.

En la sección A de la figura se muestran resultados correspondientes a la condición LB_{ATB} y en la sección B se analiza la condición LB_{ATB} glucosa. Para cada condición de cultivo se presentan datos de viabilidad en placas de LB y LB_{Ap}. La comparación de la viabilidad en LB_{Ap} y LB, permite estimar la proporción de células que mantiene el plásmido. Junto al gráfico de barras se presentan resultados representativos del análisis del plásmido pUCres en las distintas cepas cultivadas durante 24 horas a 30 y 42 °C.

que una cepa salvaje y se ha demostrado *in vitro* que la helicasa Rep es capaz de desplazar proteínas unidas al ADN. El modelo propuesto por Michel sostiene que, en ausencia de Rep funcional, el replisoma se topa frecuentemente con complejos proteicos unidos al ADN que impiden su avance. El bloqueo de la horquilla, puede ser superado por regresión de

la misma y su posterior procesamiento para generar un Edc que puede ser reparado por recombinación mediada por RecBCD y RecA, o simplemente degradado por la actividad ExoV de RecBC. En ambos casos se requiere de PriA para ensamblar el primosoma de reparación y reiniciar la replicación. Michel sostiene que en ausencia de helicasa Rep,

que despeje el ADN de proteínas que puedan bloquear el avance del replisoma, el bloqueo de la horquilla es tan frecuente que las células dependen de PriA para lograr completar sus ciclos de replicación.

Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, ya que en la condición [LB] la inactivación de Rep parece incrementar la generación de HMW. La ausencia de Rep podría incrementar el bloqueo de la replicación del plásmido y la consecuente acumulación de intermediarios que derivarían en la síntesis de multímeros.

2.1.4.2. La vía PriA/PriC: mutantes *priC*.

Se introdujo la mutación *priC303* en el contexto *recBC sbcBC* por transducción, y se analizó la capacidad de la cepa resultante [*recBC sbcBC priC*] de acumular HMW del plásmido pUCres.

En la Figura 73 se puede ver que la inactivación de *priC* no modifica en absoluto la capacidad de la cepa JC7623 de acumular HMW (comparar calles 4 y 1). Por lo tanto, las células *recBC sbcBC* deficientes en PriC pueden utilizar la vía PriA/PriB para ensamblar un primosoma de reparación que les permita iniciar la replicación del plásmido independientemente de su origen.

Sin embargo, no se puede descartar que en la cepa JC7623 este primosoma pueda ensamblarse por cualquiera de las dos vías dependientes de PriA.

2.2 Vía RecB Vs. vía RecF

Se ha reportado que las mutantes *recD* (ExoV⁻ Rec⁺) acumulan HMW (Niki H. et al, 1990) y en la sección 2.1.4.1 se demostró que a 30°C las mutantes *recBC(ts) sbcBC* acumulan una mínima proporción de HMW, en función de su fenotipo ExoV⁻. Con el objeto de comparar la competencia de las vías RecBC y RecF para promover la generación de HMW, se recurrió a las mutantes *recC1010*. En estas mutantes está

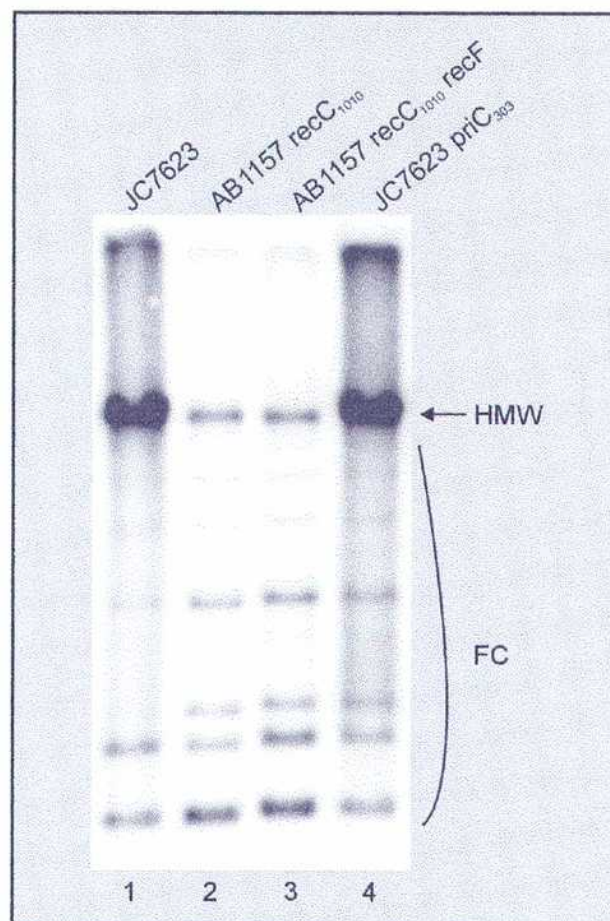


Figura 73 Mutantes *priC* y mutantes *recC1010*.

En esta figura se presentan los resultados correspondientes a dos experimentos. El primero se propone analizar el papel de PriC en la generación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*. Se cultivó la cepa JC7623 *priC* conteniendo el plásmido pUCres en LB_{ATB} a 32°C y transcurridas 24 horas de cultivo se analizaron las formas del plásmido pUCres. La cepa JC7623 se analizó en paralelo como control. Comparar calles 4 y 1.

El segundo experimento intenta comparar la eficiencia de generación de HMW por la vía RecF y RecB. Con este objetivo se analizaron las cepas *recC1010* y *recC1010 recF*. La mutación *recC1010* genera una proteína RecBCD que carece de actividad exonucleasa pero tiene capacidad recombinogénica [ExoV⁻ Rec⁺]. Es capaz de cargar a RecA sobre el ADN que desenrolla mediante su actividad helicasa, independientemente de que el sustrato posea o no un sitio χ . En la cepa *recC1010* están 'activas' la vía RecBC y la vía RecF, mientras que en la cepa *recC1010 recF* sólo permanece activa la vía RecB (que en este contexto, en función de la mutación en *recC* funciona independientemente de las secuencias χ). Comparar calles 1, 2 y 3.

alterada la actividad del complejo RecBCD: carece de actividad ExoV pero mantiene la actividad helicasa y la capacidad de ir cargando a RecA sobre una de las cadenas del dúplex que va desenrollando. Por lo tanto, la mutante RecBC₁₀₁₀D mantiene la actividad recombinogénica. Sin embargo, cataliza el cargado de RecA independientemente de que el sustrato contenga o no un sitio χ (Kuzminov A. & Stahl F.W., 1999;

Churchill J.J. et al., 1999). Esto permite analizar el efecto de la vía recombinogénica RecBC sobre la replicación de una plásmido que carece de sitios χ , independizándose de la actividad ExoV, que degradaría cualquier intermediario conteniendo un Edc [ver sección 3.2 Introducción].

Se comparó la capacidad de las mutantes *recC*₁₀₁₀ y *recC*₁₀₁₀ *recF*, de acumular HMW del plásmido pUCres, respecto de la cepa control JC7623. En la figura 73 se puede ver que tanto la mutante *recC*₁₀₁₀ (vías RecB⁺ RecF⁺) como la mutante *recC*₁₀₁₀ *recF* (vías RecB⁺ RecF⁻), acumulan muy baja proporción de HMW. Se deduce que en un contexto ExoV⁻, la actividad recombinogénica catalizada por RecBC₁₀₁₀D evita que el plásmido se involucre activamente en la generación de multímeros. RecBC₁₀₁₀D podría reparar por recombinación los intermediarios de replicación dañados del plásmido, evitando que éstos se involucren en la síntesis de HMW. Dado que la mutante *recC*₁₀₁₀ *recF* no acumula menor proporción de HMW que la mutante *recC*₁₀₁₀, el complejo RecBC₁₀₁₀D parece captar, con mayor eficiencia que RecF, los potenciales sustratos para la generación de HMW, reencausándolos en el ciclo normal de replicación. Sólo en ausencia de RecBCD (cepa JC7623), la vía RecF sería capaz de derivar los intermediarios de replicación del plásmido hacia la síntesis de HMW.

2.3. Reinicio de la replicación

Pol III sintetiza los multímeros HMW: en una mutante *dnaE*(Ts) no se genera HMW a temperatura restrictiva.

Con el objeto de determinar si la holoenzima Pol III esta involucrada en la síntesis de HMW, se construyó la cepa MB1123 [JC7623 *dnaE486::tn10*(Tc)]. La mutación *dnaE486*, genera una subunidad α termolabile, incapaz de catalizar la síntesis de ADN a temperatura restrictiva. Por lo tanto, las células que portan esta mutación son incapaces de crecer a tem-

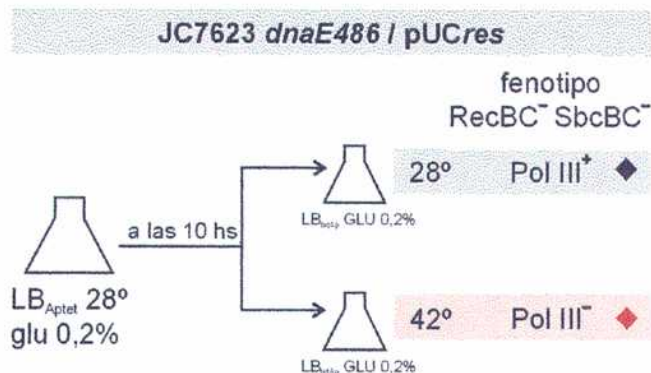


Figura 74 Mutante *dnaE*(Ts): esquema del experimento.

Se cultivó la cepa JC7623 *dnaE486* / pUCres en LB_{ATB} a 28°C con agitación (180 rpm). Transcurridas 10 horas, se dividió el cultivo en dos partes; una se continuó incubando a 28°C y la otra se transfirió a temperatura restrictiva (42°C). La incubación a temperatura restrictiva genera una subunidad α inactiva que inhabilita a la holoenzima Pol III para la síntesis de ADN. En el borde derecho de la figura se especifica el fenotipo logrado en función de la temperatura de incubación.

A distintos tiempos se tomaron muestras para determinar la actividad replicativa y analizar las formas del plásmido. Los pulsos de [³H]-timidina se realizaron en un baño a 28°C o 42°C según correspondiera.

peratura restrictiva en función de la imposibilidad de replicar su genoma.

En la sección 1.2.2 se reportó que en la condición [LB glucosa], los multímeros HMW comienzan a acumularse durante las primeras horas de la fase estacionaria, una vez que la célula terminó de replicar su genoma. Por lo tanto para determinar si podían generarse multímeros HMW en ausencia de Pol III funcional, se utilizó la cepa MB1123/pUCres cultivada en [LB glu] para inactivar Pol III una vez establecida la fase estacionaria. Se procesó la cepa JC7623/pUCres en paralelo como control.

Las dos cepas fueron cultivadas en LB_{ATB} glucosa 0,2% a 28°C, y transcurridas 10 horas de cultivo se dividieron los cultivos en dos partes; una se mantuvo a 28°C y la otra se transfirió a un baño a 42°C. Se continuó incubando con agitación y se tomaron muestras cada hora para estimar actividad replicativa determinando la incorporación de [³H]-timidina al material insoluble en ácido; y cada dos horas para analizar el plásmido pUCres por southern [ver Figuras 74 y 75].

La cepa MB1123/pUCres, al ser transferida a tem-

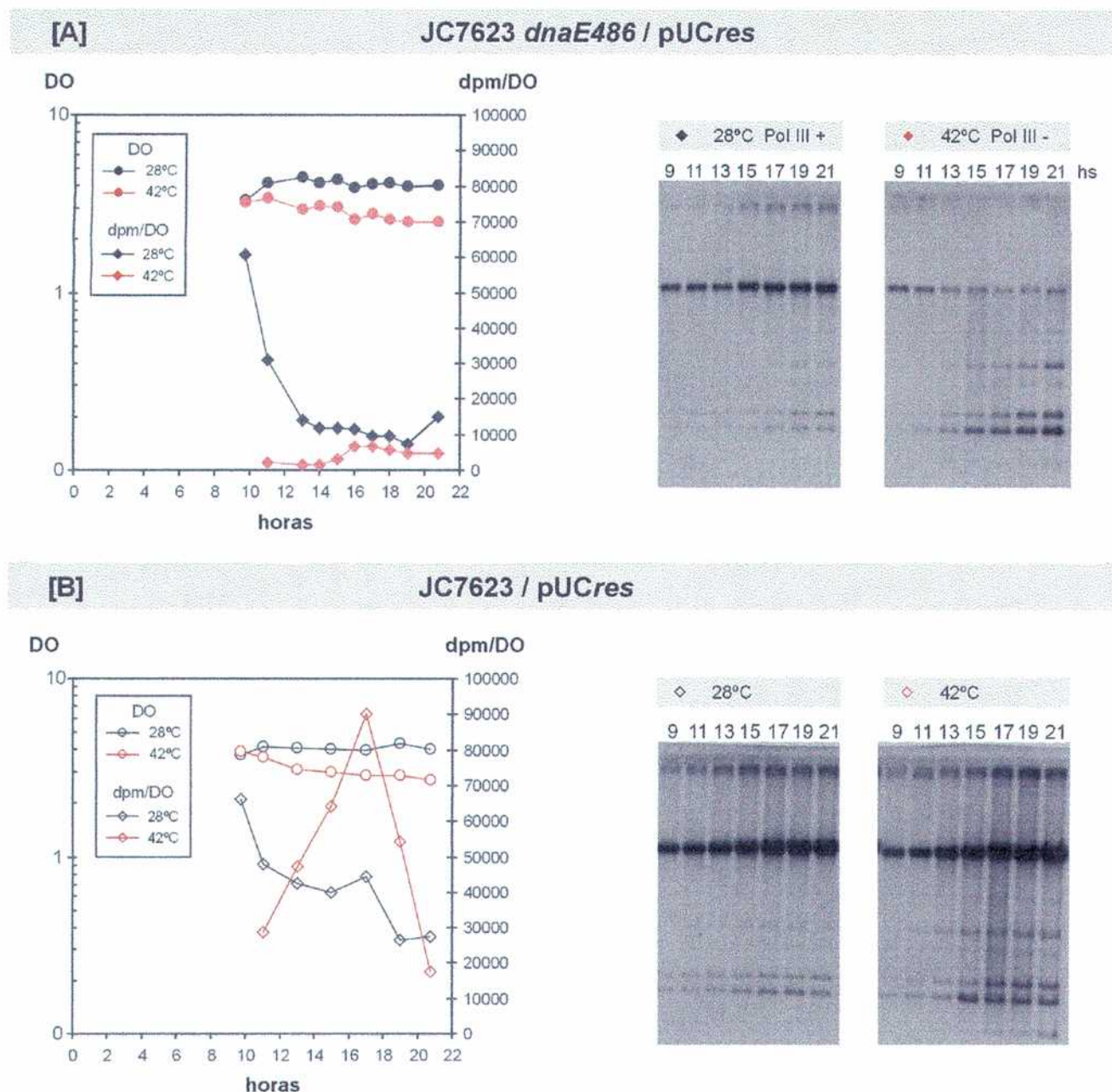


Figura 75 Mutante *dnaE(Ts)*: la inactivación de Pol III anula la generación de HMW durante la FE.

Se presentan las curvas de DO e incorporación de [3 H]-timidina y el análisis del plásmido pUCres durante la FE temprana, al cultivar la cepa JC7623 *dnaE486* en condiciones tales que anulan o no a Pol III. La cepa JC7623 se analizó en paralelo como control, para descartar efectos debidos al choque térmico.

peratura restrictiva sufre un arresto inmediato de la replicación que se evidencia como una caída abrupta en la incorporación de [3 H]-timidina. Al analizar el plásmido, se puede ver que en el cultivo incubado a 28°C, a partir de las 15 horas aumenta ligeramente la proporción de HMW, mientras que en el cultivo a 42°C, no sólo no aumenta sino que disminuye. Esta disminución se debe, en parte, a que la señal corres-

pondiente al HMW se mantiene igual o disminuye ligeramente, mientras que la señal correspondiente al ccc comienza a aumentar a partir de las 15 horas.

El aumento en la proporción de ccc, también se registra para la cepa control y probablemente esté relacionado con el sistema de control del número de copias del plásmido [desarrollado en la sección 1.2.2 de la Introducción]. Se ha reportado que el plásmido

pUC contiene una mutación puntual en la secuencia del RNA II (respecto de la secuencia en pBR322), que lo vuelve termosensible para su interacción con el antisentido RNA I. Aparentemente, a 42°C el RNA II sufre un cambio conformacional que determina que esté desfavorecida su interacción con el ARN antisentido RNA I, responsable de controlar la frecuencia de iniciación de la replicación (Lin-Chao S. et al., 1992).

Por lo tanto a 42°C el plásmido pUC posee un mayor número de copias que a 28°C. El aumento en la intensidad de la señal correspondiente al ccc, probablemente responda a este fenómeno. Al transferir las células a 42°C, la imposibilidad del RNA II de interactuar con el RNAI, permite el inicio de la replicación del plásmido a partir de su origen, generando cierto incremento en el número de copias del mismo. Esto se evidencia como una leve y acotada actividad replicativa y un aumento del ccc a partir de las 15 horas. Esta replicación sería catalizada por Pol I o alguna de las polimerasas que se induce durante la respuesta SOS [Pol II, PolIV o PolV]. Sin embargo, resulta evidente que la o las polimerasas capaces de replicar, en cierta medida, el plásmido a partir de su origen de replicación, son incapaces de sintetizar multímeros HMW.

Con respecto al control, JC7623/pUCres, se puede destacar que la incubación a 42°C exacerba el fenómeno de replicación de fase estacionaria. El estrés térmico podría provocar este efecto al afectar el normal progreso de la replicación (por la inactivación de una o más proteínas involucradas en este proceso o en el procesamiento de horquillas de replicación bloqueadas) e incrementar de este modo los intermediarios de replicación dañados que derivarían en la generación de multímeros.

Otra posibilidad sería que la inducción de genes pertenecientes al regulón σ^H incrementara la capacidad de síntesis de multímeros.

3 Discusión

En la sección 1.1, se demuestra genéticamente que existen dos caminos alternativos para generar HMW en un contexto *recBC sbcBC*. Uno de ellos, se evidencia en la condición [LB] y es estrictamente dependiente de RecA. Dado que en un contexto incapaz de inducir el regulón SOS, niveles basales o constitutivamente altos de RecA (generados por la mutación *recAo98*), aseguran que se acumule el porcentaje de HMW característico de la condición [LB], concluimos que la función de RecA necesaria para generar HMW por esta vía es la función de recombinasa. La generación de HMW por esta vía puede prevenirse mediante la resolución eficiente de multímeros circulares por acción de un sistema de resolución. Por lo tanto, este mecanismo utilizaría multímeros circulares del plásmido como intermediarios obligados en la generación del HMW. Se propone un modelo de replicación-dependiente-de-recombinación [RDR], que involucraría varias rondas sucesivas de invasión de un multímero lineal por parte de otro e inicio de la replicación sobre el intermediario de recombinación, conduciendo a la generación de multímeros progresivamente más largos.

El segundo mecanismo podría generar multímeros independientemente de RecA y parece estar habilitado o exacerbado durante el crecimiento en [LB glu]. A juzgar por la incapacidad de la mutación *recAo98* de restaurar la máxima acumulación de HMW alcanzable en [LB glu] en mutantes *lexA3*, ciertas funciones SOS contribuirían a la generación de HMW en esta condición de cultivo.

La inactivación del regulador maestro de la RGE reduce el máximo porcentaje de HMW alcanzado en [LB glu], por lo tanto algunos genes pertenecientes a este regulón, que se induce durante la transición hacia la FE, estarían involucrados en la actividad de síntesis de ADN que deriva en la amplificación desregulada del plásmido característica de esta

condición.

En la sección 1.3.1 de Resultados-Capítulo 1, se demostró que en [LB glu] se produce mayor amplificación del plásmido respecto del genoma y se acumula mayor proporción de HMW que en [LB]. Este efecto denominado 'efecto glucosa' tiene dos explicaciones posibles. Una de ellas es que el metabolismo de la glucosa genere mayor cantidad de intermediarios de replicación dañados del plásmido tendientes a involucrarse en la generación de multímeros. En la sección 1.3.4 de dicho capítulo, no se logró comprobar una relación directa entre la suplementación del medio con glucosa y el daño oxidativo. No obstante, se presentan indicios de que el crecimiento en presencia de glucosa pero con baja disponibilidad de oxígeno, suprime la caída de viabilidad del cultivo y la amplificación exacerbada del plásmido; indicando que parte del efecto glucosa está relacionado con la forma en la cual la célula la metaboliza.

La segunda explicación supone que durante el crecimiento en [LB glu], el agotamiento de la glucosa o la acumulación de acetato que se produce hacia el final de la fase exponencial, dispara la RGE y tal vez otras respuestas de estrés específicas (ej: respuesta al estrés ácido). Algunos de los genes inducidos contribuirían a la gran amplificación que experimenta el plásmido durante las primeras horas de la FE. Por último, cabe considerar que las dos explicaciones contribuyan a explicar el 'efecto glucosa'. Es decir, que por un lado el crecimiento en presencia de glucosa con una alta disponibilidad de oxígeno determine que se genere una mayor cantidad de intermediarios dañados del plásmido y a esto se le suma la inducción de genes, durante la fase de transición, que encaucen esos intermediarios hacia la generación de HMW. Dado que la mutante *rpoS* presenta mayor proporción de HMW en [LB glu] que en [LB], pero por otro lado no logra alcanzar la máxima acumulación de HMW que presenta la cepa control en [LB glu], con-

sideramos que el 'efecto glucosa' resulta de una conjunción de las dos explicaciones propuestas.

Luego se intentó averiguar si la proteína PriA cumplía algún papel en la generación de multímeros. En una primera etapa se comprobó que sobre-exresar PriA a partir de un plásmido en el contexto *recBC sbcBC*, triplicaba la relación HMW / FC del plásmido. Sin embargo, si la proteína PriA tiene anulada la función de 'ensamblaje de primosomas' (mutante PriA_{CA}), no logra incrementar la generación de HMW respecto del vector control. El plásmido utilizado para expresar PriA es un derivado de R1, no posee sitio PAS (sitio de ensamblaje de primosoma, dependiente de PriA) y normalmente replica independientemente de esta proteína. Por lo tanto, estos resultados constituyen un primer indicio de que PriA estaría involucrada en el inicio ectópico de la replicación y la generación de HMW.

No fue posible inactivar *priA* en la cepa JC7623 (ni en las cepas JJC858 o JJC865) para analizar si se podía generar HMW en un contexto *recBC sbcBC* deficiente en PriA. Por lo tanto, se recurrió a la inactivación de RecBCD por des-represión regulable del gen *gamS*, para generar un fenotipo RecBCD⁻ en el contexto $\Delta priA sbcB sbcCD$. En este experimento, el mismo plásmido a partir del cual se expresa GamS en forma condicional, se utiliza para analizar la formación de HMW. Es un derivado de pSC101 y replica independientemente de PriA. Se comprobó que al inactivar RecBCD en un contexto $\Delta priA sbcBC$, el plásmido es incapaz de acumular HMW. Después de transcurridas dos generaciones y más de 16 horas en ausencia de RecBCD, solo se detectan formas circulares del plásmido; mientras que en un contexto isogénico PriA⁺, se registra una activa amplificación del plásmido y a las dos horas se detecta principalmente como HMW.

Por lo tanto, en un contexto RecBC⁻ SbcBC⁻, en ausencia de PriA, el plásmido puede replicar normal-

mente, pero no pueden generarse multímeros de alto peso molecular. El efecto de inactivar PriA es incluso más terminante que el de inactivar RecA, ya que en la mutante *recA* siempre se detecta aunque sea un mínimo de 10 % de HMW (por ej. en LB). Inactivar PriA anula todo mecanismo de generación de HMW.

En lo referente a las vías alternativas para generar un primosoma de reparación, inactivar *rep* parece incrementar la generación de multímeros durante el crecimiento en [LB], argumentando a favor del modelo propuesto por B. Michel y colaboradores, que sostiene que Rep no participa del ensamblaje del primosoma de reparación, sino que actúa por delante del replisoma despejando el dúplex parental de proteínas que puedan bloquear el avance de la horquilla de replicación. La inactivación de PriC no afecta el porcentaje de HMW acumulado. Por lo tanto, en la cepa JC7623 el primosoma de reparación que deriva en la generación de multímeros, normalmente se ensambla por la vía PriA/PriB; o por ambas vías, pero en ausencia de PriC, la vía PriA/PriB puede compensar totalmente su ausencia.

También se comprobó que se requiere de la holoenzima Pol III para sintetizar los multímeros HMW. Una vez ensamblado el primosoma de reparación que permite sintetizar el cebador de la cadena retrasada, se requiere de Pol III para sintetizar el multímero.

Por último, cabe mencionar que en varios experimentos en los que se emplean sistemas regulables por temperatura, se observó que la incubación a 42°C exagera en cierta manera la amplificación del plásmido respecto del genoma y la acumulación de HMW (secciones 2.1.4.1 mutantes *rep* y 2.2 mutante *dnaE(Ts)*). Nuevamente se plantean dos posibilidades. La situación de estrés térmico podría afectar la actividad de proteínas involucradas en replicación e incrementar la frecuencia de bloqueo del replisoma y la generación de intermediarios del plásmido tendien-

tes a involucrarse en la producción de HMW. Alternativamente, algunos de los genes inducidos en respuesta al estrés térmico, podría participar en la generación de los multímeros. En función del conocimiento que se posee actualmente acerca de la respuesta al estrés térmico y los genes inducidos durante la misma, favorecemos la primer hipótesis. A continuación, se presenta una breve síntesis respecto de este tema.

La incubación a 42°C activa la traducción del RNAm de *rpoH* e incrementa la estabilidad del factor σ^H , y esto resulta en la inducción de genes del regulón σ^H (antes denominado σ^{32}). Este regulón agrupa proteasas y chaperonas responsables de degradar proteínas desnaturalizadas y favorecer el re-plegamiento de proteínas dañadas permitiendo que recuperen la conformación activa.

Si bien cuando la célula se enfrenta a un estrés térmico las proteasas y chaperonas del regulón *rpoH* se inducen rápidamente (en 5 minutos) alcanzando niveles 15 a 20 veces superiores al basal, los niveles basales que posee la célula, en condiciones normales de crecimiento, también cumplen una importante función fisiológica. Son responsables de regular diversas funciones celulares esenciales, al asegurar que determinadas proteínas citoplasmáticas adopten la conformación activa a medida que van siendo sintetizadas y que se degraden otras. Esto se puso en evidencia en función del fenotipo pleiotrópico que presentan las mutantes $\Delta rpoH$, que no solo son incapaces de crecer a temperaturas superiores a los 20°C, sino que presentan deficiencias en proteólisis, división celular, crecimiento de fagos y replicación de plásmidos.

Los genes del regulón σ^H no solo responden a un incremento en la temperatura (estrés térmico), sino que también pueden inducirse por concentraciones subletales de etanol y ante la producción de proteínas heterólogas. Por otro lado, el hambreado en fuente de carbono o amino ácidos, la exposición a agentes que

dañen el ADN, antibióticos o metales pesados, también pueden inducir al menos algunas de las HSPs (heat-shock proteins o proteínas de choque térmico) pertenecientes al regulón σ^H . En estos casos, el nivel de inducción alcanzado es menor y aun se desconocen los detalles del mecanismo por el cual se desarrolla. Thomas Nyström propuso un modelo para explicar la inducción del regulón RpoH durante condiciones de hambreado, en el que postula que la progresiva oxidación de proteínas citoplasmáticas constituye la señal que induce el regulón RpoH durante la FE. Los niveles de σ^H están regulados, en parte, por la degradación vía DnaK-DnaJ-GrpE (que pertenecen al mismo regulón). Durante las condiciones de ham-

breado, la oxidación progresiva de proteínas citoplasmáticas incrementaría los niveles de proteínas plegadas incorrectamente o desnaturalizadas y esto titularía las proteasas del regulón RpoH, permitiendo que aumente la vida media de σ^H y se induzca el regulón.

Este modelo está avalado por evidencias que indican que sobreproducir SodA durante la fase de hambreado, suprime la inducción del regulón RpoH. Por el contrario, las células deficientes en actividad de superóxido dismutasa presentan superinducción del regulón σ^H (Nyström T., 1999). Una evidencia más de la alta interconexión existente entre las distintas respuestas a estrés.

Discusión

.....A nadie le está dado recorrer más que una parte infinitesimal del palacio.
Alguno no conoce sino los sótanos. Podemos percibir unas caras, unas voces, unas palabras, pero lo que percibimos es ínfimo. Ínfimo y precioso a la vez.

J.L.B., El palaci

El presente trabajo propone re-evaluar el proceso de generación de multímeros de plásmido de alto peso molecular en un contexto *recBC sbcBC*, a la luz de los nuevos conceptos vigentes acerca de la interrelación replicación / recombinación.

De acuerdo a esta nueva visión, aún en condiciones normales de crecimiento, la replicación iniciada en el origen del cromosoma bacteriano sufre bloqueos o colapsos, con una alta frecuencia. La maquinaria de recombinación celular parece haber evolucionado para permitir reparar horquillas de replicación que hayan sufrido lesiones de diversa naturaleza, asegurando la restauración de la estructura de la horquilla. Finalmente, el 'primosoma de reparación' permite que se re-inicie la replicación sobre la horquilla restituida, completando el proceso de reparación que asegura que se complete el ciclo de replicación en marcha.

El complejo proteico RecBCD resulta una herramienta esencial para reparar horquillas de replicación colapsadas. La otra pieza importante en este esquema es la secuencia χ , que está sobre-representada en el genoma en una orientación tal, que le permite proteger una horquilla colapsada de la degradación mediada por la actividad ExoV de RecBCD. Cuando una horquilla colapsa y se desprende uno de los brazos de la misma, es procesada rápidamente por RecBCD, que entra por el extremo doble cadena y comienza a degradarla hasta encontrarse con un sitio χ . Al interactuar con χ se modifica la actividad de RecBCD: se atenúa la actividad ExoV y se inicia el cargado de RecA sobre la cadena que posee el sitio χ , formándose de esta manera el filamento de RecA sobre el ADNsc 3' que se va generando a medida que RecBCD avanza. La recombinación con la cromátide hermana permite restituir la horquilla. Se presume que en un contexto salvaje, la vía RecBC es responsable de reparar horquillas de replicación colapsadas, siguiendo este

esquema. Dado que los plásmidos normalmente no poseen sitios χ , en caso de que colapse la horquilla de replicación de un plásmido, ésta será degradada rápidamente por la actividad ExoV de RecBCD.

En un contexto *recBC*, las células no pueden reparar este tipo de lesiones generadas durante la replicación de su genoma y esta deficiencia se traduce en una reducida viabilidad (30%). Las mutantes *recBC* acumulan mutaciones supresoras en *sbcB* y *sbcCD*, que incrementan significativamente su viabilidad. Se presume que estas mutaciones habilitan a la vía RecF para que repare el colapso de horquillas de replicación. La inactivación de las nucleasas SbcB y SbcCD, evitaría que se degraden intermediarios que pueden ser procesados por la vía RecF para concretar la reparación de este tipo de lesiones. La mutante *recBC sbcB sbcCD* posee una eficiencia de plaqueo similar a la de una cepa salvaje (80 %), sin embargo exhibe un alto grado de filamentación. Probablemente la reparación de horquillas colapsadas por la vía RecF es menos eficiente, la célula no logra finalizar la ronda de replicación antes de que se complete el ciclo celular y esto trae aparejado problemas de segregación que se traducen en inhibición de la división celular (manifiesta a través de la filamentación).

En la década del 80, varios grupos demostraron que en un contexto *recBC sbcB sbcCD*, plásmidos con diversos orígenes de replicación, acumulaban multímeros de alto peso molecular. La caracterización molecular de los multímeros indicó que se trababa de multímeros cabeza-con-cola, que poseían extremos doble cadena. El análisis por PFGE demostró que parte de estos multímeros eran lineales, mientras que otra fracción era incapaz de penetrar en el gel, presumiblemente porque poseían entremos protegidos o estructuras altamente ramificadas. Se propuso un modelo para explicar la generación de HMW mediante el establecimiento de figuras σ , que no podrían ser

degradadas en función de la deficiencia en RecBCD. Para explicar la contribución de RecA, se postuló que la invasión de un círculo por parte de una molécula lineal podría contribuir al establecimiento de más figuras σ .

En el transcurso del presente trabajo se intentó caracterizar el proceso de generación de multímeros en el contexto *recBC sbcBC*, tomando en consideración el nuevo marco teórico vigente. Durante la primer etapa del trabajo se utilizó como herramienta el sistema de resolución del transposón $\gamma\delta$. Al comprobar que el sistema de resolución era capaz de evitar que se acumulara HMW, se planteó la posibilidad de usar este sistema para construir un modelo de trabajo que permitiera disminuir al mínimo la proporción inicial de HMW para estudiar la cinética de generación y acumulación de multímeros a lo largo de la curva de crecimiento.

Se construyó el plásmido reporter pUC::res, conteniendo el sitio de resolución, y se analizó la capacidad de distintos plásmidos que expresaban la resolvasa *en trans*, de evitar que el plásmido reporter acumulara HMW. Ante todo se comprobó que un plásmido expresando constitutivamente la resolvasa TnpR, es capaz de evitar que el plásmido reporter acumule HMW en células *recBC sbcBC*.

El primer intento de complementación con un plásmido de expresión regulable, utilizando el plásmido pGH156 no resultó. Este plásmido porta el gen *tnpR* bajo control del promotor P_{lacUV5} , y se esperaba poder inducir la expresión de TnpR mediante el agregado de IPTG al medio de cultivo. Sin embargo, aún en ausencia de inductor, se registra expresión de TnpR y la consecuente ausencia de HMW del plásmido reporter. Esto probablemente se debe a que la célula porta una única copia genómica del gen *lacI*, y los niveles de represor serían insuficientes para reprimir las copias del promotor P_{lacUV5} presentes en las numerosas copias del plásmido. Incluso en presencia

de glucosa, el nivel de expresión de TnpR alcanzado permite evitar que se acumule el máximo de HMW. Por lo tanto fue necesario diseñar un nuevo sistema de complementación.

Se recurrió a un vector de expresión condicional, en el que se insertó el gen *tnpR* bajo control del promotor P_{BAD} . Se demostró que utilizando el plásmido pBADtnpR era posible inducir la expresión de TnpR mediante el agregado de arabinosa al medio, y reprimirla mediante la suplementación con glucosa. El sistema de complementación diseñado [pUCres + pBAD-tnpR], permite que el plásmido reporter acumule HMW durante el crecimiento en medio rico suplementado con glucosa [LB glu], pero evita este fenómeno durante el crecimiento en presencia de arabinosa. Este sistema nos permitió analizar la formación de HMW, partiendo de células conteniendo una baja proporción de HMW.

Resultó sorprendente descubrir que células conteniendo una baja proporción inicial de HMW, al crecer en condiciones que reprimen la expresión de TnpR, no generan cantidades apreciables de HMW durante el crecimiento exponencial. Finalmente se comprobó que, en condiciones que reprimen la expresión de TnpR (crecimiento en [LB glu]), se genera HMW del plásmido reporter fundamentalmente durante las primeras horas de la fase estacionaria. Se comprobó que en dicha condición de crecimiento, durante la FE temprana las células que no están en activa división, exhiben una actividad replicativa transiente, que se corresponde con el incremento en la proporción de HMW.

Dado que durante el crecimiento en [LB], las células acumulan una proporción importante de HMW del plásmido reporter, pero no exhiben la actividad replicativa de FE característica de la condición [LB glu], se sospechó que la glucosa ejercía un efecto adicional al de reprimir vía 'represión catabólica' la expresión de la resolvasa. Por lo tanto se intentó com-

probar los resultados obtenidos con el sistema de complementación [pUCres-pBADtnpR], en células *recBC sbcBC* conteniendo un único plásmido, que portara o no un sistema de resolución activo [pUCres o pUCrestnpR].

Se comprobó que, efectivamente, la glucosa ejerce un efecto. El crecimiento en presencia de glucosa exagera significativamente la actividad de síntesis de ADN detectada durante la FE y en consecuencia resulta en una mayor acumulación de HMW. Al analizar el plásmido pUCrestnpR, que posee un sistema de resolución activo, se comprobó que el sistema de resolución puede prevenir la síntesis de HMW durante el crecimiento en [LB], pero sólo puede reducirla en la condición [LB glu]. Por lo tanto, los multímeros circulares parecen ser intermediarios importantes para la síntesis de HMW, en la condición [LB], pero no tanto en la condición [LB glu].

En síntesis, el sistema de complementación diseñado, nos permitió poner en evidencia que al cultivar la cepa *recBC sbcBC* en [LB glu], durante las primeras horas de la FE las células desarrollan una capacidad replicativa muy importante, que se encausa en la generación y acumulación de HMW del plásmido. No fue posible precisar si la presencia de glucosa en el medio, incrementa la cantidad de intermediarios del plásmido tendientes a involucrarse en la replicación aberrante que genera los multímeros o si influencia de algún modo la capacidad replicativa mediante la inducción/activación de funciones involucradas en replicación. Más adelante se discute la posibilidad de que el crecimiento en glucosa permita una exacerbada actividad metabólica durante la transición hacia la FE, que derive en estrés oxidativo. El daño oxidativo, podría incrementar la cantidad de intermediarios de replicación tendientes a involucrarse en la síntesis de multímeros HMW.

Esta primer etapa del trabajo evidencia que existe una correlación entre el estado metabólico y el fun-

cionamiento / regulación de los procesos acoplados de replicación y recombinación, al demostrar que tanto la cinética de acumulación de los multímeros, como el nivel de amplificación alcanzado respecto del ADN cromosómico, se modifican en función de las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento.

La segunda etapa consistió en un análisis genético con el objeto de precisar las funciones celulares involucradas en la síntesis de HMW. Se analizaron funciones de recombinación y funciones involucradas en el reinicio de la replicación sobre una horquilla restaurada.

Se corroboraron reportes previos que indicaban que RecA participa de la generación de HMW. Pero se puso en evidencia que la dependencia de RecA se modifica en función de las condiciones de cultivo. En la condición [LB], en ausencia de RecA funcional sólo puede acumularse un 10% del plásmido como HMW, mientras que en [LB glu] las mutantes *recA* acumulan hasta 50% del plásmido como HMW. Por lo tanto, en esta última condición funciona un mecanismo que permite generar multímeros HMW independientemente de RecA. En [LB] sólo se requiere la función recombinasa de RecA para asegurar la acumulación de HMW, mientras que en [LB glu] participaría como recombinasa y como disparadora de la respuesta SOS. Por otro lado, se demuestra que en lo referente a la síntesis de HMW, RecA puede contribuir a la síntesis de estos multímeros independientemente de RecF y RecR.

La demostración de que PriA es imprescindible para la síntesis de HMW, constituyó una pieza clave para reconstruir un mecanismo de generación de multímeros HMW, que involucre el colapso del intermediario de replicación normal del plásmido, la reparación y el posterior re-inicio de la replicación por un mecanismo alternativo.

Ante todo, se demostró que sobre-expresar PriA, a partir de un plásmido (que normalmente replica inde-

pendientemente de esta proteína) en el contexto *recBC sbcBC*, incrementa significativamente la síntesis de HMW del mismo. Empleando una mutante deficiente en la actividad de 'ensamblaje de primosoma' se demostró que es justamente esta actividad la necesaria para promover la síntesis de HMW.

Ante los repetidos intentos frustrados de construir una cepa *recBC sbcBC ΔpriA*, se planteó la posibilidad de que inactivar PriA en este contexto genético resultara letal y se adaptó un método utilizado previamente por otros autores, para desafiar esta hipótesis. Se introdujo la mutación *ΔpriA* en la cepa *recBC sbcBC*, portando un plásmido que expresaba PriA y luego se intentó eliminar dicho plásmido con el propósito de recuperar células con el genotipo buscado. Los experimentos de segregación demostraron que la cepa *ΔpriA recBC sbcBC* es inviable. La imposibilidad de inactivar PriA en este contexto genético, enfatiza la necesidad de las células *recBC sbcBC* de contar con un sistema eficiente que permita reiniciar la replicación del genoma, una vez que la maquinaria de recombinación logra restaurar la horquilla dañada.

Para analizar la posibilidad de sintetizar multímeros HMW en ausencia de PriA funcional, se introdujo la mutación *ΔpriA* en el contexto *sbcB sbcCD* y se inactivó RecBC mediante la expresión condicional de la proteína GamS del fago λ. Utilizando este sistema condicional, fue posible comprobar que PriA resulta imprescindible para generar HMW en un contexto *RecBC⁻ SbcBC⁻*.

Por último, se demostró que inactivar Pol III durante la FE, evita que las células *recBC sbcBC* disparen la actividad replicativa de FE responsable de sintetizar HMW en la condición [LB glu].

A continuación se proponen dos modelos para explicar el proceso por el cual se inicia la síntesis de multímeros HMW en un contexto *recBC sbcBC*, elaborados en función del marco teórico vigente y los

resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo.

Dos mecanismos alternativos para generar HMW

En función de los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo, planteamos la existencia de por lo menos dos mecanismos alternativos para iniciar la síntesis de HMW. Uno de ellos, sería evidente en la condición [LB] y el otro se dipararía en [LB glu], durante las primeras horas de la FE. Reuniendo las distintas evidencias, se puede hacer la siguiente diferenciación entre los eventos que conducen a la acumulación de HMW en cada condición.

En la condición [LB] la síntesis de HMW es dependiente de RecA (aunque en las mutantes *recA* aún se observa una mínima proporción de HMW) y puede prevenirse manteniendo el plásmido como monómero, por medio de un sistema de resolución específico de sitio. Esta última característica sugiere que los multímeros circulares serían intermediarios en la generación de HMW por esta vía. En la sección 1.1 (Res- Cap 2) se postuló un mecanismo de generación de multímeros equivalente al utilizado por el fago T4, en la etapa tardía de su ciclo de replicación. La invasión de una molécula lineal de plásmido por otra, y el posterior establecimiento de una horquilla de replicación sobre el intermediario de recombinación, derivaría en la síntesis de otra molécula lineal de igual o mayor tamaño que las iniciales. Dado que en ausencia de PriA no se detecta HMW, es razonable postular que se requeriría de PriA para ensamblar el primosoma sobre el D-loop, permitiendo el inicio de la replicación sobre el intermediario de recombinación, tal como lo hace la proteína gp59 del fago T4.

La factibilidad de evitar que se genere HMW por esta vía utilizando un sistema de resolución, podría explicarse en función de la imposibilidad de generar multímeros lineales por este mecanismo, partiendo de dos monómeros lineales [ver Figura 76]. La existencia de multímeros aseguraría un rápido incremen-

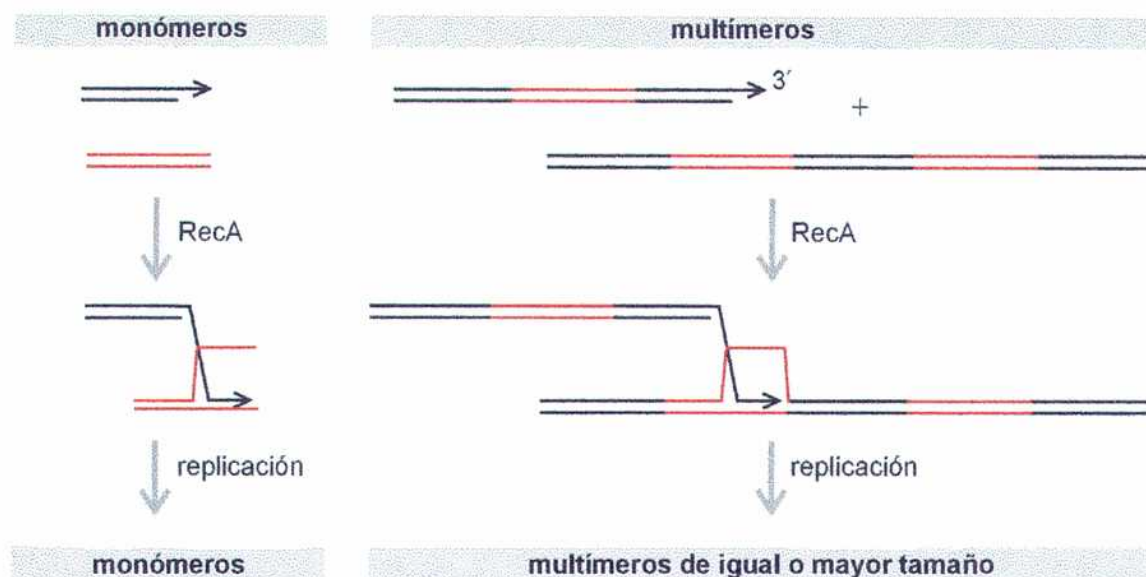


Figura 76: RDR a partir de monómeros o multímeros lineales.

Al sólo efecto de diferenciar las sucesivas copias que conforman el multímero, se ha representado las distintas copias del plásmido en rojo y negro. La invasión de un monómero por otro monómero, sólo podría generar otro monómero por RDR. Si la linealización del plásmido se produce al azar en cualquier región del plásmido, la permutación circular de los extremos podría conducir a la producción de dímeros, que de involucrarse en ciclos de invasión / replicación, producirían multímeros progresivamente más largos. Sin embargo, si los multímeros lineales se generan por dos colapsos sucesivos de la horquilla en los extremos opuestos de la burbuja de replicación, es difícil de concebir cómo podrían generarse monómeros circularmente permutados a partir de monómeros circulares [este tema se discute en más detalle en el texto].

Por otro lado, la RDR establecida a partir de la invasión de un multímero lineal por otro multímero, produciría multímeros de igual o mayor tamaño que los originales. En el caso representado en la figura, la invasión del pentámero por parte del trímero podría generar desde trímeros hasta octámeros, dependiendo de dónde se produzca la invasión.

to en el tamaño de los multímeros, de la misma manera que los extremos terminalmente redundantes favorecen la RDR en el fago T4 (ver Introducción, sección 1.3.2).

Para explicar la generación de multímeros lineales a partir de los multímeros circulares se podría invocar el colapso de una horquilla de replicación, al encontrarse con un nick o una brecha simple cadena sobre una de las cadenas molde, y el consecuente desprendimiento de uno de los brazos de la horquilla para generar una figura σ con un Edc libre. Para producir una molécula lineal, a partir de esta figura σ , debería producirse una segunda ruptura en el otro extremo de la 'burbuja' de replicación. En el caso de replicones que replican bidireccionalmente, bastaría con que el replisoma que avanza en la dirección contraria, se encuentre con otra lesión que provoque su colapso, derivando en el desprendimiento de una molécula de ADN lineal a partir del intermediario de replicación.

Dado que los plásmidos utilizados en este trabajo replican en una única dirección, el desprendimiento de una molécula lineal implicaría un segundo colapso a nivel del origen de replicación [Figura 77, secciones A B y C]. La multimerización, no solo haría más eficiente la generación de HMW por RDR, sino que también aumentaría la probabilidad de colapso de la horquilla de replicación y admitiría que se generen moléculas lineales de plásmido con un tamaño igual o mayor al de una copia del plásmido. Observando la figura 77, resulta evidente que en el caso de un monómero circular, el colapso de un intermediario de replicación para generar el desprendimiento de una de las cromátides hermanas, sólo podría generar una molécula de ADN lineal con una longitud inferior a la de una copia de plásmido, y por lo tanto incapaz de generar multímeros por RDR.

Varias publicaciones indican que la replicación de plásmidos derivados de ColE1 avanza en forma unidireccional a partir del origen de replicación del plás-

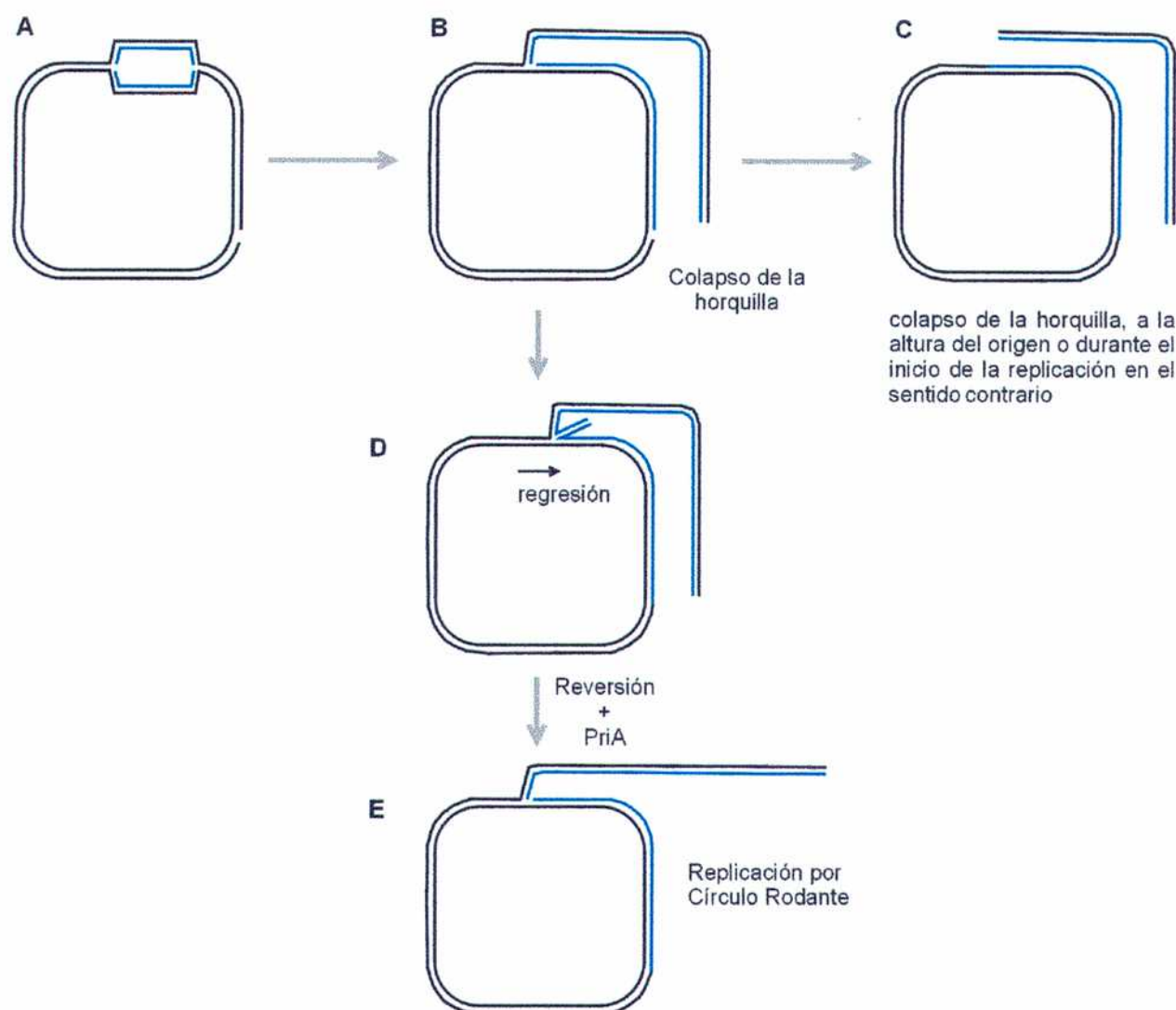


Figura 77 Generación de sustratos para iniciar la síntesis de multímeros por RDR o CR.

Se propone un modelo para la producción de intermediarios que puedan encausarse en la producción de HMW, por replicación dependiente de recombinación o por replicación por círculo rodante. Este modelo implica el colapso de horquillas de replicación debido a la presencia de discontinuidades en las cadenas molde o el bloqueo del replisoma causado por factores proteicos unidos al dúplex parental.

Se ha representado el colapso de la horquilla de replicación al encontrarse con un corte (o una brecha simple cadena) en una de las cadenas molde y la consecuente generación de una estructura σ [A y B]. Si se produce un segundo colapso a la altura del origen, se completa el desprendimiento de uno de los brazos de la horquilla, como una molécula de ADN lineal, que podrá involucrarse en procesos de RDR mediados por RecA y PriA [C].

El segundo modelo, propone que el procesamiento de la figura σ , a la altura del origen, podría establecer una replicación de tipo círculo rodante. Sería necesario despejar esta región del RNA que actúa de cebador o de factores proteicos involucrados en el inicio normal de la replicación del plásmido (como la proteína Rep en el caso de los plásmidos R1 y pSC101). La regresión de la horquilla permitiría despejar la zona como para permitir que PriA ensamble el primosoma que iniciará la síntesis de multímeros por CR [D y E].

mido (Santamaría D. et al., 2000). No obstante, A. Kuzminov analizó la estructura de los distintos intermediarios de replicación de un plásmido derivado de ColE1, separados por electroforesis en 2D y demostró que en un huésped *recBC recA* (o *recD recA*), estos plásmidos replican por un mecanismo bidireccional asimétrico. Es decir que, la primer horquilla de replicación avanza en una dirección hasta replicar el 85 % del plásmido, mientras que la

segunda horquilla comienza a avanzar más tardíamente en la dirección contraria, hasta completar la replicación del mismo. Sin embargo, no se puede descartar que esta replicación bidireccional se deba al contexto genético empleado en este trabajo, que es deficiente en RecA y RecBC (Kuzminov A. et al., 1997). Independientemente de que este resultado sea aplicable al mecanismo de replicación de plásmidos en un contexto salvaje, sería relevante en

relación al presente trabajo, justamente en función de que utiliza un contexto deficiente en RecBCD. Por lo tanto, si en el contexto *recBC sbcBC* se establece una segunda horquilla de replicación que avanza en el otro sentido, el colapso de la misma podría causar el desprendimiento de una molécula de ADN lineal a partir del intermediario de replicación.

En la condición [LB glu] los multímeros se amplifican una vez establecida la FE, en células que no están en activo crecimiento. Tanto el porcentaje de HMW, como el nivel de amplificación alcanzado por el plásmido respecto del ADN genómico, es significativamente mayor en esta condición. Se puede especular que el hecho de que los multímeros se sintetizen predominantemente, una vez que las células dejaron de dividirse, contribuye a que se alcance un mayor nivel de amplificación, ya que todos los multímeros sintetizados permanecerán en la célula y probablemente actuarán como sustratos para la generación de más multímeros. Por otro lado en esta fase del cultivo, las células han dejado de replicar su genoma, liberando la maquinaria replicativa para que se involucre exclusivamente en la síntesis de ADN plasmídico. La actividad de síntesis de ADN plasmídico es acotada, comienza alrededor de las 10 horas de cultivo, alcanza un máximo alrededor de las 17 horas y luego decae. Tal vez el proceso continúa hasta agotar el pool intracelular de nucleótidos o algún factor proteico, involucrado en el proceso de síntesis de ADN, que requiera recambio (más adelante se discute este tema en más profundidad).

Este mecanismo de generación de HMW no puede prevenirse resolviendo los multímeros por acción de un sistema de resolución. Por lo tanto, tanto monómeros como multímeros serían sustratos adecuados para disparar este tipo de replicación. La dependencia de RecA tampoco es estricta. En ausencia de RecA, aún se acumula hasta 50% del plásmido como HMW. Dado que la sobre-expresión de RecA

no permite que las mutantes *lexA3* acumulen el máximo porcentaje de HMW característico de la condición [LB glu], alguno(s) de los genes pertenecientes al regulón SOS podría(n) participar en la síntesis de multímeros por esta vía. Se ha reportado la participación de las polimerasas Pol II, Pol IV y Pol V en los procesos de replicación mediada por recombinación, que participan del fenómeno de mutagénesis adaptativa en células hambreadas (Hastings P.J. et al, 2000; Lombardo M.J. & Rosenberg S, 1999; McKenzie G.J. et al., 2000; Foster P.L., 2000). Durante el transcurso del presente trabajo se comprobó que durante la FE los multímeros son sintetizados principalmente por Pol III, la principal polimerasa celular. Sin embargo, en función de los resultados obtenidos con las mutantes *lexA3* y *lexA3 recAo98*, no se puede descartar que las polimerasas pertenecientes al regulón SOS, contribuyan en cierta medida a la síntesis de HMW.

Dado que en [LB glu], la síntesis de HMW no depende de la existencia de multímeros ni de la presencia de RecA, postulamos que en este caso el mecanismo de síntesis de multímeros involucra figuras σ y un mecanismo de replicación de tipo círculo rodante [CR]. El establecimiento de la figura σ , podría abarcar las siguientes etapas. El colapso de la horquilla de replicación, desprendería un brazo de la misma, generando la figura σ [Figura 77, secciones A y B]. La estructura en Y que se forma en el origen, en vez de colapsar como en el caso presentado anteriormente, sería procesada por regresión mediada por la maquinaria de recombinación para generar un pata de gallo (esta etapa podría ser catalizada por RuvAB, RecG o RecA). En el caso de los plásmidos derivados de ColE1, la regresión de la horquilla desplazaría al RNA II del origen (normalmente el cebador de la cadena líder, el RNA II, permanece unido a la cadena complementaria en la región del origen del plásmido). La posterior reversión de la pata de gallo generaría

una estructura en Y, libre del cebador y/o de factores proteicos normalmente presentes en esta región (proteína Rep en el caso de los plásmidos pSC101 y R1). Esta estructura en Y podría ser reconocida por PriA para dirigir el ensamblaje de un primosoma, que permita el inicio de la replicación, en la dirección contraria a la que avanza normalmente, por un mecanismo de círculo rodante [ver Figura 77, secciones D y E].

La regresión de la horquilla podría ser catalizada por RuvAB, RecG o RecA; y esto explicaría por qué pueden generarse multímeros, por esta vía, independientemente de RecA. En función de evidencias genéticas presentes en la bibliografía, cualquiera de las tres funciones mencionadas anteriormente, podría catalizar la regresión de una horquilla de replicación. Dependiendo de la causa que provocó el bloqueo del replisoma, la horquilla tendrá determinadas características que la convertirían en un mejor sustrato para alguna de estas tres proteínas. En el caso de mutantes *dnaB(ts)*, la inactivación de la helicasa replicativa requeriría de RecA para procesar la horquilla de replicación (Michel B. et al., 2001). En el caso de un bloqueo provocado por una lesión inducida por la exposición a radiación UV, la regresión sería catalizada por RecG (Gregg A.V. et al., 2001). Por último, en mutantes *rep*, en las que se bloquea frecuentemente el avance del replisoma por la presencia de complejos proteicos unidos al dúplex parental, la regresión sería catalizada por RuvAB (Seigneur M. et al., 1998).

Durante el presente trabajo, se intentó analizar el efecto de inactivar RuvAB, RuvC o RecG, en la capacidad de la cepa JC7623 de acumular HMW. Se introdujeron estas mutaciones en el contexto *recBC sbcBC* y se analizó la capacidad del plásmido pUCres de acumular HMW en ausencia de RuvAB, RuvC o RecG. En estas tres mutantes se detectan cantidades apreciables de HMW, sin embargo no fue posible una

cuantificación adecuada del porcentaje de HMW a los efectos de comparar con el control, ya que los resultados obtenidos no resultaban reproducibles. Estas cepas crecen muy lentamente y la deficiencia en viabilidad se agrava al ser transformadas con un plásmido. En particular, la cepa JC7623 *recG* / pUCres creciendo en placas de LB_{ATB} agar, exhibe un fenotipo muy heterogéneo. Surgen espontáneamente clones capaces de crecer con mayor velocidad, sugiriendo la aparición de supresores con una alta frecuencia. Dada la posibilidad de generar la regresión por vía de distintas proteínas, sería esperable que al inactivar una de éstas, aún puedan generarse figuras σ por las otras dos vías.

En relación a la dependencia de RecFOR, M. Cox demostró *in vitro* que RecA es capaz de catalizar la regresión de una horquilla de replicación, independientemente de RecF, RecO o RecR (Robu M.E. et al., 2001). Un trabajo de B. Michel y colaboradores, sugiere una reacción equivalente *in vivo*. Estos investigadores demostraron que en mutantes *recB dnaB(Ts)*, el bloqueo del replisoma conduce a fragmentación cromosómica catalizada por RuvABC, en forma dependiente de RecA, pero independiente de RecF y RecO. Aparentemente, al inactivar la helicasa se bloquea el replisoma y en ausencia de RecBC, RecF y RecO, RecA es capaz de promover la regresión de la horquilla, generando una estructura de Holliday. Esta puede ser reconocida por RuvAB, permitiendo que RuvC introduzca el corte que deriva en la ruptura de la horquilla (evidenciado como fragmentación cromosómica, dada la deficiencia en RecBC) (Seigneur M. et al., 2000). Los experimentos presentados en la sección 1.1 [Res.-Cap. 2], que demuestran que la inactivación de RecF y RecR no disminuye el porcentaje de HMW acumulado en la misma proporción que la inactivación de RecA, serían otra evidencia de que RecA puede catalizar determinadas reacciones *in vivo* independientemente de

RecF y RecR.

Los dos modelos propuestos para explicar la generación de HMW, involucran un bloqueo o colapso de la horquilla en el intermediario normal de replicación, el procesamiento de la misma y el posterior reinicio de la replicación catalizado por PriA. Por lo tanto, PriA debería ser indispensable para la generación de estos multímeros. Los resultados presentados en la sección 2.1.3.2 (Res.-Cap2), demuestran que PriA cumple un rol esencial en la síntesis de HMW. En ausencia de PriA funcional, la inactivación de RecBC en un contexto *sbcB sbcC(D)*, no conduce a la acumulación de HMW. Por el contrario, el plásmido replica normalmente y se mantiene exclusivamente como formas circulares. Ni siquiera se detectan mínimas cantidades de HMW, como en el caso de las mutantes *recA*.

En la Introducción (sección 7), se hizo una revisión de los trabajos pioneros de Clark, Cohen y Kusano, en los que reportan la síntesis de multímeros HMW en un contexto *recBC sbcBC*. Posteriormente, otros dos grupos analizaron la formación de HMW en el caso de plásmidos que contenían un sitio χ . A continuación se hace una breve revisión de dichos trabajos y se discuten los resultados reportados por estos investigadores, en términos de los modelos propuestos en la presente disertación.

Los trabajos de A.J. Clark, A. Cohen y K. Kusano demostraron que en un contexto *recBC sbcB sbcC(D)*, plásmidos que replican por un mecanismo theta, utilizando orígenes de replicación muy diversos (ColE1, pSC101, oriC), forman multímeros HMW. Estos investigadores observaron que el fenómeno de generación de HMW exhibía dependencia de las proteínas RecA y DnaB, y en menor medida de RecF y RecJ. Clark demostró que la expresión condicional de GamS, en un contexto *sbcB sbcC*, permitía inactivar RecBCD y disparar la síntesis y acumulación de estos multímeros (Cohen A. & Clark A.J., 1986; Silverstein

Z. & Cohen A., 1987; Kusano K. et al., 1989).

Unos años más tarde, Zaman y Boles demostraron que podía lograrse el mismo efecto en una cepa *sbcB sbcCD*, incluyendo un sitio χ en el plásmido. Reportaron que un plásmido de replicación theta unidireccional, que posee un sitio χ , puede acumular HMW en un contexto *sbcB sbcCD*, por un mecanismo dependiente de RecA. Este efecto es independiente de la orientación del sitio χ respecto de la dirección de replicación y se verifica predominantemente en *cis*. Es decir, una célula *sbcB sbcC* conteniendo dos plásmidos con homología parcial, uno conteniendo un sitio χ y el otro no, genera HMW casi exclusivamente del plásmido que posee el sitio χ . Por ende, se descarta que los sitios χ presentes en el plásmido puedan titular RecBCD y convertir a la célula en una fenocopia *RecBCD⁻*. Estos investigadores postularon que los multímeros se generaban por replicación de tipo círculo rodante (CR), y la presencia del sitio χ en el plásmido, permitía atenuar la actividad exonucleasa del complejo RecBCD, sobre las colas de las figuras sigma (Zaman M.M. & Boles T.C., 1994).

P. Dabert y colaboradores analizaron la capacidad de plásmidos, que replican por un mecanismo de círculo rodante, de generar multímeros HMW. Publicaron un trabajo en el que demuestran que este tipo de plásmidos puede acumular HMW en un contexto salvaje, si se inserta un sitio χ en la orientación adecuada. El sitio χ debe estar orientado de manera tal de atenuar la actividad exonucleasa de RecBCD, cuando ésta entra por el extremo doble cadena que poseen normalmente los intermediarios σ de replicación de estos plásmidos. Este mecanismo de generación de HMW también resultó ser dependiente de RecA (Dabert P. et al., 1992).

El factor común en todos estos trabajos es la inactivación de RecBCD, ya sea por mutación o por atenuación de la actividad exonucleasa mediante la presencia de un sitio χ en el plásmido. En el caso de

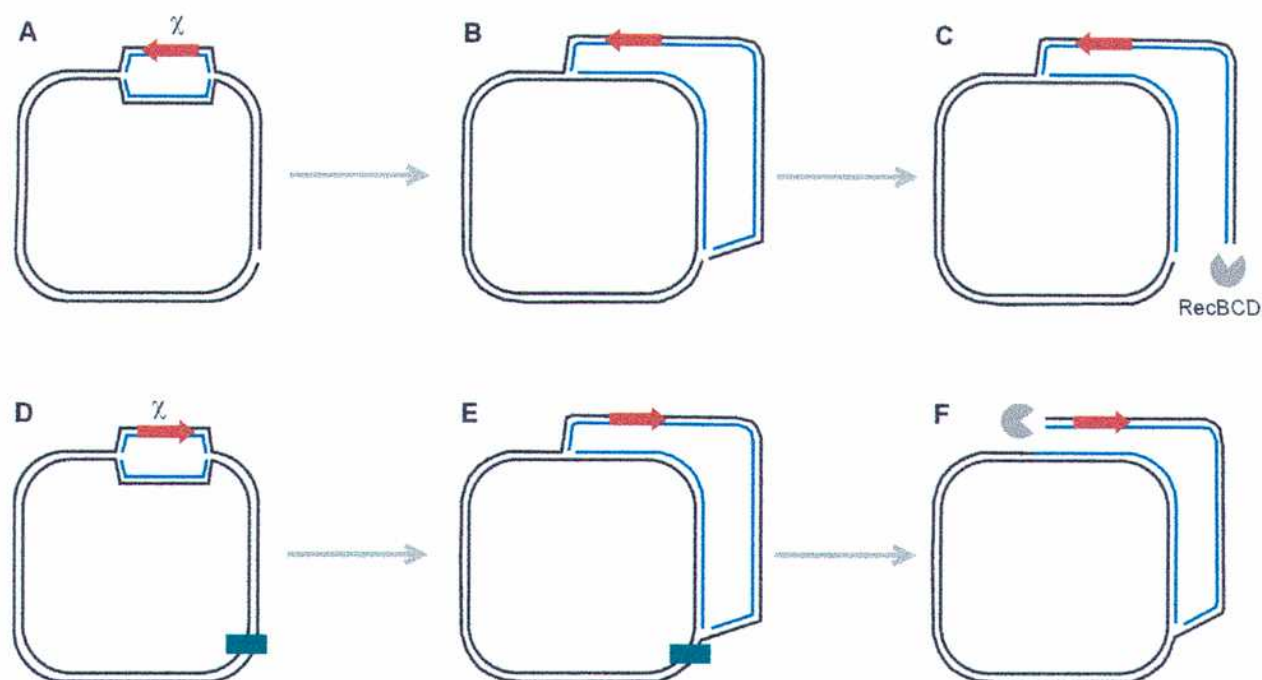


Figura 78 ¿Por qué en el caso de un plásmido de replicación tipo theta, el sitio χ puede favorecer la formación de HMW en las dos orientaciones ?

En una de las orientaciones podría proteger el extremo de la figura σ establecida a raíz del colapso de la horquilla de replicación [A, B y C]. La posibilidad de favorecer la acumulación de HMW en la orientación contraria, podría ser una evidencia de que la burbuja de replicación también puede colapsar en el otro extremo, generando una figura σ , que posee el sitio χ en la orientación adecuada para proteger el extremo doble cadena, de la degradación por RecBCD. El rectángulo verde esquematiza el bloqueo de la horquilla de replicación. El bloqueo del replisoma extendería la ventana temporal durante la cual podría producirse el colapso de la burbuja de replicación y explicaría la necesidad de contar con PriA para reiniciar la replicación por el modo CR.

los plásmidos que replican por CR, la cola de la figura σ que funciona como intermediario de replicación, siempre tendrá la misma polaridad, ya que la replicación se inicia en el origen y avanza en una determinada dirección. Por lo tanto es lógico que el sitio χ pueda ejercer su efecto, únicamente en la orientación que le permite atenuar al complejo RecBCD que avanza por la cola de la figura σ , desde el extremo doble cadena (el sitio χ es un octanucleótido asimétrico, que puede ser reconocido por el complejo RecBCD a medida que avanza desenrollando el dúplex, únicamente si lo encuentra en la orientación adecuada).

Por el contrario en el caso de plásmidos que replican por un mecanismo θ , el sitio χ demostró ejercer su efecto en cualquiera de las dos orientaciones. Si se analiza estos resultados en el marco del modelo propuesto en el presente trabajo para explicar la síntesis de multímeros, el sitio χ en una orientación

podría proteger una figura σ establecida a partir del colapso de la horquilla a un lado de la burbuja de replicación [ver Figura 78, A B y C], mientras que en la otra orientación, sería capaz de proteger la cola de una figura σ generada por colapso del otro extremo de la burbuja de replicación [ver Figura 78 D E y F].

La demostración de que en un contexto *sbcB* un sitio χ puede promover la generación de multímeros HMW de un plásmido que replica por un modo theta, independientemente de la orientación de esta secuencia respecto del origen de replicación, constituiría una evidencia de que la burbuja de replicación puede colapsar en cualquiera de los dos extremos.

En relación a este tema, resultó interesante comprobar que la mutante *recC₁₀₁₀* (ExoV⁻ Rec⁺) acumula la menor proporción de HMW que la mutante *recBC sbcBC*, en la cual RecBCD es totalmente inactiva [Sección 2.2 Res.-Cap2]. Todo parecería indicar que la mutante *recC₁₀₁₀* logra restaurar el brazo despen-

dido de la horquilla, por recombinación con la cromátide hermana. Los Edc constituyen el sustrato natural del complejo RecBCD. Por lo tanto, sería razonable considerar que RecBC₁₀₁₀D fuera capaz de unirse rápidamente al Edc generado por colapso de una horquilla de replicación, desenrollar el dúplex y facilitar el ensamblaje del filamento de RecA sobre una de las cadenas (esta mutante es capaz de realizar esta actividad independientemente del sitio χ). La posterior invasión de la cromátide hermana, permitiría restaurar la horquilla de replicación y evitaría que se establezca la replicación por CR.

Conexiones entre metabolismo y la capacidad de replicación descontrolada del plásmido.

Durante el presente trabajo se pudo establecer una correlación entre las condiciones fisiológicas en las que se encuentra la bacteria y el grado de amplificación alcanzado por el plásmido. Demostramos que en [LB glu] las células acumulan una mayor proporción de HMW que en [LB], sugiriendo que el metabolismo celular puede influenciar: (a) la producción de intermediarios del plásmido tendientes a involucrarse en la síntesis de multímeros, (b) la capacidad celular para replicar descontroladamente el plásmido, o ambos factores. Si se suplementa el medio con glucosa, pero se crece las células con menor disponibilidad de oxígeno (sin agitación), éstas acumulan una menor proporción de HMW y se mejora la viabilidad del cultivo durante la fase estacionaria.

Existen numerosos ejemplos en la bibliografía que indican que es posible establecer una correlación directa entre el nivel de daño oxidativo y la frecuencia de recombinación intracelular. Galitski utilizó una cepa de *Salmonella*, conteniendo un alelo *lac*⁺, flanqueado por secuencias repetidas en la misma orientación, que permitía detectar eventos de recombinación por la aparición de clones *lac*⁻. En un screen-

ing de mutaciones que anularan la capacidad recombinogénica, aisló 40 mutantes incapaces de generar clones *lac*⁻, de los cuales solo tres portaban mutaciones en *recA*. Inesperadamente, muchas de las mutaciones que anulaban la capacidad recombinogénica, también causaban fenotipos que sugerían un bloqueo en el metabolismo oxidativo, ya que afectaban el ciclo de Krebs o la cadena de transporte de electrones. Galitski y colaboradores interpretaron estos resultados como un indicio de que determinados intermediarios o productos secundarios del metabolismo oxidativo (radicales oxígeno), podían generar modificaciones en el ADN (cortes simple o doble cadena), que serían un prerrequisito para la recombinación. Por lo tanto, disminuir la frecuencia de producción de estos intermediarios reduciría la tasa de recombinación (Galitski T., 1996, Roca A.I. & Cox M.M., 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que determinadas mutantes, con una habilidad disminuida para prevenir el daño oxidativo, crecen normalmente en anaerobiosis pero presentan una viabilidad muy disminuida durante el crecimiento en presencia de oxígeno. Inactivar *recA* o *recB*, disminuye aún más la eficiencia de plaqueo de estas mutantes en aerobiosis, sugiriendo que el daño oxidativo genera lesiones en el ADN, que dificultan enormemente la replicación del genoma y este efecto puede ser compensado significativamente por reparación mediada por recombinación. En otras palabras, durante el crecimiento en presencia de oxígeno, estas mutantes que tienen disminuida su capacidad para prevenir la generación de radicales reactivos de oxígeno, dependen de los mecanismos de reparación mediada por recombinación para mantener la integridad de su genoma (Touati D. et al., 1995).

Otro ejemplo en el que se relaciona la capacidad recombinogénica con la aptitud para sobrevivir al daño oxidativo, es la posibilidad de mejorar la viabili-

dad de una mutante *lig recB*, mediante la incubación en anaerobiosis. Las mutaciones en *lig* y *polA*, generan células con deficiencia en DNA-Ligasa y Pol I, respectivamente, que acumulan interrupciones simple cadena en su ADN. Las dobles mutantes *polA recB* y *lig recB*, resultan prácticamente inviables. Sin embargo es posible incrementar varios órdenes la eficiencia de plaqueo de estas mutantes, incubando las placas en anaerobiosis (Morimyo M., 1982).

Consideramos que la suplementación del medio con glucosa en condiciones de alta disponibilidad de oxígeno, modifican el metabolismo celular de manera de producir mayor daño oxidativo durante la transición hacia la FE, y esto se evidencia en una mayor actividad recombinogénica que se manifiesta por el incremento en la proporción de multímeros acumulados, y en una disminución de la viabilidad del cultivo.

Existen diversos reportes en la bibliografía que indican que durante el crecimiento exponencial, bajo condiciones de crecimiento aeróbico, cuando el flujo de carbono excede la capacidad anfibólica de las vías metabólicas centrales (ciclo ATC), las células derivan el excedente de acetil-CoA hacia la generación de acetato, por la vía Pta-AckA (fosfo-trans acetilasa / acetato kinasa). El resultado es la generación de ATP y Acetil-fosfato y la excreción de acetato al medio. A medida que se agota la fuente de carbono y comienza la transición hacia la FE, las células comienzan a captar el acetato del medio y lo convierten en acetil-CoA por la vía Acs (acetil-CoA sintetasa), derivándolo hacia la generación de energía y componentes biosintéticos por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y el ciclo del glioxilato, respectivamente. También se registra una disminución en los niveles de acetil-fosfato (Chang D.E. et al., 1999; Kumaris et al., 2000).

En estos trabajos se reporta que si se monitorea la concentración de glucosa y acetato en el medio durante el crecimiento en [LB glucosa] o [M9 glucosa],

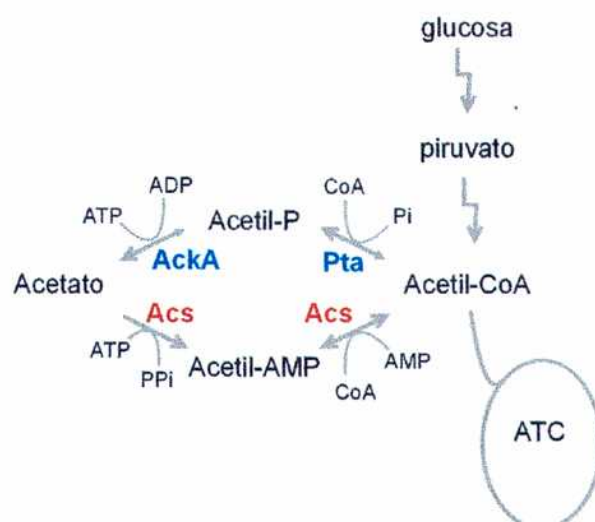


Figura 79 Generación de acetato durante la fase exponencial por la vía Pta-AckA y consumo por la vía Acs durante la transición hacia la FE. Pta: fosotransacetilasa, AckA: Acetato Kinasa, Acs: Acetil-CoA sintetasa

a lo largo de la fase exponencial se registra una progresiva disminución en los niveles de glucosa que se correlaciona con un incremento en los niveles de acetato. Una vez agotada la glucosa, el cultivo inicia la transición hacia la FE y se registra una disminución en los niveles extracelulares de acetato, a medida que las células lo incorporan y lo metabolizan vía la acetil-CoA sintetasa (Acs).

La asimilación de aminoácidos, como fuente de carbono, genera menor acumulación de acetato que la asimilación de glucosa (Chang et al., 1999). Por otro lado, en el caso de la suplementación con glucosa, los niveles de oxígeno también afectan la derivación de acetil-CoA hacia acetato por la vía Pta-AckA. Por lo tanto, el nivel de acetato acumulado extracelularmente, que puede ser luego metabolizado durante la transición hacia la FE, sería presumiblemente mayor en aquellas condiciones en las que se observa una mayor síntesis y acumulación de multímeros HMW en la cepa JC7623 ([LB glu] Vs [LB]; y mayor disponibilidad de oxígeno durante el crecimiento en presencia de glucosa). Se podría asumir que los mayores niveles de acetato se traducirán en mayor actividad metabólica durante la

transición hacia la FE, con la consecuente producción de radicales reactivos con potencialidad para generar daño oxidativo durante esta fase del cultivo. Si la cepa JC7623, en función de su deficiencia en RecBCD tiene menor eficiencia para reparar las horquillas de replicación que puedan colapsar durante la finalización de los ciclos de replicación en marcha, esto explicaría la disminución de la viabilidad del cultivo durante la transición hacia la FE.

Ahora bien, porqué después del crecimiento en [LB glu], la cepa JC7623 portando un plásmido presenta una viabilidad por lo menos 10 veces inferior a la de la cepa JC7623 (sin plásmidos) ? Evidentemente la generación de grandes cantidades de multímeros del plásmido afecta negativamente la eficiencia de plaqueo de la cepa. En la sección anterior, se postuló que la síntesis descontrolada del plásmido podría consumir o titular, algún factor proteico o incluso los mismos nucleótidos, que la célula necesitaría durante la FE para reparar y mantener la integridad de su genoma. Si éstos se consumen en la replicación del plásmido, cuando la célula se encuentre en la placa en condiciones que permitan re-iniciar el crecimiento, al comenzar a replicar su genoma podrían generarse gran cantidad de lesiones doble cadena, que comprometerían su viabilidad.

Si asumimos que esto es cierto, por qué en [LB], condición en la cual también se acumula una proporción importante de HMW, no disminuye la eficiencia de plaqueo ? La diferencia estaría dada, por el momento en el cual se produce la síntesis y acumulación de multímeros. En la condición [LB], los multímeros se sintetizan fundamentalmente a lo largo de la fase exponencial. Por lo tanto, la célula podría ir regenerando el pool de nucleótidos y/o los factores proteicos involucrados en la síntesis de multímeros. Por el contrario, en la condición [LB glu] la síntesis de HMW se verifica durante las primeras horas de la FE, fase durante la cual la célula reduce la actividad bios-

intética y por ende la posibilidad de reponer el pool de nucleótidos y/o factores involucrados en la síntesis/reparación del ADN, que se consumieran en exceso debido a la síntesis descontrolada de ADN plasmídico.

Por último, vale la pena mencionar el efecto de distintas condiciones de estrés, en la síntesis de HMW. Inactivar el regulón σ^S mediante la mutación *rpoS*, afecta la generación y acumulación de HMW en el contexto *recBC sbcBC*. Por lo tanto, la inducción de este regulón durante la transición hacia la FE, contribuiría a la síntesis de HMW.

La exposición de las células a un estrés térmico durante la FE (después del crecimiento en [LB glu]), exagera la actividad replicativa de FE [ver sección 2.3 Res.-Cap 2]. No es posible discernir si este resultado implica que a alta temperatura se genera mayor cantidad de intermediarios de replicación dañados del plásmido, o si alguno de los genes inducidos por acción de σ^H participa activamente de la síntesis de HMW.

En los otros dos casos en los que se evidenció un efecto del estrés térmico en la acumulación de HMW, se observó que la alta temperatura también afecta la viabilidad del cultivo (Sección 2.1.4.1, Res.-Cap2). Por lo tanto, nos inclinamos a pensar que el estrés térmico, de alguna manera afecta el normal funcionamiento de la maquinaria de replicación y esto resulta en un incremento en la cantidad de intermediarios de replicación del plásmido con tendencia a involucrarse en la generación de HMW.

Si bien, no fue posible precisar de qué manera el crecimiento en glucosa o la exposición a distintas situaciones de estrés exageran la síntesis de multímeros en la mutante *recBC sbcBC*, la demostración de que los procesos acoplados de recombinación y replicación (que en este contexto se manifiestan por la generación de HMW) pueden ser influenciados por las condiciones de crecimiento con-

stituye un aporte interesante.

Por otro lado, se puso en evidencia la importante capacidad replicativa que poseen las células durante la fase estacionaria. En el contexto *recBC sbcBC*, la deficiencia en nucleasas sumada a la capacidad

recombinogénica, permite que esta actividad replicativa se manifieste en la replicación descontrolada del plásmido. En un contexto salvaje cumpliría con el rol fisiológico de mantenimiento de la integridad del genoma durante el periodo de hambreado.

Materiales y métodos

1. Materiales	
1.1 Medios	142
1.2. Cepas	143
1.3. Plásmidos	144
1.3.1 Vectores y plásmidos provistos por otros laboratorios	144
1.3.2 Plásmidos construidos durante este trabajo	145
1.3.2.1 pUC $\gamma\delta$:	145
1.3.2.3 pUCres- <i>tnpR</i> :	145
1.3.2.4 pBAD- <i>tnpR</i> :	145
1.3.2.5 pGB ₂ - <i>priA</i> :	145
1.3.2.6 pWSK-117 y pWSK-119:	146
1.4 Cebadores	146
2. Metodología	
2.1. Southern para analizar las formas del plásmido	148
2.1.1 Preparación de lisados totales de ADN:	148
2.1.2 Cuantificación:	148
2.1.3 Digestión con enzima de restricción:	148
2.1.4 Southern	148
2.1.4.a Gel y transferencia :	148
2.1.4.b Hibridación:	148
2.1.4.c Lavados:	148
2.1.4.d Detección y revelado:	148
2.1.4.e Densitometría:	149
2.2. Preparación de sondas biotiniladas por PCR	149
2.3. Western-blot para detectar TnpR	149
2.3.1 Preparación de extractos crudos de proteínas:	149
2.3.2 PAGE 15% y detección de TnpR por western-blot:	149
2.4. Ensayo de resolución in vivo, utilizando el plásmido pGH436	150
2.5. Estimación de la viabilidad de un cultivo	150
2.6. Actividad replicativa	150
2.7. Construcción de cepas por transducción con el fago P1 _{wt} .	150
2.8. Screening por colony-PCR [PCR a partir de colonia]	151
2.9 Obtención y transformación de células competentes:	151
2.10. Determinación de la sensibilidad a la luz ultravioleta (UV ^R)	152
2.11. Ensayo de segregación del plásmido pGB ₂ - <i>priA</i>	152
2.12. Generación de un fenotipo transiente RecBC ⁻ en el contexto $\Delta priA$ <i>sbcBC sbcCD</i>	152
2.13. Mantenimiento de las cepas	153

1.1 Medios

LB

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

M9

K ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NaCl	0,5 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L

Se ajustó el pH a 7,4, se autoclavó y se añadieron las siguientes soluciones esterilizadas por separado

MgSO ₄ 1M	1 ml/L
glucosa 20%	20 ml/L
CaCl ₂ 0,1M	1 ml/L
Casaminoácidos 20%	
(libres de vitaminas)	20 ml/L
o [L-aminoácidos]	50 µg/ml

Para la preparación de placas se utilizó agar-agar (Merck) al 1,5%.

Antibióticos:

se utilizaron en las siguientes concentraciones finales

Ampicilina (Ap)	100 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	15 µg/ml
Cloranfenicol (Cm)	20 µg/ml
Kanamicina (Km)	30 µg/ml
Espectinomicina (Sp)	50 µg/ml

Soluciones utilizadas para preparar células competentes

Tfb I

Acetato de Potasio	30 mM
CIK	100 mM
Cl ₂ Ca	10 mM
Cl ₂ Mn	50 mM
Glicerol	15 %

pH=5,8 con ácido acético.

Tfb II

MOPS	10 mM
Cl ₂ Ca	75 mM
CIK	10 mM
Glicerol	15 %.

pH=6,5 con KOH

1.2. Cepas

cepa	genotipo relevante	Origen o referencia
AB1157	ver pie de tabla	A.J. Clark
JC7623	AB1157 <i>recB</i> ₂₁ <i>recC</i> ₂₂ <i>sbcb</i> ₁₅ <i>sbcbC</i> ₂₀₁	A.J. Clark
JC5519	AB1157 <i>recB</i> ₂₁ <i>recC</i> ₂₂	A.J. Clark
JC11451	AB1157 <i>sbcb</i> ₁₅ <i>sbcbC</i> ₂₀₁	A.J. Clark
HM101	<i>recA</i> 56	Colección del Lab.
JC19328	AB1157 Δ (<i>srl-recA</i>)306::Tn10 (Tc)	S. Sandler
JC18922	AB1157 <i>recF</i> 349 TnA300::Tn10(Tc) <i>recO</i> 1504::Tn5	S. Sandler
JC18928	AB1157 <i>recR</i> 252::Tn10-9(Km ^R)	S. Sandler
N2057	<i>ruvA</i> 60::tn10(Tc)	R.G. Lloyd
RSH316	FC40 <i>recG</i> 258::Tn10miniKan	S. Rosemberg
BW3323	MC4100 <i>rpoS</i> 358::Tn10(Tc)	C. Arraiano
MB1188	AB1157 Δ <i>priA</i> 1::Km / pEL042	Este trabajo
MB1189	AB1157 <i>priA</i> 2::Km / pEL042	Este trabajo
JC19918	AB1157 <i>priA</i> 2::Km <i>danC</i> 809::Tc	S. Sandler
RW620	AB1157 <i>dnaE</i> 486 <i>zae</i> 502::Tn10(Tc)	M. Goodman
JC19244	AB1157 <i>priC</i> 303::Km <i>dnaC</i> 809	S. Sandler
MB1042	JC7623 / pUCres	Este trabajo
MB1119	JC7623 / pUCrestnpR	Este trabajo
MB1026	JC7623 / pUCres pBADtnpR	Este trabajo
MB1027	JC7623 / pUCres pGH156	Este trabajo
MB1028	JC7623 / pUCres pGH252	Este trabajo
MB1030	JC7623 / pGH156	Este trabajo
MB1031	JC7623 / pGH252	Este trabajo
MB1190	JC7623 <i>rpoS</i> 358::Tn10(Tc)	P1(BW3323) x JC7623 →Tc ^R (e)
MB818	JC7623 <i>recA</i> 56	
MB1244	JC7623 Δ <i>recA</i> 306::Tn10(Tc)	P1(JC19328) x JC7623 →Tc ^R UV ^S (a)
JC8111	JC7623 <i>recF</i> 149	A.J. Clark
MB1245	JC7623 <i>recF</i> 349::TnA300::Tn10(Tc)	P1(JC18922) x JC7623 →Tc ^R UV ^S (a)
MB1246	JC7623 <i>recR</i> 252::Tn10-9(Km)	P1(JC18928) x JC7623 →Km ^R UV ^S (a)
JC12122	JC7623 <i>recJ</i> 284::Tn10(Tc)	A.J. Clark
LMM 820	JC7623 <i>lexA</i> 3 <i>malB</i> ::Tn9(Km)	D. Zahradka
LMM 834	JC7623 <i>lexA</i> 3 <i>recA</i> o98 <i>srl</i> 300::Tn10(Tc)	D. Zahradka
MB 1169	JC7623 <i>recA</i> o98 <i>srl</i> 300::Tn10(Tc)	P1(LMM834) x JC7623 →Tc ^R
MB1160	JC7623 <i>ruvA</i> 60::Tn10(Tc)	P1(N2057) x JC7623 →Tc ^R UV ^S (a)
LMM711	JC7623 Δ (<i>ruvC</i>)64::Km ^R	D. Zahradka
MB1138	JC7623 <i>recG</i> 258::Tn10miniKan	P1(RSH316) x JC7623 →Km ^R UV ^S a)
MB1310	JC7623 / pGB ₂ - <i>priA</i>	Este trabajo
MB1315	JC7623 Δ <i>priA</i> 1::Km / pGB ₂ - <i>priA</i>	P1(MB1188) x MB1310 →Km ^R PCR (b)
MB1291	AB1157 <i>sbcb</i> ₁₅ <i>sbcbC</i> ₂₀₁ Δ <i>priA</i> 1::Km	P1(MB1188) x JC11451 →Km ^R PCR (b)
MB1239	JC7623 <i>priC</i> 303::Km	P1(JC19244) x JC7623 →Km ^R PCR (c)
JJC858	<i>recB</i> 21 <i>recC</i> 22 Δ <i>sbcb</i> <i>sbcbC</i> 201	B. Michel
JJC865	<i>recB</i> ₂₇₀ <i>recC</i> ₂₇₁ Δ <i>sbcb</i> ::Cm <i>sbcbC</i> ₂₀₁ <i>phoR</i> ::Tc	B. Michel
JJC892	JJC865 Δ <i>rep</i> ::Km	B. Michel
WA800	AB1157 <i>recC</i> ₁₀₁₀ ArgA::Tn10(Tc)	A. Kuzminov
AK61	WA800 <i>recF</i> ₄₀₀ ::Tn5	A. Kuzminov
MB1113	JC7623 <i>dnaE</i> 486::Tn10(Tc)	P1(RW620) x JC7623 →Tc ^R termoS (d)

AB1157 tiene el siguiente fenotipo *thr-1 ara-14 leuB6 Δ(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 supE-44 galK2 hisG4 rpsL31 kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 (Rac)*

(a) UV^S: comparación de la curva de UV^R con la del patrón correspondiente y la cepa receptora, siguiendo la metodología detallada en la sección 5.11, M. y M.

(b) PCR a partir de colonia, con los primers 2094 y Kan. Se seleccionaron aquellos clones que amplificaban un fragmento de 300 pb. y se verificó que amplificaran una única banda de 2,3 kpb con los primers 2094 y 3359 (El control salvaje da un fragmento de 1,3 kpb) y no dieran ningún producto de amplificación con los cebadores priA5'-priA3'. Finalmente se verificó por southern que el ADN cromosómico digerido con SmaI diera dos fragmentos de 2,9 y 1,6 kpb con una sonda que abarca todo el gen *priA* (PriAc, preparada por PCR con los primers 5'priA y 3359). Ver mapas de restricción de los loci *priA* salvaje y mutante en Resultados, capítulo 2, sección 2.1.3.1, Figura 62.

cepa	southern: cromos/SmaI y revelado con sonda PriAc	PCR con los cebadores		
		2094 y Kan	2094 y 3359	5'PriA-3'PriA
<i>priA</i> salvaje	2300 pb	-----	1300 pb	1200 pb
<i>ΔpriA1::kan</i>	2900 + 1600 pb	300 pb	2300 pb	-----

(c) PCR a partir de colonia, con los primers priC 5' y priC 3'. Se verificó que amplificaran un fragmento de 2000 pb (la cepa salvaje da un fragmento de 600 pb).

(d) Se verificó que fueran incapaces de crecer a temperatura restrictiva (42°C).

(e) El screening de los transductantes se realizó en base a la determinación de la actividad catalasa (HPII), aplicando una gota de H₂O₂ sobre una colonia de 24 horas en LB agar. El control positivo RpoS⁺ exhibe un burbujeo intenso al aplicar el H₂O₂, mientras que las mutantes *rpoS* no dan ninguna reacción.

1.3. Plásmidos

1.3.1 Vectores y plásmidos provistos por otros laboratorios

plásmido	características	origen / fuente
pUC19	origen pMB1, Ap ^R , αcomplementación	Boehringer
pACYC184	origen p15A, Cm ^R Tc ^R	Chang et.al, 1978
pACYC- <i>tnpR</i>	derivado de pACYC184, Cm ^R , P _{Tc} :: <i>tnpR</i>	A. Camilli
pGH156	derivado de pACYC184, Cm ^R , P _{lacUV5} :: <i>tnpR</i>	N. Grindley
pGH252	derivado de pACYC184, Cm ^R , P _{lacUV5} :: <i>tnpR</i> [R68H]	N. Grindley
pGH436	origen pMB1, Ap ^R , <i>res1</i> -Tc ^R - <i>res1</i>	D. Sherratt
pBAD33	origen p15A, Cm ^R , <i>araC</i> -P _{BAD} - <i>msc</i>	J. Beckwith
pHM6050	origen R1, Ap ^R	H. Masai
pHM-priA	derivado de pHM6050, expresa PriA salvaje	H. Masai
pHM-priA[K230D]	derivado de pHM6050, expresa PriA[K230D]	H. Masai
pHM-priA[CA]	derivado de pHM6050, expresa PriA[CA]	H. Masai
pGB ₂	origen pSC101 (Ts), Sp ^R	
pSF117	derivado de pBR322 (ori pMB1), Ap ^R , <i>cl857</i> -P _R :: <i>gamS</i>	J.B. Hays
pSF119	derivado de pBR322 (ori pMB1), Ap ^R , <i>cl857</i> -P _R :: <i>gamS201</i>	J.B. Hays
pWSK30	origen pSC101, Ap ^R , α complementación	S. Kushner
pEL042	pET3c:: <i>priA</i> , Ap ^R	S. Sandler
pOX13	pBR322::γδ	Reed R. et al. 1979

1.3.2 Plásmidos construidos durante este trabajo

1.3.2.1 pUC $\gamma\delta$: fue generado por transconjugación, según Bellani et al. 1997a.

1.3.2.2 pUCres:

Se amplificó el sitio *res* del transposón $\gamma\delta$, a partir del plásmido pOX13 (pBR322:: $\gamma\delta$) utilizando los primers *resSI* y *resSIII*. El fragmento amplificado de 190 pb fue digerido con HindIII y BamHI y ligado al vector pUC19 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de la cepa JR83. Se seleccionaron clones Ap^R, que hubieran perdido la α -complementación. Se verificó el plásmido por PCR y patrón de restricción.

1.3.2.3 pUCres-*tnpR*:

Se amplificó una región de 900 pb del transposón $\gamma\delta$ (nucleótidos 2162 a 3094 en la secuencia publicada por Broom et al. 1991), que abarca el sitio de resolución *res* y el gen *tnpR*, utilizando los primers *restnpR1* y *restnpR2*, y el plásmido pOX13 como template. El fragmento amplificado fue ligado al vector pGEM-T[®] de Promega, generando el plásmido pGEM-*restnpR*. Luego, aprovechando el sitio Sal I presente en el vector pGEMT y un sitio Sal I interno al fragmento amplificado (a 100 pb del cebador *restnpR2*), se recuperó el fragmento conteniendo *restnpR* de este plásmido por digestión con Sall, y se ligó dicho fragmento de 780 pb. al vector pUC19 linealizado con la misma enzima. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de la cepa DH5 α / F'¹⁸ y se seleccionaron clones Ap^R que hubieran perdido la α -complementación. Se verificó el plásmido por PCR y patrón de restricción.

1.3.2.4 pBAD-*tnpR*:

Se amplificó un fragmento de 600 pb conteniendo la secuencia codificante de TnpR del transposón $\gamma\delta$, a

partir del plásmido pOX13, utilizando los cebadores 5'*tnpR* y 3'*tnpR*. El fragmento amplificado fue digerido con HindIII y SacI y ligado al vector pBAD33 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de la cepa HB101. Se seleccionaron varios clones Ap^R y se realizó un screening para seleccionar aquel que contuviera un plásmido de mayor tamaño que el vector, que presentara el pattern de restricción esperado. Se verificó que el plásmido expresara TnpR en forma condicional, analizando la expresión de TnpR por western-blot con un antisuero específico [ver sección 2.3. M.y M.] y se corroboró que la resolvasa expresada fuera funcional mediante ensayos de resolución *in vivo* utilizando el plásmido reporter pGH436 [ver sección 2.4. M.y M.].

1.3.2.5 pGB₂-*priA*:

Se aisló del plásmido pHM-*priA* un fragmento EcoRI de 2400 pb conteniendo el gen *priA* y se ligó al vector pGB₂ linealizado con EcoRI. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de la cepa [AB1157 $\Delta priA1::kan$], con el objeto de seleccionar el plásmido recombinante en función de la supresión del fenotipo de crecimiento lento de la mutante $\Delta priA$ (que normalmente tarda 48 horas en dar colonias visibles en MM). Se repicaron las colonias crecidas en 24 horas en las placas de selección [M9_{KmSp}], asumiendo que podían crecer normalmente en función de la expresión de PriA a partir del plásmido, y se realizaron minipreparaciones de ADN para confirmar que portaran el plásmido recombinante. Se seleccionó un clon en función del patrón de restricción del plásmido portado. Se amplificó el plásmido correspondiente, y se verificó que fuera capaz de complementar las múltiples deficiencias de una mutante *priA*, tales como sensibilidad al medio rico, y sensibilidad exacerbada al UV. Se corroboró que se perdiera por segregación a temperatura restrictiva.

1.3.2.6 pWSK-117 y pWSK-119:

Se amplificó a partir del plásmido pSF117, un fragmento conteniendo el gen del represor termosensible de λ y el gen *gam* [λ cI857-P_R::*gam*S] con los cebadores pSF117S y pSF117AS. El fragmento de 1400 pb amplificado por PCR, fue clonado en el vector pGEM-T[®] de Promega, generando el plásmido pGEM-117. Luego se recuperó el fragmento conteniendo [λ cI857-P_R::*gam*S] a partir de este plásmido por digestión con Sall, y se ligó dicho fragmento al vector pWSK30 linealizado con Sall y fosfataseado. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes de la cepa DH5 α / F'¹, y se seleccionaron clones Ap^R que hubieran perdido la α -complementación. Tanto la selección como los posteriores repiques fue-

ron realizados a 30°C. El plásmido pWSK-119 fue construido a partir de pSF119, siguiendo el mismo esquema.

Los plásmidos pWSK-117 y pWSK-119 fueron verificados por el patrón de restricción y en particular se corroboró que el plásmido pWSK-119 contuviera el sitio XhoI dentro del gen *gamS*. Finalmente, se verificó *in vivo*, la inducibilidad de la expresión y la funcionalidad de la proteína GamS expresada, introduciendo estos plásmidos en la cepa JC11451 [*sbcB sbcCD*] y verificando que pWSK-117 acumulara HMW a 37°C pero no a lo hiciera a 28°C; y que pWSK-119 no fuera capaz de acumular HMW a ninguna de las dos temperaturas.

1.4 Cebadores.

Res.-Cap 1 Sección 1.1.2.a: construcción del plásmido pUCres

res SI 5' TGATGAAGCTT GGTACC GTCGACTTGACAGTTATTCATTAACAA 3'
HindIII KpnI SalI

res SIII 5' ATGATGGGATCC GTCGACTCAACCAAAAAAGTCGCATAAAAA 3'
BamHI SalI

Utilizados en la construcción del plásmido pUCres, para amplificar el fragmento conteniendo el sitio de resolución *res* del transposon $\gamma\delta$ (ntdos. 3068 a 3226 de secuencia genbank D16449) e insertarlo en el plásmido pUC19. Ver sección 1.2.2 M. y M.

Res. - Cap1 Sección 1.1.1 construcción del plásmido pUCrestnpR

resTnpR 1 5' TGTCGTATCACCAAACGGAT 3'
resTnpR 2 5' AGATCCCGTTCATCAAGAT 3'

Utilizados en la construcción del plásmido pUCres-tnpR, para amplificar un fragmento del transposon $\gamma\delta$ que contiene el sitio de resolución *res* y el gen *tnpR* [nucleótidos 2162 a 3049 de la secuencia del $\gamma\delta$ según Broom et al. 1991], e insertarlo en el plásmido pUC19. Ver sección 1.2.3 M. y M.

Res. - Cap 1 Sección 1.1.2.d Construcción del plásmido pBAD-*tnpR*

5' tnpR 5' ATGATGGAGCTCTAGGATACATTTTTATGC 3'
SacI

3' tnpR 5' ATGATGAAGCTTAACCTTTTATGTTAGTT 3'
HindIII

Utilizados en la construcción del plásmido pBAD-tnpR, para amplificar la región codificante del gen *tnpR* del transposon γ D [nucleótidos 3202 a 3838 de la secuencia genbank D16449] e insertarlo en el vector pBAD33 bajo control del promotor P_{BAD}. Ver sección 1.2.4 M. y M.

Sonda Ap299

Ap113 S 5' CGCGGTATTATCCCGTGTTG 3'

Ap411 AS 5' GCTCGTCGTTTGGTATGGCTT 3'

Utilizados para generar la sonda Ap299 por PCR a partir del plásmido pUC19. Ver sección 2.2. M. y M.

Sonda PriA (1,2 kpb)

5'priA 5' CGTTGCCTTGCCCGTTCCGC 3'
 3'priA 5' ATCCAGCACATGTTGAATTGCC 3'

Utilizados para preparar la sonda PriA por PCR [ver sección 5.2 M. y M.]. Amplifican un fragmento de 1200 pb del extremo 5' del gen. Esta sonda se utilizó para revelar el gen cromosómico en los southern en los que se estima la relación plásmido/cromosómico, en la sección 1.3.2. de Resultados capítulo1, figura 50, secciones E y F.

Verificación de transductantes $\Delta priA::kan$ [Res. - Cap 2 secciones 2.1.3.1 y 2.1.3.2]

priA 2094 5' CGCGCTGGAAACGTTATGC 3'
 priA 3359 5' CCTGGCACGTCAGGCGTAC 3'

Permiten verificar el alelo $\Delta priA1::Kan$. La cepa salvaje da un fragmento de 1300 pb y la que porta la mutación $\Delta priA1Kan$ da un fragmento de 2300 pb. Ver pie de tabla en sección 1.2 M.y M.

Res. -Cap. 2 Secciones 2.1.3.1 y 2.1.3.2 Screening para la selección de transductantes $\Delta priA1::Kan$

priA 2094 5' CGCGCTGGAAACGTTATGC 3'
 Kan 5' GCTGACTTGACGGGACGGC 3'

Permite verificar por colony-PCR la mutación $\Delta priA1::kan$. La cepa $\Delta priA1Kan$ amplifica un fragmento de 300 pb, mientras que la salvaje no genera ningún producto de amplificación.

Sonda PriAc (2,4 kpb) Verificación de transductantes $\Delta priA1::kan$

5'priA 5' CGTTGCCTTGCCCGTTCCGC 3'
 3359 5' CCTGGCACGTCAGGCGTAC 3'

Utilizados para generar la sonda PriA por PCR a partir de ADN cromosómico de la cepa salvaje (AB1157) [ver sección 5.2 M. y M.]. Genera un fragmento de 2400 pb que abarca el gen completo. Esta sonda fue utilizada en la verificación por southern, de las mutantes $\Delta priA1::kan$ construidas por transducción. Ver Figura 50.

Res. - Cap. 2 Sección 2.2.1 Screening para la selección de transductantes $priC::kan$

priC 5' 5' ATATTGAGTGTTGTCAGC 3'
 priC 3' 5' TCCTCCAGCAGCACAATC 3'

Utilizados para corroborar la transducción de la mutación $priC303::kan$. Los transductantes permiten amplificación de un fragmento de 2000 pb mientras que la cepa salvaje amplifica un fragmento de 600 pb (Sandler S.J. 2000).

Res. - Cap. 2 Sección 2.1.2.2 Construcción de los plásmidos pWSK-117 y pWSK-119

pSF117 S 5' ATGGTCTGACTAGGCGTATCACGAGGCC 3'

Sall

pSF117 AS 5' GAGCTGACTGGGTTGAAGGC 3'

Utilizados en la construcción de los plásmidos pWSK-117 y pWSK-119, para amplificar un fragmento de 1400 pb que contiene el gen que codifica por el represor del fago λ termosensible y el gen *gamS* bajo control del promotor P_R [λ cl857- P_R -*gamS*], a partir de los plásmidos pSF117 y pSF119 respectivamente. Ver sección 1.3.2.6 Mat. y Met.

2.1 Southern para analizar las formas del plásmido

2.1.1 Preparación de lisados totales de ADN:

método adaptado a partir de Zaman MM & Boles T.C., 1994. Partiendo del equivalente a 10 ml de cultivo con una DO de 0,7, se recolectan las células por centrifugación y se lisan en 600 µl de solución de lisis [Tris-ClH pH7,5 100mM, EDTA 30mM, SDS 1%, Proteinasa K 1%, RNAsa 30µg/ml] a 32° durante la noche (ON). Para facilitar el posterior procesamiento se rompe el ADN pasándolo 20 veces por una punta (tip) de 1000 ml. y luego se purifica mediante 2 extracciones con fenol-cloroformo-isoamílico [24:23:1] y 3 extracciones con cloroformo-isoamílico [24:1]. Se agrega 50 µl de Acetato de sodio 5M y 1ml de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se resuspende en 50 µl de agua deionizada, estéril.

2.1.2 Cuantificación:

por medición de la absorbancia a 260 nm., según Sambrook J. et al. 1989.

2.1.3 Digestión con enzima de restricción:

para determinar el % de HMW de un lisado, se trató una fracción del lisado conteniendo 8 µg de ADN total en un volumen final de 40µl., con una enzima que digiriera el cromosómico (y linealizara el plásmido que complementa TnpR) pero que no afectara al plásmido reporter. De esta manera se evita que el ADN genómico (y el plásmido que expresa TnpR), interfiera en la detección del HMW del plásmido. Para determinar la relación plásmido/cromosómico se utilizó una enzima que digiriera al cromosómico y linealizara el plásmido reporter. En la tabla 7 se especifican las enzimas utilizadas en cada caso.

2.1.4 Southern

2.1.4.a Gel y transferencia :

se separaron 2 µg. de ADN total en un gel de agarosa 0,6% (en algunos casos 4 horas a 3 volts/cm, en otros ON a 0,7 volts/cm). Se incubó el gel 15 min. en solución de depurinización [CIH 0,25%] y luego 2x15 min. en solución de desnaturalización [NaOH 0,5 M]. Se transfirió el ADN a una membrana de nylon (GeneScreen™ NEN® Life Science Products) por vacío, en un 'Vacuum Blotter' de Bio Rad, en buffer SSC 10X a 5 mm. Hg durante 3 horas. Fue el único método que demostró una eficiencia del 100 % y reproducibilidad para transferir el ADN de alto peso molecular correspondiente al HMW. El ADN fue fijado a la membrana por exposición durante 5 min. a luz ultravioleta en un transiluminador.

2.1.4.b Hibridación:

Se incubó la membrana durante 2 horas a 50°C en solución de prehibridación [SSC 5X, Denhardt's 5X, PO₄HNa₂ 25mM, SDS 0,5%], y luego ON a 60°C en solución de hibridación [SSC 5X, Denhardt's 1X, PO₄HNa₂ 20mM, PEG(8000) 5%, ADN de esperma de salmón 150µg/ml] conteniendo la sonda biotinilada.

2.1.4.c Lavados:

2 x 3min. en solución I a temperatura ambiente [SSC 2X, SDS 0,1%], 2 x 3min en solución II a temperatura ambiente [SSC 0,2%, SDS 0,1%] y 2x15min. a 65°C en solución III [SSC 0,16X, SDS 0,1%].

5.1.4.d Detección y revelado:

por quimioluminiscencia utilizando CDP-star® como sustrato, según instrucciones del fabricante del kit (New England Biolabs). El revelado se realizó en algunos casos exponiendo la membrana distintos tiempos a una radiografía en un cassette de revelado con una pantalla Kodak Biomax MS y en otros en un

pUC y pUCres	%HMW: EcoRV [sonda Ap299]	pl/cr: HindIII	[sonda Ap299 + PriA]
serie pHM6050	%HMW: SacI [sonda Ap299]	pl/cr: EcoRI	[sonda PriA]
pWSK-117	%HMW: SfiI [sonda Ap299]	pl/cr: StuI	
pGB ₂ priA	%HMW: XbaI [sonda PriAc]		
southern para analizar gen <i>priA</i> :	ADN total digerido con SmaI		[sonda PriAc]

Tabla 7 Enzima y sonda utilizada en cada experimento.

detector de quimioluminiscencia (LAS-1000 Luminescence Image Analyzer, Fuji)

2.1.4.e Densitometría:

utilizando los programas Image Quant o Image Gauge (Fuji). Para calcular el %HMW se refirió la intensidad de las bandas correspondientes al HMW y la señal en el origen, a la sumatoria de intensidades de todas las bandas de la calle y se multiplicó esta relación por 100. La relación HMW/FC se calculó refiriendo la intensidad de las bandas (HMW+origen) a la intensidad de las bandas correspondientes a todas las formas circulares. La relación plásmido/cromosómico, se calculó refiriendo la intensidad de la banda correspondiente al total del plásmido linealizado a la intensidad de la banda correspondiente a un gen cromosómico.

2.2 Preparación de sondas biotiniladas por PCR

Las sondas Ap299, PriA y PriAc. fueron sintetizadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN genómico de *E. coli* AB1157, utilizando los cebadores correspondientes y una mezcla de nucleótidos conteniendo dATP biotinilado. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne, en un volumen de 50 µl conteniendo mezcla de reacción [tampón PCR 1x (Promega o Gibco-BRL), 0,5 unidades de Taq (Promega o Gibco-BRL), de la mezcla de dNTPs conteniendo el nucleótido biotinilado y 0,2 µM de cada cebador] y 0,1 µg de ADN cromosómico. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Biosynthesis Inc., Lousville, Texas (USA).

Sonda tamaño cebadores utilizados

Ap299 300 pb Ap113S y Ap411AS

PriA 1200 pb 5'PriA y 3'PriA

PriAc 2400 pb 5'PriA y 3359

Una vez amplificado el fragmento en cuestión se corrió el producto de la reacción de amplificación en un gel de agarosa 0,8% y se purificó el fragmento amplificado a partir del gel, utilizando columnas Supelco®.

2.3 Western-blot para detectar TnpR

2.3.1 Preparación de extractos crudos de proteínas:

se recolectaron por centrifugación cultivos en fase exponencial (DO 0,8) o fase estacionaria (según indicado en la figura correspondiente), se resuspendieron en 1ml. de buffer TDP (Tris-HCl 20mM pH=7,5, DTT 1mM, PMSF 0,1mM) y se sometieron a tres ciclos de sonificado durante 25 segundos en un baño de acetona:hielo. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm. durante 15 min. y el sobrenadante fue mantenido a -20°C. Se determinó la concentración de proteínas totales en el extracto utilizando el reactivo Protein Assay (Bio Rad), empleando seroalbúmina bovina (Sigma) para establecer la curva estándar de concentraciones.

2.3.2 PAGE 15% y detección de TnpR por western-blot:

las muestras fueron calentadas a 100°C durante 5 min. en tampón de corrida. Se sembraron 100 µg de proteínas totales en cada pocillo. Las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE 15%

(Laemmli 1970) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Nitrobind®, Osmonics), por electrotransferencia en un Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) en buffer de transferencia (Trizma 25mM, glicina 192mM, metanol 20% v/v) a 30V durante 16hs. La proteína TnpR fue detectada con un anticuerpo policlonal donado por el Dr. N. Grindley. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. La detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando CDP-star® como sustrato, según instrucciones del fabricante (Phototope®-Star Western Blot Detection kit, New England Biolabs).

2.4 Ensayo de resolución in vivo, utilizando el plásmido pGH436

El ensayo consiste en cultivar la cepa HB101 conteniendo el plásmido reporter pGH436 y el plásmido que expresa TnpR (pGH156 o pBADtnpR) en caldo LB_{CmAp} suplementado con glucosa 0,2% o el inductor correspondiente (IPTG 1mM o arabinosa en distintas concentraciones, respectivamente). Transcurridas 24 horas, se realizaron diluciones seriadas del cultivo y plaqueo en LB_{CmAp} y LB_{CmApTet}. Los recuentos obtenidos permiten determinar el porcentaje de células resistentes a la tetraciclina (% Tc^R). La proporción de células en las que hubo resolución catalizada por TnpR puede calcularse mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ Resolución} = 100 - \% \text{Tet}^R$$

2.5 Estimación de la viabilidad de un cultivo

Se realizaron diluciones seriadas en LB y se sembraron en placas de LBagar que fueron incubadas durante 24 horas a 32°C. Se utilizaron los recuentos en placas de LBagar para determinar las ufc/ml de cada cultivo. Luego se calculó la viabilidad refiriendo el valor de ufc/ml a la densidad óptica (DO) del cultivo. En el caso de cepas ΔpriA1::kan tanto las diluciones como los recuentos se realizaron en medio mínimo

M9. En aquellos experimentos en los que se reporta viabilidad en LB y LB_{Ap}, se realizaron recuentos en placas de LBagar y LBagar suplementado con ampicilina (100 μg/ml) respectivamente, y se refirieron las ufc/ml en LBagar y LB_{Apagar} a la DO del cultivo. Esto permite estimar el %ApR del cultivo, que es indicativo de la estabilidad del plásmido en una cepa en determinadas condiciones de cultivo.

2.6 Actividad replicativa

A distintos tiempos se tomó una muestra del cultivo para determinar la densidad óptica y se sometió una alícuota de 500μl a un pulso de [³H]metil-timidina de 10 μCi/ml [activ. específica: 82 Ci/mmol] (Amersham) en un baño termostatzado (a 32°, 28° o 42°C, según indicado en cada experimento) durante 15 minutos. Luego se transfirieron 100 μl a un tubo conteniendo 4 ml de TCA 5% frío y se mantuvo en hielo durante una hora. Se recogió el material precipitado con el ácido, filtrando a través de una membrana Whatman® GF/C y se lavó con 10 ml de TCA 5% frío y 10 ml de Etanol 95% frío. Una vez secado el filtro, se transfirió a un vial con líquido de centelleo Ultima Gold®, Packard. Finalmente se midió la radioactividad incorporada al material precipitable con TCA presente en cada filtro, en un contador de centelleo (Wallac 1409 DSA, Liquid scintillation counter). Para cada muestra se refirieron los valores de desintegraciones por minuto (dpm) a la densidad óptica del cultivo, a los efectos de poder comparar entre cultivos que poseían distinta densidad óptica.

2.7 Construcción de cepas por transducción con el fago P1vir.

Las distintas mutaciones fueron introducidas en la cepa JC7623 por transducción generalizada utilizando lisados transductores del bacteriófago P1_{vir}, preparados en la cepa correspondiente [Según Miller 1992]. En general la selección se hizo en placas de

LB suplementadas con el antibiótico correspondiente y citrato sódico 5 mM; y luego se verificó que los potenciales transductantes exhibieran el fenotipo característico de la mutación que se deseaba transducir: en algunos casos sensibilidad a la temperatura, en otros sensibilidad exacerbada al UV. En aquellos casos en los que la adquisición de la mutación no era verificable por el fenotipo, se realizó un screening por PCR a partir de colonia utilizando los cebadores especificados al pie de la tabla de cepas.

En el caso específico de la transducción del alelo *ΔpriA1::kan*, tanto el experimento de transducción como los repiques posteriores se realizaron en medio mínimo M9 suplementado con glucosa 0,2%, casaminoácidos 0,2% y kanamicina 30 μg/ml, para evitar la aparición de mutaciones supresoras en *dnaC*, que pudieran suprimir parcial o totalmente el fenotipo de la mutante *priA*; tomando el recaudo de repicar colonias pequeñas que tardaran más de 24 horas en crecer.

2.8 Screening por colony-PCR [PCR a partir de colonia]

Para analizar los potenciales transductantes se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando material de las propias colonias como fuente de ADN molde. Se repicaron las colonias de la placa de selección a nuevas placas, en las que se adjudicó un número a cada clon. Estas fueron incubadas a 32°C durante 24 o 48 horas, según la mutación en cuestión. Con un escarbadiante nuevo estéril, se transfirió material correspondiente a cada clon de la placa de repique a un tubo de PCR de 500 μl. Se fraccionó 30 μl de la mezcla de reacción [tampón PCR 1X, dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,2 μM, Taq Polimerasa 0,05 u/μL] en cada tubo conteniendo las células a analizar y se lisaron las células en el mismo ciclador, durante un ciclo de 4 minutos a 94°C. Luego se realizó la reacción de PCR, utilizando el programa

adecuado, detallado a continuación en función del par de cebadores empleado. La secuencia de reacción fue: 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 0,5-1 min. a la temperatura óptima para cada par de cebadores (especificada más abajo) y extensión de 1 min. a 72°C, con una extensión final de 10 min. a 72 °C. adecuada .

cebadores 2094 / Kan	67 °C
cebadores 2094 / 3359	67 °C
cebadores 5'priA / 3'priA	65 °C
cebadores priC5' / priC3'	58 °C

Finalmente se analizaron los productos de amplificación en un gel de agarosa 0,8% o 1,5% en buffer TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH=8,0). Una vez teñidos con bromuro de etidio 1 μg/ml., los geles fueron examinados con luz UV y fotografiados con una película Polaroid 667.

En cada reacción de PCR, se analizó en paralelo una colonia correspondiente al control positivo, otra correspondiente al control negativo y se realizó un control negativo de la reacción sin ADN ni células. En aquellas situaciones en las que se debía analizar un gran número de colonias, se analizó un 'pool' de clones en cada tubo, incorporando material de 10 clones por tubo de reacción. Luego se analizó cada clon en particular del pool que hubiera dado positivo. En estos casos el control positivo incluía material de una colonia del control positivo y de 9 colonias del control negativo, para verificar que en las condiciones de reacción utilizadas se pudiera detectar un único clon positivo en un pool.

2.9 Obtención y transformación de células competentes:

las células competentes se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1983). Brevemente: un cultivo de 16hs. fue diluido 1/60 en medio LB suplementado con SO₄Mg 20 mM y crecido durante 3-4 hs. hasta alcanzar una DO 0,8. Luego se recolectaron las células por centrifugación durante 10

min. a 10.000 rpm a 4°C; se resuspendieron en solución Tfb I fría y se mantuvieron en hielo durante 5 min. Posteriormente las células fueron centrifugadas al igual que en el paso anterior y el pellet fue resuspendido en 1 ml. de Tfb II. Se alicuotaron las células de a 50 µl y fueron conservadas a -70°C.

Para la transformación se tomaron 50 µl de células competentes y se les agregó de 1-5 µl del plásmido de interés. Se incubaron en hielo durante 30 min., se realizó un choque térmico de 90-120 segundos a 42°C y se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min.. Las células se diluyeron en 200 µl de LB líquido y se incubaron 1 hora a 37°C (o 30°C según el caso) con agitación. Posteriormente se sembraron en placas de selección con el antibiótico adecuado, que fueron incubadas en estufa a 37°C (o 30°C según corresp.).

2.10 Determinación de la sensibilidad a la luz ultravioleta (UV^R)

Se analizaron cultivos promediando la fase exponencial (DO= 0,6-0,9). Todas las etapas previas a la exposición al UV se llevaron a cabo en penumbra. Se realizaron diluciones seriadas en LB y plaqueo de las diluciones correspondientes en LB agar. Las placas fueron expuestas a luz UV (lámpara germicida, luz UVB) a 50 cm de distancia durante 0, 15, 30 o 45 segundos e incubadas ON a 32 °C en oscuridad. En base a los recuentos se calculó las ufc/ml y para calcular el % de resistentes se refirió las ufc/ml de los distintos tiempos de exposición al valor de ufc/ml de las células que no habían sido expuestas al UV. Las curvas de % de células resistentes al UV en función del tiempo de exposición permiten comparar la resistencia al UV de una determinada cepa respecto de un control. Las distintas mutantes de recombinación presentan una sensibilidad al UV característica.

2.11 Ensayo de segregación del plásmido pGB₂-priA

Se cultivó la cepa JC7623 $\Delta priA1::Kan/pGB_2priA$ en M9_{KmSp} a 30°C durante la noche (ON). Se diluyó 1000 veces el cultivo en medio M9_{Km} [DOi 0,002], se incubó durante 2 horas a 30°C y luego se transfirió a 42°C. Durante seis horas, se tomaron alícuotas del cultivo cada dos horas para realizar recuentos en placas de M9_{Km} y M9_{KmSp}. Las placas se incubaron a 32°C y se realizaron recuentos después de 1, 2 y 3 días, ya que las cepas $\Delta priA$ tardan 48 horas en crecer. Luego se repicaron colonias de las placas de M9_{Km} correspondientes a las 2, 4 y 6 horas, a placas de M9_{Km} y M9_{KmSp}, para identificar aquellas que hubieran perdido el plásmido.

2.12 Generación de un fenotipo transiente RecBC⁻ en el contexto $\Delta priA sbcBC sbcCD$

La cepa MB1291 fue transformada con el plásmido pWSK-117, y se repicó un transformante a una placa de M9_{KmAp}, que fue incubada durante 48 horas a 32°C. Se verificó que el crecimiento en la estría fuera homogéneo, constituido por colonias pequeñas que tardaran más de 24 horas en crecer y se procedió a levantar estas colonias con un ansa, para resuspenderlas en 1 ml. de medio mínimo con el objetivo de utilizar dicha suspensión como inóculo. Por otro lado, las cepas JC1145/pWSK-117 y JC11451/pWSK-119 fueron estriadas en placas de M9_{Ap} (a partir del glicerolado correspondiente) e incubadas durante 24 horas a 32°C. Se levantaron colonias aisladas de estas placas para utilizar como inóculo.

Se realizaron cultivos de las tres cepas en M9_{(Km)Ap} en un baño con agitación (180 rpm), termostatzado a 28°C, partiendo de una densidad óptica de 0,015. Se midió la DO de los cultivos cada 90 minutos para monitorear el crecimiento. En el caso de la cepa JC11451, a las 6 horas de cultivo, cuando alcanzó una DO de 0,8, se tomó la muestra correspondiente

al to y se dividió el cultivo en dos partes, una se mantuvo a 28°C y la otra fue transferida a un baño a 37°C. Transcurridas 1,5, 3 y 24 horas se tomaron muestras para analizar el plásmido.

Dado que la cepa MB1292 es más lenta para crecer, debido a la mutación *priA*, se cultivó durante 9 horas a 28°C, hasta que alcanzó una DO de 0,2. Luego se tomó la muestra correspondiente al to y se dividió el cultivo en dos partes, una se mantuvo a 28°C y la otra se incubó a 37°C. Transcurridas 24 horas se tomó una muestra para analizar el plásmido

pWSK-117. Los lisados totales fueron digeridos con la enzima Sfi I, que no posee sitios de corte en ninguno de los dos plásmidos y luego fueron separados en un gel de agarosa, sometidos a southern-blot y posterior hibridación con la sonda Ap299, según especificado en la sección 2.1.4.

2.13 Mantenimiento de las cepas:

Se prepararon gliceroles de cada cepa a partir de un cultivo ODay en medio selectivo (según Miller J.H., 1992) y se mantuvieron en un freezer a -20°C.

Bibliografía

- Asai T. and Kogoma T.** (1994) D-Loops and R-Loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176(7): 1807-1812.
- Austin S., Ziese M. and Sternberg N.** (1981) A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25: 729-736.
- Barre F.X., Aroyo M., Colloms S.D., Helfrich A., Cornet F and Sherratt D.J.** (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* 14 : 2976-2988.
- Barre F.X., Seballe B., Michel B., Aroyo M., Robertson M. and Sherratt D.** (2001) Circles : The replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8189-8195.
- Bellani M., Nudel C. and Sanchez Rivas C.** (1997b) Site-specific recombination system from Tn1000($\gamma\delta$) stabilises recombinant plasmids in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 19(4): 331-333.
- Bellani M., Schlain V., Nudel C. and Sanchez Rivas C.** (1997a) Tn1000($\gamma\delta$) insertions stabilize pBR322-derived recombinant plasmids in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 19: 1-5.
- Blakely G, May G., McCulloh R, Arcizewska LK, Burke M, Lovett ST. and 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.
- Blakely G. & Sherratt D.J.** (1996) Determinants of selectivity in Xer site specific recombination. *Genes Dev.* 10: 762-773.
- Boocock M.R., Zhu X. and Grindley N.D.F.** (1995) Catalytic residues of $\gamma\delta$ resolvase act *in cis*. *EMBO J.* 14(20): 5129-5140.
- Bridges B.A.** (1997) DNA turnover and mutation in resting cells. *Bioessays* 19: 347-352.
- Bridges B.A., and Erelra S.** (1998) DNA synthesis and viability of a *mutT* derivative of *Escherichia coli* WP2 under conditions of aminoacid starvation and relation to stationary phase (adaptive) mutation. *J. Bacteriol* 180: 2906-2910.
- Broom J.E., Hill D.F., Hughes G., Jones W.A., Mc Naughton J.C., Stockwell P.A. and Petersen G.B:** (1991). Sequence of a transposon identified as Tn1000 ($\gamma\delta$). EMBL/GenBank/DDBJ Accesion number: X60200.
- Bussiere D.E. & Bastia D.** (1999) Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes *Mol. Microbiol.* 31: 1611-1618.
- Chang A.C.Y. & Cohen S.N.** (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.
- Chang D-E., Shin S., Rhee J-H., Pan J-G.** (1999) Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J. Bacteriol.* 181(21): 6656-6663.
- Churchill J.J., Anderson D.G., Kowalczykowski S.C.** (1999) The RecBC enzyme loads RecA protein onto ssDNA asymmetrically and independently of χ .

resulting in constitutive recombination activation. *Genes Dev.* 13: 901-911.

Cohen A. and Clark A.J. (1986) Synthesis of linear plasmid multimers in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 167(1) : 327-335.

Connelly J.C. & Leach D.R.F. (1996) The *sbvC sbvD* genes of *Escherichia coli* encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination. *Genes Cells* 1: 285-291.

Connelly J.C., Kirkham L.A. & Leach D.R.F. (1998) The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:7969-7974.

Cornet F., Mortier I., Patte J. & Louarn J.M. (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site *psi* which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous *E. coli dif* site. *J. Bacteriol.* 176: 3188-3195.

Cox M.M. (1998) A broadening view of recombinational repair in bacteria. *Genes cells* 3: 65-78.

Cox M.M. (2001a) Historical overview : Searching for the replication help in all the rec places. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8173-8180.

Cox M.M. (2001b) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli* : questions. *Annu. Rev. Genet.* 35: 53-82.

Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J. and Mariani K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404: 37-41.

Cromie G.A., Millar C.B., Schmidt K.H. and Leach D.R.F. (2000) Palindromes as substrates for multiple pathways of recombination in *Escherichia coli*. *Genetics* 154: 513-522.

Dabert P., Ehrlich S.D. and Gruss A. (1992) χ sequence protects against RecBCD degradation of DNA *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12073-12077.

Davey M.J. and O'Donnell M. (2000) Mechanisms of DNA replication. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 581-586.

Deibler R.W., Rahmati S. and Zechiedrich E.L. (2001) Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev.* 15: 748-761.

Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarría M.J., Espinosa M. and Díaz-Orejas R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 62(2): 434-464.

Dodd H.M. and Bennett P.M. (1986) Location of the site-specific recombination system of R46: a function necessary for plasmid maintenance. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1009-1020.

Dodd H.M. and Bennett P.M. (1987) The R46 site-specific recombination system is homologue of the Tn3 and $\gamma\delta$ (Tn1000) cointegrate resolution system. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2031-2039.

Eberl L., Kristensen C.S., Givskov M., Grohmann E., Gerlitz M. and Schwab H. (1994) Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol. Microbiol.* 12(1) : 131-141.

- Foster P.L.** (1999) Mechanism of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu. Rev. Genet.* 33: 57-88.
- Foster P.L.** (2000) Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays* 22(12): 1067-1074.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & Siede W.** (1995a) DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington D.C. Chapter 1: DNA damage. p. 1-47.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & Siede W.** (1995b) DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington D.C. Chapter 3: DNA repair by reversal of damage. p.91-126.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & Siede W.** (1995c) DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington D.C. Chapter 4: Base excision repair. p.135-181.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & Siede W.** (1995d) DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington D.C. Chapter 5: Nucleotide excision repair in prokaryotes. p.191-225.
- Friedberg E.C., Walker G.C. & Siede W.** (1995e) DNA repair and mutagenesis. ASM press, Washington D.C. Chapter 9: Mismatch repair. p.367-399.
- Friedman S.H. and Hays J.B.** (1986) Selective inhibition of *E. coli* RecBC activity by plasmid encoded GamS function of phage lambda. *Gene* 43(3):255-263.
- Friedman S.H. and Hays J.B.** Selective inhibition of *E. coli* RecBC activity by plasmid encoded GamS function of phage λ . *Gene* 1986 43(3):255-263.
- Galitski T.** (1996) Ph.D. Thesis, University of Utah.
- Galitski T. and Roth J.R.** (1997) Pathways for homologous recombination between chromosomal direct repeats in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* 146 : 751-767.
- George J.W., Storh B.A., Tomso D.J. and Kreuzer K.N.** (2001) The tight linkage between DNA replication and double-strand break repair in bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8290-8297.
- Gibson F., Leach DRF., Lloyd R.G.** (1992) Identification of sbcD mutations as cosuppressors of recBC that allow propagation of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174(4): 1222-1228.
- Goodman M.F. and Tippin B.** (2000) The expanding polymerase universe. *Nature Reviews* 1: 101-109.
- Gregg A.V., McGlynn P., Jaktaji R.P. and Lloyd R.G.** (2002) Direct rescue of stalled DNA replication forks via the combined action of PriA and RecG helicase activities. *Mol. Cell* 9: 241-251.
- Grindley N.D.F.** (1997) Site-specific recombination: synapsis and strand exchange revealed. *Current Biology* 7:R608-R612.
- Gruss A. and Michel B.** (2001) The replication-recombination connection: insights from genomics. *Curr. Op. Microbiol.* 4: 595-601.
- Hallet B. and Sherratt D.J.** (1997) Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiology Reviews* 21 : 157-178.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of

- Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Hastings P.J., Bull H.J., Klump R. and Rosenberg S.M.** (2000) Adaptive amplification: an inducible chromosomal instability mechanism. Cell 103: 723-731.
- Hengge-Aronis R.** (2000) Chapter 11: The general stress response in *Escherichia coli*, p. 161-178. In Storz G. and Hengge-Aronis R. Eds. Bacterial stress responses, ASM press, Washington D.C.
- Hojgaard A., Szerlong H., Tabor C. and Kuempel P.** (1999) Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the *dif* resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with Topoisomerase IV. Mol. Microbiol. 33(5): 1027-1036.
- Hong X., Cadwell G.W. and Kogoma T.** (1996) Activation of Stable DNA Replication in rapidly growing *Escherichia coli* at the time of entry into stationary phase. Mol. Microbiol. 21:953-961.
- Hughes R.E., Hatfull G.F., Rice P., Steitz T.A., and N.D. Grindley** (1990) Cooperativity mutants of the $\gamma\delta$ Resolvase identify an essential interdimer interaction. Cell. 63, 1331-1338
- Ishihama I.** (1999) Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. Genes Cells 4: 135-143.
- Jones J.M. and Nakai H.** (1997) The Φ X174-type primosome promotes replisome assembly at the site of recombination in bacteriophage Mu transposition. EMBO J. 16(22): 6886-6895.
- Jones J.M. and Nakai H.** (2000) PriA and phage T4 gp59: factors that promote DNA replication on forked DNA substrates. Mol. Microbiol. 36(3): 519-527.
- Karu A.E. & ED Belk,** (1982) Induction of *E.coli* RecA protein via RecBC and alternate pathways: quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Mol. Gen. Genet. 185(2): 275-282.
- Kirkpatrick C., Maurer L.M., Oyelakin N.E., Yoncheva Y.N., Maurer R. and Slonczewski J.L.** (2001) Acetate and formate stress: oppsite responses in the proteome of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 183(21): 6466-6477.
- Kogoma T.** (1996) Recombination by Replication. Cell 85: 625-627.
- Kogoma T.** (1997) Stable DNA Replication: Interplay between DNA replication, homologous recombination and transcription. Microbiol. Mol. Biol. Reviews 61(2): 212-238.
- Kogoma T., Cadwell G.W., Barnard K.G. and Asai T.** (1996) The DNA replication priming protein, PriA, is required for homologous recombination and double-strand break repair. J. Bacteriol. 178(5): 1258-1264.
- Kowalczykowski S.C.** (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends Biochem. Sci. 25: 156-165.
- Kreuzer K.N.** (2000) Recombination-dependent replication in phage T4. Trends Biochem. Sci. 25: 165-173.
- Kristensen C.S., Eberl L., Sanchez-Romero J.M., Givskov M., Molin S. and De Lorenzo V.** (1994) Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-

- host-range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177(1): 52-58.
- Kumari S., Beatty C.M., Browning D.F., Busby S.J.W., Simel E.J., Hovel-Miner G. and Wolfe A.J.** (2000) Regulation of Acetyl Coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182(15):4173-4179.
- Kusano. K, Nakayama K and H. Nakayama,** (1989). Plasmid-mediated lethality and plasmid multimer formation in an *Escherichia coli* *recBC sbcBC* mutant. *J.Mol.Biol.* 209: 623-634.
- Kushner S.R.** (1974a) *In vivo* studies of temperature-sensitive *recB* and *recC* mutants. *J. Bacteriol.* 120: 1213-1218.
- Kushner S.R.** (1974b) Differential thermostability of exonuclease and endonuclease activities of the RecBC nuclease isolated from thermosensitive *recB* and *recC* mutants. *J. Bacteriol.* 120: 1219-1222.
- Kuzminov A.** (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ . *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 63(4) 751-813.
- Kuzminov A.** (2001) DNA replication meets genetics exchange: Chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8461-8468.
- Kuzminov A. and Stahl F.W.** (1999) Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication. *Genes Dev.* 13: 345-356.
- Kuzminov A., Schabtach E. and Stahl F.W.** (1997) Study of plasmid replication in *Escherichia coli* with a combination of 2D gel electrophoresis and electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 268: 1-7.
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lange R. and Hengge-Aronis R.** (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expresión in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5: 49-59.
- Lee E.H. & A. Kornberg** (1991) Replication deficiencies in *priA* mutants of *E. coli* lacking the primosomal replication n'protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3029-3032.
- Lee E.H., Masai H., Allen G.C Jr. and Kornberg A.** (1990) The *priA* gene encoding the primosomal replicative n' protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4620-4624.
- Liu J., Liewei X., Sandler S.J. and Marians K.J.** (1999) Replication fork assembly at recombination intermediates is required for bacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3552-3555.
- Lloyd R.G. & Buckman C.** (1988) Identification and genetic analysis of *sbcC* mutations in commonly used *recBC sbcB* strains of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 164: 836-844.
- Lombardo M-J. & Rosemberg S.M.** (1999) Hypermutation in stationary phase *E.coli*: tales from the lac operon. *J. Genet.* 78(1): 13-20.
- López de Saro F. & O'Donnell M.** (2001) Interaction of the β sliding clamp with MutS, ligase and DNA Polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8376-8380.
- Marians K.J.** (2000) PriA-directed replication fork

-
- restart in *Escherichia coli*. Trends Biochem. Sci. 25: 185-189.
- Masai H. & Arai K.** (1996b) DnaA- and PriA-dependent primosomes: two distinct replication complexes for replication of *Escherichia coli* chromosome. Frontiers in Bioscience 1: d49-59.
- Masai H. & Arai K.** (1996a) Mechanism of primer RNA synthesis and D-loop/R-loop dependent DNA replication in *Escherichia coli*. Biochimie 78: 1109-1117.
- Masai H., Asai T., Kubota Y., Arai K. and Kogoma T.** (1994) *Escherichia coli* PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. EMBO J. 13(22): 5338-5345.
- Masai H., Deneke J., Furui Y., Tanaka T. and K-I. Arai** (1999) *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* PriA proteins essential for recombination-dependent replication: involvement of ATPase/helicase activity of PriA for inducible stable DNA replication. Biochimie 81: 847-857.
- McKenzie G.J., Harris R.S., Lee P.L. and Rosemberg S.M.** (2000) The SOS response regulates adaptive mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6646-6651.
- Michel B., Flores M.J., Viguera E., Grompone G., Seigneur M. and Bidnenko V.** (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(15): 8181-8188.
- Michel B., Recchia G.D., Penel-Colin M., Ehrlich S.D. and Sherratt D.J.** (2000). Resolution of Holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in *rep* mutants and UV-irradiated cells. Mol. Microbiol. 31(1): 180-191.
- Miller J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Modrich P.** (1994) Mismatch repair, genetic stability, and cancer. Science 266 : 1959-1960.
- Moreau P.L., Gerard F., Lutz N.W. & Cozzone P.** (2001) Non-growing *E. coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. Mol. Microbiol. 39(4): 1048-1060.
- Morimyo M.** (1982) Anaerobic incubation enhances colony formation of a *polA recB* strain of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 152: 208-214.
- Mosig G.** (1998) Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. Annu. Rev. Genet. 32 :379-413.
- Mulugu S., Potnis A., Shamsuzzaman, Taylor J., Alexander K. and Bastia D.** (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(17) : 9569-9574.
- Nakai H., Doseeva V. and Jones J.M.** (2001) Hand-off from recombinase to replisome: insights from transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(15): 8247-8254.
- Niki H. & Hiraga S.** (1998) Polar localization of the replication origin and terminus in *E. coli* nucleoids during chromosome partition. Genes Dev. 12:1036-1045.
- Niki H., Ogura T. and S. Hiraga,** (1990). Linear multimer formation of plasmid DNA in *Escherichia coli* *hopE* (*recD*) mutants. Mol. Gen. Genet. 224: 1-9.
-

- Niki H., Yamaich Y. & Hiraga S.** (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *E. coli*. *Genes Dev.* 14: 212-223.
- Nurse P., Zavitz K.H. and Mariani K.J.** (1991) Inactivation of the *Escherichia coli* PriA DNA replication protein induces the SOS response. *J. Bacteriol.* 173(21): 6686-6693.
- Nyström T.** (1999) Starvation, cessation of growth and bacterial aging. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 214-219.
- Nyström T., Larsson C. and Gustafsson L.** (1996) Bacterial defense against aging: role of *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. *EMBO J.* 15(13): 3219-3228.
- Olavarrieta L., Martínez-Robles M.L., Sogo J.M., Stasiak A., Hernández P., Krimer D.B. and Schwartzman J.B.** (2002) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Research* 30(3) : 656-666.
- Pogliano J., Ho T.Q., Zhong Z. and Helinski D.R.** (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(8): 4486-4491.
- Rangarajan S., Woodgate R. and Goodman M.F.** (2002) Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins. *Mol. Microbiol.* 43(3): 617-628.
- Reed RR, Young RA, Steitz JA, Grindley ND, Guyer MS.** (1979) Transposition of the *Escherichia coli* insertion element $\gamma\delta$ generates a five-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76(10):4882-6.
- Roberts R.C., Burioni R. and Helinski D.R.** (1990) Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 172: 6204-6216.
- Robu M.E., Inman R. and Cox M.M.** (2001) RecA protein promotes the regression of stalled replication forks *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8211-8218.
- Roca A.I. & M.M.Cox,** (1997). RecA protein: structure, function and role in recombinational DNA repair. *Progress in Nucleic acid research and molecular biology*: 56: 129-223.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sancar A.** (1994) Mechanisms of DNA Excision Repair. *Science* 266: 1954-1956.
- Sandigurky M & Franklin W.A.** (1992) DNA deoxyribophosphodiesterase of *Escherichia coli* is associated with exonuclease I. *Nucleic Acids Res.* 20(18): 4699-4703.
- Sandigurky M & Franklin W.A.** (1994) *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein stimulates the DNA deoxyribophosphodiesterase activity of Exonuclease I. *Nucleic Acids Res.* 22(2): 247-250.
- Sandler S.J.** (1996) Overlapping functions for *recF* and *priA* in cell viability and UV-inducible SOS expression are distinguished by *dnaC809* in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol* 19(4): 871-880.

- Sandler S.J.** (2000) Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 155: 487-497.
- Sandler S.J. and Marians K.J.** (2000) Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182(1) : 9-13.
- Sandler S.J., Marians K.J., Zavitz K.H., Coutu J., Parent M.A. and Clark A.J.** (1999) *dnaC* mutations suppress defects in DNA replication- and recombination-associated functions in *priB* and *priC* double mutants in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 34(1): 91-101.
- Santamaría D., Viguera E., Martínez-Tobles M.L., Hyrien O., Hernández P., Krimer D.B. and Schvarzman J.B.** (2000) Bidirectional replication and random termination. *Nucleic Acids Res.* 28(19): 2099-2107.
- Sarkis G.J., Murley L.L., Leschziner A.E., Boocock M.R., Stark W.M. and Grindley N.D.F.** (2001) A model for the $\gamma\delta$ resolvase synaptic complex. *Mol. Cell* 8 : 623-631.
- Sawitzke J. & Austin S.** (2001) An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol. Microbiol.* 40: 786-794.
- Schekman, R. , Weiner J.H., Weiner A., Kornberg A.** (1975) Ten proteins required for conversion of Φ X174 single-stranded DNA to duplex form in vitro: resolution and reconstitution. *J. Biol. Chem.* 250: 5859-5865.
- Seigneur M., Bldnenko V., Ehrlich S.D. and Michel B.** (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* 95: 419-430.
- Seigneur M., Ehrlich S.D. & Michel B.** (1999) *recD sbcB sbcCD* mutants are deficient in recombinational repair of UV lesions by RecBC. *J. Bacteriol.* 181(19): 6220-6221.
- Seigneur M., Ehrlich S.D. & Michel B.** (2000) RuvABC-dependent double strand breaks in *dnaBts* mutants require RecA. *Mol. Microbiol.* 38: 565-574.
- Sherratt D.J.** (1989) en. *Mobile DNA*, Berg D.E. & Howe M.N. eds., ASM Press, Washington D.C. p.163-184.
- Sherratt D.J., Lau I.F. and Barre F.X.** (2001) Chromosome segregation. *Curr. Op. Microbiol.* 4: 653-659.
- Silverstein Z. & Cohen A.** (1987) Synthesis of linear multimers of *oriC* and pBR322 derivatives in *Escherichia coli* K12: role of recombination and replication functions. *J. Bacteriol.* 169(7): 3131-3137.
- Stark W.M., Grindley N.D.F., Hatfull G.F. and Boocock M.R.** (1991) Resolvase-catalyzed reactions between *res* sites differing in the central dinucleotide of subsite I. *EMBO J.* 10(11): 3541-3548.
- Steiner W.W. and Kuempel P.L.** (1998a) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27(2): 257-268.
- Steiner W.W. and Kuempel P.L.** (1998b) Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J. Bacteriol.* 180(23): 6269-6275.
- Stortz G. & Hengge-Aronis R.** (2000) *Bacterial stress responses*, ASM press, Washington D.C.

- Chapter 9: The SOS response to DNA damage, p. 131-145.
- Sutton M. and Walker G.C.** (2001) Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(15): 8342-8349.
- Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G. and Walker G.C.** (2000) The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.* 34:479-97.
- Tang M.S., Wang T-CV and Patrick MH.** (1979) DNA turnover in buffer-held *Escherichia coli* and its effect on repair of UV damage. *Photochem. Photobiol.* 79: 511-520.
- Templin A., Kushner S.R. and Clark A.J.** (1972) Genetic analysis of mutations indirectly suppressing *recB* and *recC* mutations. *Genetics* 72: 205-215.
- Touati D., Jacques M., Tardat B., Bouchard L. & Despié S.** (1995) Lethal oxidative DNA damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *E. coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 177(9): 2305-2315.
- Umez K. & Kolodner R.** (1994) Protein interactions in genetic recombination in *E. coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by SSB. *J. Biol. Chem.* 269:30005-30013.
- Umez K.** (1993) Biochemical interactions of the *E. coli* RecF, RecO and RecR proteins with RecA and SSB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3875-3879.
- Villarroya M., Pérez-Roger I., Macián F. and Armengod M.E.** (1998) Stationary phase induction of *dnaE* and *recF*, two genes of *E. coli* involved in DNA replication and repair. *EMBO J.* 17(6): 1829-1837.
- Volkert M.R. and Landini P.** (2001) Transcriptional responses to DNA damage. *Curr. Op. Microbiol.* 4: 178-185.
- Wang R.F. & Kushner S.R.** (1991) Construction of versatile low-copy number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195-199.
- Webb B.L.** (1997) Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single stranded gaps. *Cell* 91: 347-356.
- Wickner, S. & Hurwitz, J.** (1974) Conversion of $\Phi X174$ viral DNA to double-stranded form by purified *E. coli* proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4120-4124.
- Wróbel B. & G. Wegrzyn** (1998) Replication regulation of ColE1-like plasmids in aminoacid-starved *Escherichia coli*. *Plasmid* 39: 48-62.
- Zahradka D., Vlahovic K, Petranovic M. & Petranovic D.** (1999) Chromosome segregation and cell division defects in *recBC sbcBC ruvC* mutants of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 181(19): 6179-6183.
- Zaman M.M. and Boles T.C.** (1994) Chi-dependent formation of linear plasmid DNA in exonuclease-deficient *recBCD*⁺ strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176(16): 5093-5100.
- Zavitz K.H. & Marians K.J.** (1992) ATPase deficient mutants of the *E. coli* DNA replication protein PriA are capable of catalysing the assembly of active primo-

somes. J. Biol. Chem. 267: 6933-6940.

Zechiedrich E.L. and Cozzarelli N.R. (1995) Roles of Topoisomerase IV and DNA Gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. Genes Dev. 9: 2859-2869.

Zechiedrich E.L., Khodursky A.B. and Cozzarelli N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. Genes Dev. 11: 2580-2592.