

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas



* 5 3 0 9 5 3 6 7 0 3 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

INTERACCION ENTRE LA PROTEINA RepB Y EL ORIGEN DE REPLICACION DE pLS1

MIRIAM MOSCOSO NAYA

Madrid, 1996

**INTERACCION ENTRE LA PROTEINA RepB
Y EL ORIGEN DE REPLICACION DE pLS1**

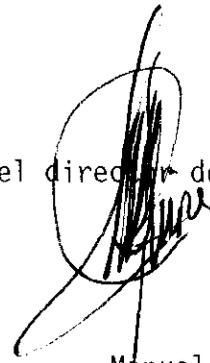
Tesis Doctoral presentada por Miriam Moscoso Naya,
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Febrero, 1996



Miriam Moscoso Naya

Vº Bº, el director de trabajo



Manuel Espinosa

Profesor de Investigación
(CIB, CSIC)

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad de Ciencias Biológicas**

*A mis padres y,
por supuesto, a Manolo.*

Llegado el momento en que el esfuerzo y trabajo de estos últimos años se concretan en este pequeño volumen, no puedo dejar de mencionar a aquellas personas que de una forma u otra me han prestado su ayuda.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a Manuel Espinosa, director de esta Tesis y quien me ha enseñado casi todo lo que sé sobre el "mundillo" de la Ciencia. Agradecer, además, a todo el grupo de Genética Molecular de la Facultad de CC Biológicas, haber aceptado esta Tesis.

A Gloria del Solar y Adela de la Campa, cuyos trabajos han constituido la base sobre la que se asienta esta Tesis. A Gloria, además, por iniciarme en las técnicas de laboratorio y en las "discusiones científicas".

A Paloma López, que haciéndome un hueco en su apretada agenda, me ha brindado siempre buenas ideas y oportunos consejos. A Germán Rivas, por el interés prestado en mi trabajo. A Guillermo Giménez, por su apoyo. Y a Javier Varela y Ramón Eritja, por sintetizar puntualmente todos los oligos (y son muchos) con los que he trabajado.

En segundo lugar, me gustaría recordar a todos mis compañeros. A mis primeros compañeros del Laboratorio: Antonio, Pepe y Asun, por sus buenos consejos. Y a Christophe, por su amistad y hospitalidad.

A Gaby, por haber pensado en mí y recomendarme para trabajar en el Laboratorio. A Paloma, por madrugar tanto y ser siempre tan solícita. A Ana, por sus "comeduras de coco" y por ayudarme, sin rechistar, con el "ir y venir" de las figuras de esta Tesis. A Mónica y Félix, por compartir conmigo el "síndrome del becario". A Joaquín y Leda, por su cariño y comprensión cuando más lo necesitaba. Y a Manuel, por ayudarme a resolver el "papeleo" del Doctorado.

Y por supuesto, a Maite, por su ayuda técnica y buen ánimo, por enseñarme a "pinchar" los gradientes de CsCl. A Maritere, por sus historias y por tener esos nietos tan maravillosos. A Reme y Pedro, por su apoyo y buen humor.

Agradecer también, la atención prestada por el Servicio Técnico del CIB, en especial a Aurelio y Vicky, que se han visto saturados de trabajo por mi culpa.

Me gustaría hacer una mención especial a mi familia, por soportarme todo este tiempo. A Gladys, por resolver mis problemas informáticos. A Jose, por estar a mi lado y hacerme reír, olvidando, muchas veces, los problemas que surgen en este trabajo.

Finalmente, me queda decir que este trabajo ha sido financiado, en su mayor parte, por una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

A todos, Muchas Gracias.

Miriam

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Plásmidos: definición e importancia biológica	2
2. Mecanismos de replicación plasmídica	3
2.1. Replicación tipo theta	3
2.2. Replicación por desplazamiento de hebra	6
2.3. Replicación tipo círculo rodante	7
2.4. Replicación dirigida por proteínas terminales	7
3. Sistemas de control de la replicación plasmídica	8
3.1. Control mediado por RNAs antisense	9
3.2. Control mediado por proteínas represoras	11
3.3. Control mediado por iterones	12
3.4. Control mediado por RNAs antisense y proteínas	12
4. Replicación tipo círculo rodante	15
4.1. Origen de replicación de la cadena líder (<i>dso</i>)	18
4.2. Proteínas de replicación (Rep)	19
4.3. Origen de la replicación de la cadena retrasada (<i>ssO</i>)	21
4.4. Modelo de replicación por círculo rodante	22
5. Familia de pLS1	26
OBJETIVOS	32
Planteamiento de la Tesis	33
MATERIALES	34
1. Estirpes bacterianas	35
2. Plásmidos	35
3. Bacteriófagos	40

4. Proteínas	40
5. Medios de cultivo	40
5.1. Medio de cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	40
5.2. Medios de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	41
5.3. Medio de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	42
6. Reactivos y otros productos	42

MÉTODOS 43

1. Crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas	43
2. Preparación y transformación de células competentes	44
3. Preparaciones de DNA	45
3.1. Preparaciones de DNA total	45
3.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico	45
3.3. Preparación de plásmidos puros	46
4. Manipulaciones enzimáticas del DNA	47
5. Elución y purificación de fragmentos de DNA	47
6. Purificación de oligonucleótidos	48
7. Secuenciación de DNA	49
8. Mutagénesis dirigida	49
9. Electroforesis de DNA	50
9.1. Geles de agarosa	50
9.2. Geles de poliacrilamida nativos	51
9.3. Geles de agarosa alcalinos	51
9.4. Geles mixtos de agarosa-acrilamida	52
9.5. Geles mono- y bidimensionales con cloroquina	52
9.6. Geles de secuenciación	53
10. Determinación del número de copias plasmídico	53
11. Ensayos de estabilidad e incompatibilidad plasmídica	54
11.1. Ensayos de estabilidad	54
11.2. Ensayos de incompatibilidad	55

12. Marcaje radiactivo del DNA	56
12.1. Preparación de sondas radiactivas	56
12.2. Marcaje de fragmentos de DNA en 3'	56
12.3. Marcaje de oligonucleótidos en 5'	57
12.4. Marcaje de oligonucleótido en 3'	57
13. Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa	57
14. Electroforesis de proteínas	58
15. Hiperexpresión de genes bajo el promotor ϕ10 del fago T7 y extracción de proteínas totales	59
16. Precipitación y valoración de proteínas	61
17. Purificación de RepB	62
18. Determinación de la concentración de RepB y cálculo de su coeficiente de extinción	64
19. Ensayos de actividad de RepB	65
19.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado	65
19.2. Ensayos de actividad de RepB sobre oligonucleótidos	66
20. Aislamiento de complejos proteína-DNA covalentes	66
21. Análisis de la quiralidad del fosfato implicado en la unión de la proteína RepB al DNA	68
22. Ensayos de retardo en gel	71
22.1. Curvaturas intrínsecas: ensayos en ausencia de RepB	72
22.2. Curvaturas inducidas: ensayos en presencia de RepB	72
22.3. Complejos RepB-DNA	72
23. Ensayos de unión proteína-DNA en filtro	73
24. Determinación de la masa molecular de RepB mediante equilibrio de sedimentación	73
25. Análisis por ordenador	74
 RESULTADOS	 75
 1. Definición del origen mínimo de replicación de la hebra líder de pLS1 ..	 76
2. El <i>dso</i> es un determinante de incompatibilidad	81

3. RepB es capaz de actuar en <i>trans</i>	84
4. Purificación de la proteína RepB	93
5. Coeficiente de extinción molar y composición de aminoácidos de RepB ..	96
6. Determinación de la masa molecular de RepB mediante equilibrio de sedimentación	97
7. Actividad tipo topoisomerasa I de RepB: condiciones óptimas para su actividad	97
7.1. Condiciones de análisis de productos de reacción	100
7.2. Concentración de sustrato	101
7.3. Concentración de proteína	102
7.4. Temperatura de incubación	102
7.5. Influencia de la concentración de KCl en el tampón de incubación sobre la actividad de RepB	103
7.6. Influencia de cationes en la actividad de RepB	104
7.7. Actividad de RepB en presencia de camptotecina	104
7.8. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG	106
7.9. Actividad de RepB en presencia de nicotinamín-mononucleótido (β -NMN)	108
7.10. Actividad de RepB en presencia de detergentes	109
7.11. Cinéticas de la actividad de RepB	109
7.12. Otros parámetros	110
8. pLSI presenta un incremento en su número de copias en cultivos de <i>B.subtilis</i> crecidos a 45°C	114
9. <i>In vitro</i> , los iterones no son necesarios para la actividad de corte/cierre de RepB sobre DNA superenrollado	116
10. Curvaturas intrínsecas presentes en el <i>dso</i> de pLSI. Influencia de RepB	125
11. Identificación de los productos FII + FI' generados por RepB	129
12. RepB parece reconocer con distinta eficiencia a plásmidos derivados de pMV158	134
13. Actividad de RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios	143

14. Especificidad del sitio de corte de RepB	148
15. RepB no presenta actividad detectable sobre DNA lineal bicatenario ..	151
16. RepB tiene actividad nucleotidil-transferasa. Análisis de la actividad de cierre de RepB sobre oligonucleótidos	156
17. La unión de RepB a DNA no parece estar mediada por intermediarios covalentes estables	160
17.1. Precipitación de complejos proteína-DNA	161
17.2. Captura de complejos proteína-DNA	161
17.3. Retardo de fragmentos de restricción	163
17.4. Retardo de oligonucleótidos	164
17.5. Unión proteína-DNA en filtros	166
18. Análisis de la quiralidad del fosfato que interviene en la unión de la proteína RepB al <i>dso</i> de pLS1	168
19. RepB reconoce los <i>dso</i> de plásmidos relacionados	178
20. Dominios de la proteína RepB. Hiperexpresión de proteínas delecionadas en sus extremos N- y C-terminal	185
20.1. Deleción del gen <i>repB</i> en la región 5'	185
20.2. Deleción del gen <i>repB</i> en la región 3'	189
20.3. Hiperexpresión de las proteínas RepB delecionadas en sus extremos N- y C-terminal	190
21. Definición del sitio activo de RepB. Mutagénesis dirigida al residuo Tyr99	192
21.1. Mutagénesis dirigida al codón Tyr99 de RepB	193
21.2. Hiperexpresión de RepBY99F y RepBY99S	195
21.3. Purificación de las proteínas RepBY99F y RepBY99S	195
22. Actividad de las proteínas RepB mutantes	197
23. Unión de las proteínas RepB silvestre y mutantes a la región <i>bind</i> del <i>dso</i>	200
24. Las mutaciones Y99F e Y99S en RepB no son rescatables en pLS1 ...	204

DISCUSIÓN	206
1. Origen de replicación del plásmido pLS1	207
2. <i>RepB</i> , proteína iniciadora de la replicación de pLS1	216
3. Iniciación y terminación de la replicación mediante círculo rodante	225
4. Familia de pLS1	233
CONCLUSIONES	242
BIBLIOGRAFÍA	247

ABREVIATURAS

A	absorbancia
aa	aminoácidos
Ap	ampicilina
Ap^r	resistentes o resistencia a ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
βME	β -mercaptoetanol
βNMN	β -nicotinamin mononucleótido
BFB	azul de bromofenol
BSA	seroalbúmina bovina
CBB	azul brillante de Coomassie
Ci	curios
CCC	circular covalentemente cerrado
Cm	cloramfenicol
CMC	concentración micelar crítica
Cm^r	resistentes o resistencia a cloramfenicol
coord.	coordenada(s)
cpm	cuentas por minuto
c.s.p.	cantidad suficiente para
ctRNA	RNA contratranscrito
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DO	densidad óptica
dsDNA	DNA de doble cadena
dso	origen de cadena doble
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreititol
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EG	etilenglicol
Em^r	resistentes o resistencia a eritromicina
EtBr	bromuro de etidio
F	faradio(s)
Fig.	figura(s)
g	fuerza centrífuga relativa (RCF)
h	hora(s)
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperacin-N'-2-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HTH	motivo de unión a DNA α hélice-vuelta- α hélice
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

l	litro(s)
LZ	motivo de dimerización cremallera de leucinas
M	molar
min	minuto(s)
MOPS	ácido morfolinopropanosulfónico
MPa	megapascal(es)
mRNA	RNA mensajero
N	número de copias plasmídico
Na-DOC	desoxicolato sódico
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
OC	circular abierto
ori	origen de replicación
PAA	poliacrilamida
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PDE	fosfodiesterasa de veneno de serpiente
Pol IK	fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>
PSA	persulfato amónico
RC	replicación tipo círculo rodante
Rep	proteína iniciadora de la replicación
Rif	rifampicina
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de PAA en presencia de SDS
Sm	estreptomina
SSB	proteína de unión a ssDNA de <i>E.coli</i>
ssDNA	DNA de cadena sencilla
sso	origen de cadena sencilla
t.a.	temperatura ambiente
Tc	tetraciclina
Tc'	resistentes o resistencia a tetraciclina
TCA	ácido tricloroacético
TEAA	trietilamino acetato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina
T4 PNK	T4 polinucleótido kinasa
Tris	trihidroximetil-amino-metano
tRNA	RNA de transferencia
u	unidades
u.f.c.	unidades formadoras de colonia
UV	luz ultravioleta
V	voltios

INTRODUCCION

1. PLÁSMIDOS: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA BIOLÓGICA

La información genética de las bacterias está localizada, esencialmente, en una molécula bicatenaria de DNA, el cromosoma. En muchos casos, esta información se encuentra acompañada por otras moléculas de DNA capaces de replicar de forma autónoma, los plásmidos. Estos elementos genéticos extracromosómicos se han aislado fundamentalmente en organismos procarióticos y en algunos eucariotas inferiores. La mayoría de los replicones plasmídicos caracterizados hasta la fecha son moléculas circulares de DNA bicatenario, aunque se han descrito plásmidos lineales (Hinnebush y Tilly, 1993). Los plásmidos replican como entidades independientes dentro de la célula aunque, para ello, usan factores del huésped. Una característica de los plásmidos es su *replicación controlada*, de forma que su número de copias debe duplicarse en el momento de la división celular (revisado por Nordström y Austin, 1989). Por ello, todos los plásmidos poseen sistemas para controlar su replicación. Muchos replicones naturales poseen, además, sistemas de partición que aseguran la correcta distribución de sus copias entre las células hijas en el momento de la división celular (Kittell y Helinski, 1992). En algunos casos, existen sistemas que aseguran la muerte de las células que pierden el replicón (sistemas "asesinos"), consiguiendo así el mantenimiento estable de los plásmidos en la totalidad de la población celular. Además de los sistemas de replicación y control, muchos plásmidos poseen genes implicados en diferentes procesos como son resistencias a antibióticos, fijación de nitrógeno, virulencia, catabolismo de sustancias fenólicas, resistencias a metales pesados, etc. Los plásmidos pueden ser vehículos para el clonaje y expresión de genes que codifiquen productos de interés industrial o biotecnológico.

Los plásmidos poseen capacidad para integrarse, mediante recombinación homóloga o ilegítima, en otros replicones e incluso en el cromosoma del huésped. Pueden ser receptores y donadores de transposones y secuencias de inserción. Muchos plásmidos se pueden transferir por sí mismos de un huésped a otro mediante conjugación, contribuyendo con ello a la diseminación horizontal de genes entre microorganismos. Además, juegan un papel clave en la transferencia de información a plantas superiores. Su importancia ecológica y evolutiva es indiscutible. Por último,

el conocimiento de los plásmidos ha contribuido al desarrollo de la Biología Molecular y la Biotecnología. Gracias a que los plásmidos son elementos dispensables a la célula huésped y que, aparentemente, poseen una organización genética simple, son los candidatos ideales para el estudio a nivel molecular de interacciones entre moléculas de DNA y/o RNA, interacciones proteína-DNA, topología del DNA, expresión de genes, y para la ampliación de conocimientos en los procesos de conjugación, recombinación, control y replicación del DNA.

2. MECANISMOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Los plásmidos poseen como mínimo un origen de replicación, que se puede definir como la región mínima donde se produce la iniciación de la replicación de la cadena líder, y un sistema *cop*, para el control de la frecuencia de iniciación de la replicación. El mantenimiento de un número de copias constante dentro de un determinado huésped es una característica común para todos los plásmidos. Esto implica que si dos plásmidos comparten elementos comunes involucrados en su replicación estable y/o en su mantenimiento, serán incapaces de coexistir en ausencia de presión selectiva. Como consecuencia, ambos replicones se segregarán dentro de la población bacteriana, es decir serán incompatibles.

Los mecanismos de replicación conocidos basan sus diferencias en la iniciación de la replicación y en las distintas estructuras que adoptan los intermediarios de replicación. Existen cuatro mecanismos generales de replicación plasmídica: replicación tipo theta, por desplazamiento de hebra, tipo círculo rodante y replicación dirigida por proteínas terminales (Kornberg y Baker, 1992).

2.1. Replicación tipo theta

La replicación tipo theta fue el primer mecanismo de replicación plasmídica conocido. Es característica de la mayoría de los plásmidos circulares de bacterias gram(-), aunque también ha sido descrito en el grupo de incompatibilidad Inc18 de plásmidos de bacterias gram(+) (Bruand *et al*, 1991). Este tipo de replicación implica la síntesis de un RNA cebador usando como molde una de las hebras parentales, una

vez que han sido separadas. El RNA cebador o "primer" será el que proporcione el grupo 3'-OH libre necesario para la síntesis del DNA, efectuada por las DNA polimerasas. Esta síntesis es continua en una de las hebras y discontinua en la otra (cadenas líder y retrasada, respectivamente), y parece que ocurre de una forma acoplada entre ellas (Selik *et al*, 1987). Los intermediarios de este tipo de replicación, sea uni- o bidireccional, muestran formas tipo *theta* (θ) en imágenes de microscopía electrónica, debido a la separación de las hebras parentales y al avance de la horquilla de replicación. Los plásmidos que siguen este mecanismo de replicación se pueden dividir en dos grupos, según dependan o no de la DNA polimerasa I para la iniciación de la síntesis del DNA (del Solar *et al*, 1995b).

a) Replicones dependientes de la DNA polimerasa I. Este grupo no codifica una proteína iniciadora de la replicación y depende de la RNA polimerasa del huésped para la síntesis del RNA cebador de la cadena líder o de un precursor de éste. Además, requiere la DNA polimerasa I al comienzo de la síntesis del DNA (Staudenbauer, 1978; Kornberg y Baker, 1992). El mecanismo mejor conocido es el del replicón Cole1: la replicación se inicia a partir de la separación de las hebras de DNA y de la síntesis de un RNA precursor del "primer" ("pre-primer") por la RNA polimerasa del huésped, que será procesado por la RNasa H para dar lugar al RNA "primer" (Itoh y Tomizawa, 1980). Este "primer" proporciona el grupo 3'-OH específico, usado por la DNA polimerasa I para la síntesis del DNA inicial. Posteriormente, la DNA polimerasa III continúa la elongación de la cadena. La síntesis discontinua de la cadena retrasada se inicia al quedar expuesto el sitio para el ensamblado del primosoma (*pas*), que permite la entrada de la helicasa DnaB y la acción de la primasa DnaG, y finaliza por la presencia de una señal de terminación, *terH* (Minden y Mariani, 1987), localizada cerca del sitio *pas*.

b) Replicones independientes de la DNA polimerasa I. Los plásmidos pertenecientes a este grupo codifican una proteína iniciadora de la replicación (proteína Rep), que se une a secuencias directamente repetidas del DNA (iterones). El origen de replicación (*ori*) se caracteriza por poseer, además, una región rica en secuencias A+T que contiene dos o más sitios para la interacción de DnaB/DnaC y uno o más sitios específicos para la unión de la proteína DnaA. La iniciación requiere el ensamblaje

del primosoma en el origen de replicación: las proteínas Rep y DnaA, unidas a sitios específicos del DNA, facilitan la apertura de la doble hélice en la región rica en A+T y la entrada del complejo DnaB/DnaC en el origen. La reacción de síntesis se lleva a cabo mediante la acción de la DNA polimerasa III y otras proteínas del huésped. La terminación se produce debido al reconocimiento de secuencias específicas por determinados factores que detienen la horquilla de replicación (Kuempel *et al*, 1989).

Uno de los primeros casos conocidos y más estudiado es el del plásmido R1 del grupo de incompatibilidad IncFII: la proteína RepA codificada por el plásmido se une al núcleo central de dos secuencias parcialmente palindrómicas (Giraldo y Díaz, 1992). Mediante interacciones cooperativas proteína-proteína, se adicionarían nuevas moléculas de RepA que van a facilitar la apertura de las hebras en la región A+T y a dirigir la unión de DnaA a la caja *dnaA* del origen de replicación (Masai y Arai, 1987). Se ha mostrado que, tanto *in vivo* como *in vitro*, las interacciones de RepA en el *ori* promueven la entrada de la primasa DnaG, quien sintetiza un RNA cebador para la iniciación de la síntesis de la cadena líder, en un sitio localizado 400 pb "corriente abajo" del sitio de unión de RepA (Masai y Arai, 1989).

En los plásmidos P1 y R6K, la unión de las proteínas iniciadoras (RepA y π , respectivamente) a los iterones del origen, genera un complejo nucleo-proteico que va a favorecer la apertura de hebras del origen por DnaA (Mukherjee *et al*, 1985; Mukhopadhyay *et al*, 1993). En otros plásmidos como pSC101, la unión del factor de integración del huésped (proteína IHF) a sitios localizados en la región A+T, promueve curvaturas en el DNA que facilitan interacciones entre moléculas de DnaA unidas a sitios separados por 200 pb (Stenzel *et al*, 1991). En el caso de R6K, la unión de IHF parece alterar la estructura de la zona adyacente a los iterones, reduciendo así la actividad inhibitoria de la proteína π (Kelley *et al*, 1992). Un caso particular lo constituye la proteína multifuncional Gp α del fago P4, que posee, en diferentes dominios de la proteína, las actividades helicasa 3'→ 5', primasa y de unión a DNA (Ziegelin *et al*, 1993). De esta manera, la iniciación de la replicación de P4 es independiente de factores del huésped (Linqvist *et al*, 1993).

Varias de las proteínas Rep de este tipo de plásmidos presentan el motivo de

cremallera de leucinas (LZ), que ha sido descrito como motivo de dimerización de varios factores de transcripción eucarióticos (Landschultz *et al*, 1988). Este motivo está presente en las proteínas Rep de pPS10, pSC101, P1, F y R6K. Se ha observado que mutaciones producidas en el motivo LZ pueden conducir a diversos efectos: i) afectar a la activación de los orígenes de replicación, como en el caso de R6K (Miron *et al*, 1992); ii) incrementar el número de copias plasmídico, como ocurre en pSC101 (Ingmer y Cohen, 1993); iii) disminuir la eficiencia de unión de la proteína a su operador y iv) afectar al número de copias e incluso al rango de huésped, como sucede en pPS10 (García de Viedma, 1994; Fernández-Tresguerres *et al*, 1995). Además del motivo LZ, en las proteínas Rep no se han encontrado motivos típicos de unión a DNA, con la excepción del motivo α hélice-vuelta- α hélice (HTH) descrito para la proteína RepA de pPS10 (García de Viedma, 1994). Para las proteínas TrfA de RK2 y π de R6K, se ha observado que mutaciones en su región C-terminal afectan a la capacidad de unión a DNA (Cereghino *et al*, 1994; Greener *et al*, 1990). La mayoría de las proteínas Rep de los plásmidos que contienen iterones reprimen transcripcionalmente su propia síntesis. Tras la unión a los iterones tendrían lugar interacciones proteína-proteína que serían capaces de regular negativamente la frecuencia de iniciación de la replicación (Nordström, 1990; Kittell y Helinski, 1992).

2.2. Replicación por desplazamiento de hebra

En este tipo de replicación, que ha sido caracterizado para el plásmido RSF1010 del grupo IncQ (Scherzinger *et al*, 1991), la iniciación se produce a partir de dos secuencias palindrómicas que contienen dos sitios de iniciación de monohebra (*ssi*): *oriR* y *oriL*, localizados en cadenas opuestas dentro del *oriV*.

La replicación de RSF1010 es dependiente de tres proteínas codificadas por el plásmido: una proteína que reconoce el origen (RepC), una helicasa 5' \rightarrow 3' (RepA), y una primasa (RepB; Haring y Scherzinger, 1989). La proteína RepC se une a los 5 iterones del origen y promueve la entrada de la helicasa RepA para la separación de las hebras, con lo cual quedan expuestos los sitios *ssi* del *oriR* y *oriL*. A continuación, se produce la entrada de la primasa RepB para iniciar la replicación (Miao *et al*, 1993). La replicación se realiza a partir del *oriR* u *oriL*, o de ambos orígenes a la vez, de una manera continua y desplazando la hebra que no es replicada,

formando con ello un lazo en forma de "D". Si la iniciación se produce en un solo origen, los productos finales son una molécula de dsDNA circular superenrollada y un círculo de ssDNA desplazado; si se produce en ambos orígenes, los productos son moléculas de dsDNA circular superenrollado.

2.3. Replicación tipo círculo rodante

El modelo actual para este tipo de replicación plasmídica se basa en el modelo descrito para bacteriófagos de cadena sencilla (Baas y Jansz, 1988). Es característico de muchos plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias de bacterias gram(+). De hecho, en un principio se pensaba que era exclusivo de este tipo de plásmidos, aunque ya se han descrito varios ejemplos de replicación por círculo rodante (RC) en plásmidos aislados de bacterias gram(-) (Gielow *et al*, 1991; Gigliani *et al*, 1993; Kleanthous *et al*, 1991; Yasukawa *et al*, 1991).

La replicación se realiza de un modo unidireccional y asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y retrasada están desacopladas. La iniciación de la replicación la lleva a cabo una proteína codificada por el plásmido, denominada genéricamente Rep, que introduce una rotura específica en la hebra(+), dentro del origen de cadena doble (*dso*). El ataque mediado por Rep, genera un grupo 3'-OH libre que será usado como "primer" por la DNA polimerasa III, para la síntesis de la cadena líder. La cadena(+) parental va siendo desplazada a medida que se sintetiza la cadena(+) nueva hasta alcanzar la región *dso* inicial. A continuación, se produce una rotura y posterior unión de la cadena parental desplazada, que hasta este momento habría estado covalentemente unida a la cadena de nueva síntesis. La terminación de la síntesis de la cadena líder genera una molécula dsDNA completa y un intermediario de ssDNA (te Riele *et al*, 1986). La conversión del ssDNA circular de la cadena parental a dsDNA se realiza a partir del reconocimiento del origen de cadena sencilla (*sso*) por factores del huésped (Novick, 1989). El mecanismo de replicación RC se discutirá con más detalle más adelante, ya que es el mecanismo seguido por el plásmido pLS1, objeto de nuestro trabajo.

2.4. Replicación dirigida por proteínas terminales

Este tipo de replicación es característico de plásmidos lineales que tienen una

proteína unida covalentemente a sus extremos 5'. El mecanismo parece ser similar al descrito para el fago $\phi 29$ de *Bacillus subtilis* (Salas, 1991): la replicación se inicia por la interacción de una proteína terminal libre con la proteína terminal unida a los extremos 5' del DNA, siendo aquélla la que proporciona el grupo 3'-OH que será usado por la DNA polimerasa del fago para incorporar el primer nucleótido. Se ha propuesto un nuevo mecanismo en el cual, el primer nucleótido incorporado correspondería al segundo del DNA molde (Méndez *et al*, 1992). El complejo de iniciación (formado por la proteína terminal, la DNA polimerasa y el DNA) se deslizaría hacia atrás sobre la hebra de DNA localizando correctamente el nucleótido en la posición 1 del molde. Por desplazamiento de hebra, se irían incorporando los siguientes nucleótidos en la elongación.

Algunos plásmidos lineales con proteínas terminales unidas a sus extremos 5' (como el plásmido pSLA2 de *Streptomyces rochei*; Chang y Cohen, 1994) parecen constituir una excepción al anterior modelo: su replicación se produce bidireccionalmente a partir de un origen de replicación interno. En el caso de pSLA2, los intermediarios de replicación son moléculas dúplex lineales con extremos 5' recesivos; los extremos 3' protuberantes podrían servir como moldes para la síntesis de la cadena retrasada, cuyo "primer" se lo proporcionaría la proteína terminal unida covalentemente al extremo 5' del DNA (Chang y Cohen, 1994).

3. SISTEMAS DE CONTROL DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA

Durante el crecimiento exponencial de una población bacteriana dada, los plásmidos presentan un número de copias definido (N). El valor de N es característico para cada huésped y bajo unas condiciones de crecimiento determinadas (Novick, 1987; Nordström, 1990). Los plásmidos poseen la capacidad de regular la frecuencia de iniciación de la replicación, mediada por sistemas de control negativo capaces de "sentir" y corregir fluctuaciones en el número de copias (Novick, 1987). Muchos plásmidos poseen además, mecanismos de partición que van asegurar que cada célula hija reciba como mínimo una copia de las moléculas plasmídicas después de la división celular. En una situación de equilibrio, el número de replications por copia

plasmídica es exactamente uno por generación celular. Si, por alguna razón, el número de copias es mayor que el valor del equilibrio, la frecuencia de replicación se ajustará a un valor menor que uno por copia plasmídica y generación celular. Por el contrario, si el número de copias se reduce, la frecuencia de replicación será mayor. El modelo de regulación del valor de N está basado en la inhibición (Pritchard *et al*, 1969) y se puede ajustar a dos tipos de funciones: i) una función hiperbólica, si la tasa de replicación es inversamente proporcional a la concentración de inhibidor; ii) una función constante, si pequeños cambios en la concentración del inhibidor causan una respuesta de todo o nada sobre la replicación (Nordström *et al*, 1984). El paso limitante de la regulación es la iniciación de la replicación. Los plásmidos ejercen su control negativo usando diferentes sistemas: RNAs antisense, proteínas represoras y repeticiones directas del DNA (iterones) que son sitio de unión para proteínas Rep. En los dos primeros casos, la regulación se realiza controlando la síntesis de proteínas Rep, limitantes de tasa, o la transición de un RNA precursor a "primer" de la iniciación de la replicación.

3.1. Control mediado por RNAs antisense

Por lo general, se trata de pequeños RNAs, de vida media corta, sintetizados a partir de un promotor constitutivo en dirección opuesta al RNA precursor del "primer" o al mRNA para la síntesis de la proteína Rep, recibiendo entonces, el nombre de RNAs contratranscritos (ctRNAs; Novick, 1987). Por medio de la formación de un RNA dúplex, pueden regular el procesamiento del RNA precursor (Itoh y Tomizawa, 1980) o la expresión de la proteína Rep limitante de tasa (Womble y Rownd, 1986). En este caso, también pueden realizar un bloqueo directo del sitio de unión de los ribosomas (Kim y Meyer, 1986; del Solar y Espinosa, 1992). Los casos mejor conocidos son los de los plásmidos ColE1 y pT181.

La iniciación de la replicación en ColE1 requiere la síntesis de un RNA "pre-primer" de 550 nt, el RNA II, por la RNA polimerasa y su posterior procesamiento por la RNasa H, cuando el duplex DNA-RNA II adopta una conformación adecuada. La regulación de la iniciación la lleva a cabo el RNA I, RNA antisense de 108 nt, complementario al extremo 5' del RNA II. La hibridación entre los dos RNAs altera la estructura secundaria del RNA II, con lo cual éste no hibrida con el DNA y no es

procesado por la RNasa H. La interacción inicial entre el RNA I y el RNA II se realiza en los lazos monocatenarios de las estructuras secundarias ("kissing complex"). Los complejos iniciales son inestables y reversibles. La interacción de la proteína Rom (o Rop), codificada por el plásmido, incrementa unas 100 veces la estabilidad del complejo (revisado por Eguchi *et al*, 1991).

En el caso de pT181, plásmido que replica por el mecanismo RC, la expresión de la proteína iniciadora RepC está controlada por dos pequeños ctRNAs que poseen el mismo extremo 5' y distinto extremo 3' (Novick *et al*, 1984). Estos RNAs son complementarios a la región líder del mRNA de *repC* (Kumar y Novick, 1985). La interacción entre ctRNAs y el mRNA *rep* se realiza a través de los lazos de las estructuras secundarias que pueden formar ambos RNAs. Esta interacción podría inducir la formación de una estructura semejante a la de un terminador transcripcional en un lugar del mRNA *rep* situado a 5' del inicio de la traducción de RepC (Novick *et al*, 1989). La generación de esta estructura conduciría a una terminación prematura de la síntesis del mRNA. Así, un mecanismo indirecto de terminación/atenuación regularía la expresión de la proteína de iniciación. La base de este modelo está en las distintas estructuras que podrían formar los elementos de secuencia I, II, III y IV del mRNA de *repC* (Fig. 1). Las secuencias I y II podrían aparearse entre sí, formando la estructura tallo-lazo implicada en la interacción con el ctRNA. Las secuencias III y IV son complementarias entre sí. A su vez, la secuencia I comparte 9 bases con la secuencia IV (que contiene la señal de iniciación de la traducción de *repC*) y por lo tanto, puede aparearse con el elemento III. En presencia de los ctRNAs, los elementos I y II formarían una estructura tallo-lazo que interaccionaría, a través del lazo, con la estructura secundaria del ctRNA. Los elementos III y IV se mantendrían apareados, formando una estructura tallo-lazo seguida en 3' por una secuencia AU₆, que funcionaría como un terminador transcripcional, causando la terminación prematura (atenuación) del mRNA *rep*. En ausencia de los ctRNAs, la interacción entre I y II se rompería al ir progresando la transcripción del mRNA *repC*, y se formaría una estructura más estable con la interacción de los elementos I y III, con lo cual el sitio de unión a los ribosomas (situado en el elemento IV) quedaría accesible para que se produzca la iniciación de la traducción de *repC*.

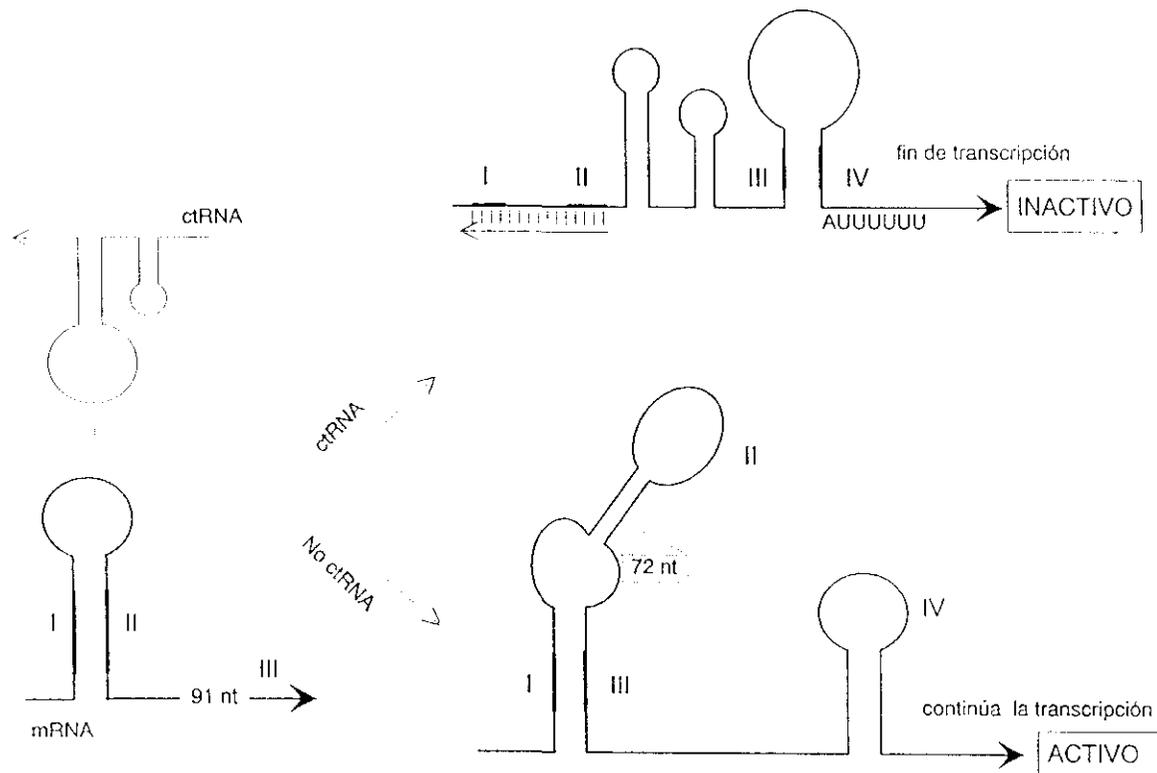


Figura 1. Control de la replicación de pT181 mediado por RNAs contratranscritos. Se muestra el mRNA *repC* (línea de trazo grueso) con los elementos I, II, III y IV (línea extragruesa) y el ctRNA (línea de trazo fino). En presencia del ctRNA, los elementos I y II formarían una estructura tallo-lazo que interaccionaría con la estructura secundaria del ctRNA. Los elementos III y IV se mantendrían apareados formando una estructura tallo-lazo seguida por la secuencia AU₆, la cual funcionaría como un terminador transcripcional del mRNA *repC*. En ausencia del ctRNA, los elementos I y III podrían interaccionar formando una estructura más estable, que evitaría la formación del terminador transcripcional.

3.2. Control mediado por proteínas represoras

Este mecanismo de control es poco frecuente, dado que la regulación ideal debe ser realizada por elementos de vida media corta (RNAs) que pueden responder ágilmente a fluctuaciones en el número de copias plasmídicas. El caso mejor conocido es el de λdv , cuya replicación está limitada bien por la utilización de la proteína O o bien por la activación transcripcional del origen de replicación (situado dentro del gen O). La proteína Cro (o Tof), producto del primer gen del operón O (que contiene los genes *cro/tof*, O y P) es el represor transcripcional de este operón, con lo cual se autorregula y puede modular la frecuencia de iniciación (Lee y Bailey, 1984a, 1984b).

3.3. Control mediado por iterones

Los plásmidos que contienen iterones regulan su replicación a través de la unión de las proteínas Rep a varias repeticiones directas, situadas en el origen de replicación y a veces, en otro lugar del replicón básico, fuera del origen. Muchas de las proteínas Rep de estos plásmidos se autorregulan o están bajo control transcripcional (Kittell y Helinski, 1992). Se han propuesto tres modelos para el control del número de copias de los plásmidos con iterones:

a) Los iterones titulan la proteína Rep, limitante de tasa, reduciendo su disponibilidad para el origen (Tsutsui *et al*, 1983). Este modelo no soluciona dos problemas: i) la mayoría de estas proteínas Rep son autorregulables, y una titulación implicaría una derrepresión; ii) un rápido incremento de la proteína RepA de P1 no conduce a un incremento del número de copias (Pal y Chatteraj, 1988).

b) Existen dos formas de la proteína Rep: una estaría implicada en autorregulación y la otra sería activa en iniciación (Trawick y Kline, 1985). Alternativamente, los iterones del origen tienen distinta afinidad por la proteína Rep que los iterones situados al inicio de la transcripción del gen *rep* (Chatteraj *et al*, 1985). Hasta el momento no hay una evidencia directa de la existencia de dos formas de la proteína Rep físicamente distintas o funcionalmente distinguibles (Kittell y Helinski, 1992).

c) Las proteínas Rep unidas a los iterones pueden interactuar entre sí causando un impedimento estérico que bloquearía la iniciación de la replicación. Este fenómeno podría ocurrir *in cis* entre los iterones del *ori* y de la región de control, curvando el DNA ("looping"; Pal y Chatteraj, 1988) o puede ocurrir entre los iterones de varios orígenes *in trans* ("handcuffing"; McEachern *et al*, 1989; Kittell y Helinski, 1992).

3.4. Control mediado por RNAs antisense y proteínas

En algunos casos, la regulación de la replicación se realiza por la acción combinada de un represor transcripcional y un RNA antisense (del Solar *et al*, 1995b). Se ha estudiado con cierto detalle en los plásmidos R1 y pLS1.

El control de la replicación de R1 se realiza a nivel de la expresión de la proteína

RepA. La transcripción del gen *repA* está controlada por dos promotores: uno distal que es constitutivo y otro proximal que, en condiciones normales, está totalmente reprimido por la proteína CopB, cuyo gen está localizado entre ambos promotores. El control post-transcripcional está mediado por CopA, ctRNA complementario a la región líder del mRNA de *repA* o CopT. La interacción entre ambos RNAs impide la síntesis de un péptido líder, Tap, al cual está acoplada la traducción de RepA. La proteína CopB podría tener un papel accesorio en el control de la replicación, actuando en situaciones en las que el valor de N disminuya mucho respecto al normal o en el establecimiento inicial del plásmido (revisado por Nordström y Wagner, 1994; Wagner y Simons, 1994).

El plásmido pLS1 codifica dos elementos que actúan en *trans* y que regulan su número de copias: la proteína CopG y el RNA II (del Solar y Espinosa, 1992). A nivel transcripcional, la unión de la proteína CopG a su operador, situado en el promotor P_{cr} , reprime la síntesis del mRNA a partir del cual se transcriben los genes *copG* y *repB*. A nivel traduccional, el control de la replicación se realiza por inhibición directa tras el apareamiento del RNA II (ctRNA complementario a la región 5' del mRNA *cop-rep*) con el sitio de unión a los ribosomas de *repB* (Fig. 2). El modelo de control de replicación de pLS1 (del Solar y Espinosa, 1992) propone que cuando el plásmido coloniza un nuevo huésped, o cuando N está por debajo de un cierto valor ($N < 22$), el promotor P_{cr} no sería reprimido por CopG, con lo cual aumentaría la tasa de síntesis del mRNA *cop-rep* y se produciría un rápido incremento de N. Si el valor de N fuese mayor que el correspondiente al del estado de equilibrio ($N = 22$), se produciría una acción combinada entre la represión de CopG y el aumento en la dosis del RNA II ya que al ser sintetizado constitutivamente, su concentración sería proporcional a N. La proteína CopG mantendría los niveles de mRNA *cop-rep* dentro de ciertos límites y el RNA II corregiría las fluctuaciones en el valor de N. Evidencias recientes de nuestro laboratorio indican que el control de la replicación de pLS1 es realizado por el circuito de regulación entero: el represor transcripcional, CopG y el ctRNA, RNA II (del Solar *et al*, 1995a).

Aunque el control primario de la replicación plasmídica se realiza a nivel de la iniciación de la síntesis de la cadena líder, podrían existir otros modos de acción a

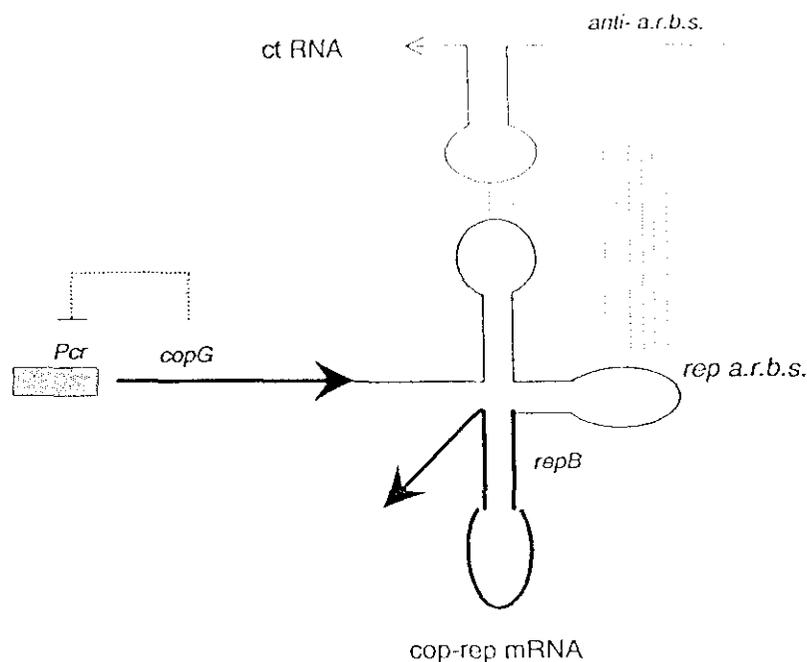


Figura 2. Control de la replicación de pLS1 mediado por un ctRNA y una proteína represora. A nivel transcripcional, la unión de la proteína CopG a su diana, situada en el promotor P_{cr} , reprime la síntesis del mRNA de los genes $copG$ y $repB$ (línea extra-groesa). A nivel traduccional, el control de la replicación se realizaría por inhibición directa tras el apareamiento del ctRNA (línea fina) con el sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.) de $repB$.

nivel de la elongación o en la iniciación de la síntesis de la cadena retrasada en los plásmidos con replicación RC. Se ha observado que la tasa de elongación se ve afectada por cambios en la secuencia de DNA: la inserción de secuencias de terminación de 22 pb en plásmidos pUC ha tenido efectos sobre el valor de N (Hidaka *et al*, 1988). Del mismo modo, la eficiencia de iniciación en la conversión de ssDNA a dsDNA puede afectar a N (Gruss *et al*, 1987; del Solar *et al*, 1987b).

Existen otros factores secundarios que pueden modular la replicación, aunque no son elementos capaces de corregir fluctuaciones en el valor de N, por lo que no se consideran como verdaderos elementos reguladores. Algunos de éstos son:

a) Secuencias plasmídicas que actúan en *cis*, como son el locus cmp de pT181, que parece influir en la eficiencia de utilización de la proteína Rep (Gennaro y Novick,

1986), y los sitios GATC del origen de replicación de P1, que deben estar metilados para que se produzca la replicación (Abeles y Austin, 1987).

b) Factores codificados por el cromosoma del huésped: el locus *pcnB* de *Escherichia coli* reduce el valor de N de pBR322 (Lopilato *et al.*, 1986). Por el contrario, mutaciones en el locus *recD* de *E.coli* incrementan el valor de N de ciertos plásmidos (Seelke *et al.*, 1987).

c) Proteínas del huésped como son IHF (Stenzel *et al.*, 1987) y DnaA de *E.coli* que está implicada en la iniciación de la replicación de muchos plásmidos.

d) Cambios en el superenrollamiento del DNA plasmídico, los cuales afectan la eficiencia de iniciación de la replicación (Minden y Marians, 1985). Asimismo, el aumento de la transcripción a través del origen en dirección opuesta a la de la replicación pueden reducir la eficiencia de ésta (Steuber y Bujard, 1982).

4. REPLICACIÓN TIPO CÍRCULO RODANTE

Este tipo de replicación fue descrito por primera vez para bacteriófagos de cadena sencilla (ϕ X174, M13, fd) por Gilbert y Dressler (1968). La proteína iniciadora de la replicación está codificada por el fago: proteína del gen A, GpA, en los fagos isométricos (ϕ X174, G4) y la proteína del gen II, gpII, para los fagos filamentosos (M13, f1, fd). La proteína iniciadora corta la hebra viral (VS) de la forma replicativa (RF) del DNA en un lugar específico, el origen de síntesis de la hebra viral. El corte del DNA, mediado por la proteína, genera un grupo 3'-OH libre que será extendido por la DNA polimerasa III. En el desenrollamiento del DNA de los fagos isométricos participan la proteína *rep*-helicasa de *E.coli* y la proteína GpA. Esta proteína queda unida covalentemente al extremo 5'-fosfato del sitio de corte, y separa la hebra viral parental como un círculo rodante que gira alrededor de la hebra complementaria mientras avanza la replicación. Al finalizar el ciclo de replicación, la proteína GpA corta el origen regenerado y se ligan los extremos 3' y 5' de la hebra viral parental, formando un círculo monocatenario que estará cubierto por SSB (proteína de unión

a ssDNA de *E.coli*). Este intermediario será posteriormente convertido en una molécula bicatenaria covalentemente cerrada: la forma replicativa RF. La proteína GpA se transfiere a la hebra viral nueva e inicia nuevas rondas de replicación.

En el caso de los fagos filamentosos se sigue un mecanismo similar, con la salvedad de que la proteína gpII no se une covalentemente al 5'-fosfato en el sitio de corte sino que forma un complejo más lábil con la hebra complementaria (Meyer y Geider, 1982). Para la conversión de la VS monocatenaria en RF bicatenaria, la RNA polimerasa en los fagos filamentosos o el primosoma en los fagos isométricos, sintetizan un RNA "primer" que será elongado por la DNA polimerasa III usando como molde la VS hasta alcanzar el extremo 5' del "primer". A continuación, se elimina el RNA "primer" gracias a la actividad exonucleasa 5'→ 3' de la DNA polimerasa I y se polimeriza el DNA restante hasta completar una molécula bicatenaria RF (Rasched y Oberer, 1986; Baas y Jansz, 1988).

La replicación tipo RC se describió posteriormente en un grupo de plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias aislados de bacterias gram(+), si bien se han descrito plásmidos de bacterias gram(-) con este mecanismo de replicación (Gielow *et al*, 1991; Gigliani *et al*, 1993; Kleanthous *et al*, 1991; Yasukawa *et al*, 1991). Se ha puesto de manifiesto que el mecanismo de replicación RC y la producción de ssDNA como intermediarios de replicación estimulan en gran medida la capacidad de recombinación intra- e interplasmídica, facilitando también su diseminación entre bacterias (Gruss y Ehrlich, 1989). Este supuesto, junto con la observación de la estructura genética de varios plásmidos de estafilococos, llevaron a la hipótesis de que los plásmidos con replicación RC estarían contruidos como cassettes de genes (Projan y Novick, 1988), que corresponderían a módulos genéticos intercambiables entre los distintos plásmidos. El grado de homología de los distintos módulos puede variar, pero en todos los casos, es significativamente alto. El único módulo esencial es el que lleva las funciones de replicación de la hebra líder. Se han definido algunos módulos principales (del Solar *et al*, 1993c): i) la región de control e iniciación de la hebra líder (LIC); ii) el determinante de resistencia a antibióticos (DET); iii) el origen de cadena sencilla (*ssO*); iv) la región implicada en movilización conjugativa y recombinación (MOB/PRE) (Priebe y Lacks, 1989). Como ejemplos se pueden citar:

el alto grado de homología entre la región LIC de pMV158 (plásmido de *Streptococcus agalactiae*) y pE194 (plásmido de *Staphylococcus aureus*); a nivel de la región DET de pLS1 (*Streptococcus pneumoniae*) y de pT181 (*S.aureus*); o entre las regiones *sso* y MOB/PRE de pMV158 y pUB110 (*S.aureus*) (Fig. 3). Basándose en las homologías existentes a nivel de la secuencia de DNA y de la organización genética de la región LIC, se han definido cuatro familias de plásmidos que replican mediante el mecanismo de círculo rodante (Novick, 1989). Los representantes de cada una de las familias son: pT181; pUB110/pC194; pLS1/pE194 y pSN2.

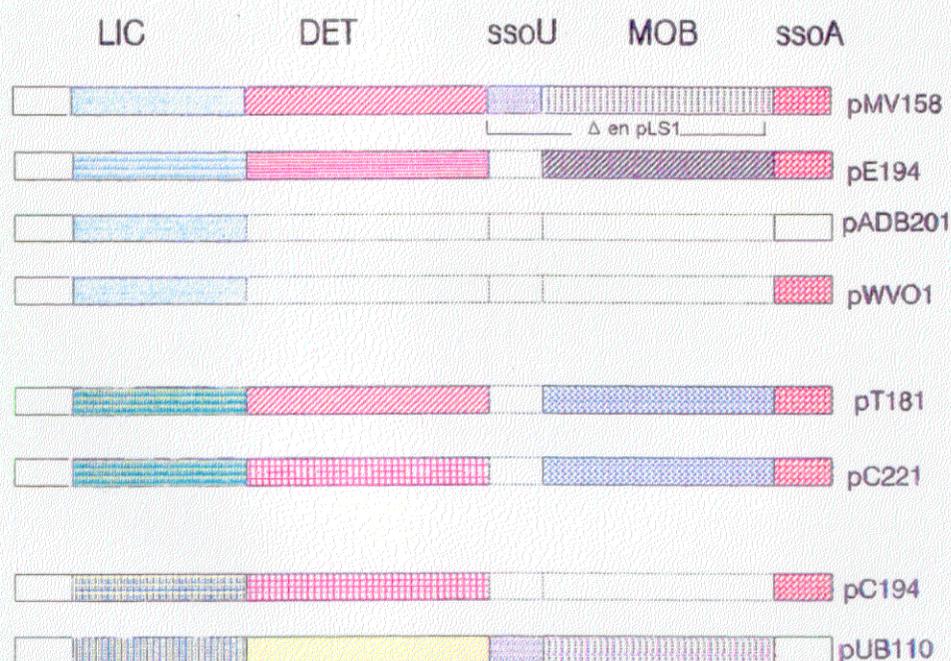


Figura 3. Representación de los plásmidos con replicación tipo RC como módulos de información genética. Los mapas funcionales muestran la presencia (líneas continuas) o ausencia (líneas discontinuas) de los casetes indicados: LIC, región de iniciación y control de la replicación; DET, resistencia a antibióticos; MOB/PRE, región implicada en recombinación y movilización plasmídica; *ssoA* y *ssoU*, orígenes de replicación de la cadena retrasada. Los casetes están rotulados y coloreados de acuerdo a las homologías existentes. Se indica la región de pMV158 delecionada para construir el plásmido pLS1.

Para el mecanismo de replicación RC son necesarios tres elementos: el origen de doble cadena (*dso*), la proteína iniciadora de la replicación (Rep) y el origen de cadena retrasada (*sso*).

4.1. Origen de replicación de la cadena líder (*dso*)

El origen de la cadena líder o *dso* [también llamado *ori(+)*] se encuentra situado "corriente arriba" o dentro de la región codificante para la proteína Rep. Contiene las secuencias de DNA reconocidas específicamente por la proteína Rep para que se produzca la iniciación y la terminación de la síntesis de la cadena líder. La mayoría de los orígenes, quizás con la excepción de pUB110, poseen secuencias con potenciales estructuras tallo-lazo (Gruss y Ehrlich, 1989). El *dso* de los miembros de la familia de pT181 se puede dividir funcionalmente en dos regiones (Fig. 4). Una de ellas, con capacidad de generar una estructura tallo-lazo (IR-II), contiene el sitio de

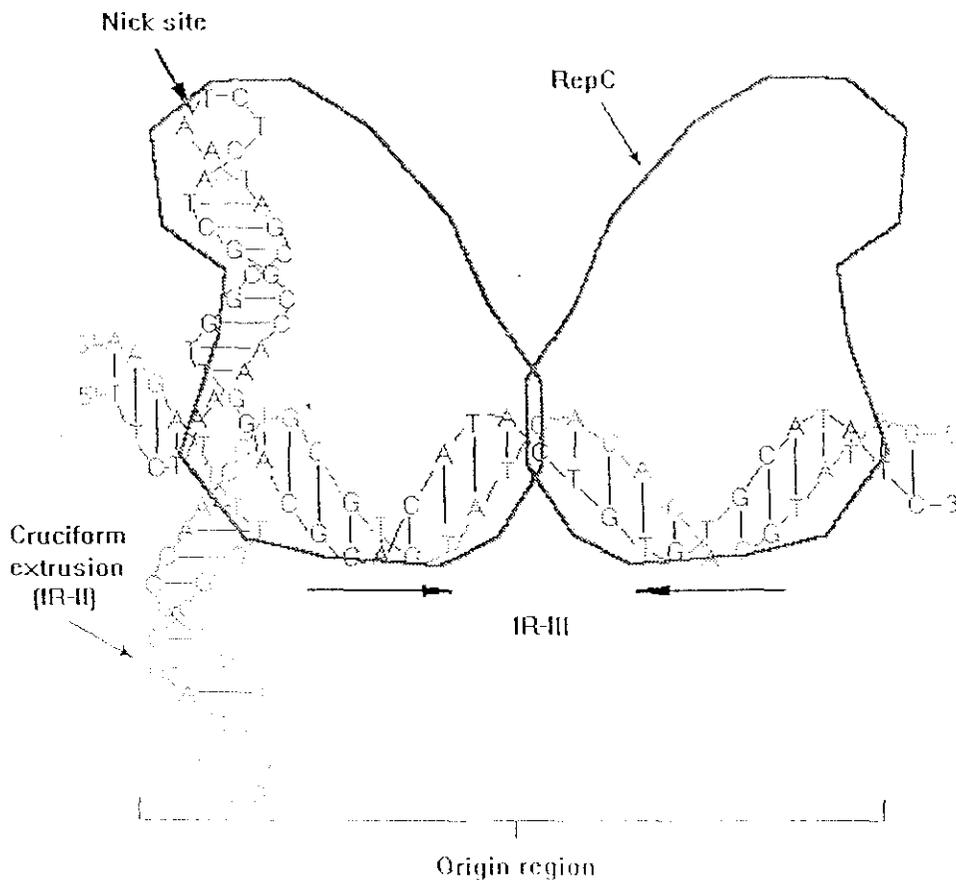


Figura 4. Modelo de interacción RepC-*dso* para pT181. Se muestra la unión simétrica del dímero de RepC a la repetición invertida IR-III, que se indica con flechas. Se muestra como una subunidad de RepC se une de modo asimétrico a la estructura cruciforme IR-II que contiene el sitio de corte indicado ("nick site"). Las letras oscuras representan los nucleótidos que corresponden a la hebra líder de pT181, y las letras claras representan los nucleótidos correspondientes a la cadena retrasada. (Figura tomada de Wang *et al.*, 1993).

corte y se conserva entre los plásmidos de la familia. La otra región es adyacente en 3' a la anterior, contiene el sitio de reconocimiento de la proteína Rep, y es específica para cada plásmido (Koepsel *et al.*, 1986). El *dso* de pT181 contiene tres pares de repeticiones invertidas (IR-I, -II y -III) capaces de formar estructuras del tipo tallo-lazo (Gennaro *et al.*, 1989). El par central, IR-II, contiene el sitio de corte para la iniciación y puede formar una estructura cruciforme *in vivo* e *in vitro*, promovida o estabilizada tras la unión de la proteína RepC (Noirot *et al.*, 1990). El elemento IR-III no está conservado entre los miembros de la familia y constituye el determinante de especificidad en el reconocimiento del origen. Para el reconocimiento de la proteína RepC sólo se requieren los primeros 11 nucleótidos del elemento IR-III, que comprenden el brazo proximal y la región central de la estructura diada (Fig. 4; Wang *et al.*, 1993). Por el momento, el papel de IR-I es desconocido.

4.2. Proteínas de replicación (Rep)

Las proteínas Rep, codificadas por los plásmidos, son las encargadas de la iniciación de la replicación, ya que al reconocer una secuencia específica del *dso* producen una rotura en una de las hebras del DNA, generando el extremo 3'-OH que será usado como "primer", quizás por la DNA polimerasa III, para la síntesis de la cadena líder. La proteína GpA de ϕ X174, así como las proteínas Rep de los plásmidos pT181 y pC221 permanecen unidas covalentemente al extremo 5'-fosfato generado tras la reacción de corte (Langeveld *et al.*, 1978; Thomas *et al.*, 1990). Sin embargo, hasta el momento no ha sido demostrada la existencia de un enlace covalente para la proteína gpII del fago f1 y fagos filamentosos relacionados (Meyer y Geider, 1979). Las proteínas Rep actúan en *trans*, poseen actividades de endonucleasa específica y de polinucleotidil-transferasa, y son esenciales para la replicación del plásmido. Por lo general, su síntesis constituye la etapa limitante del proceso replicativo. Las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pT181 poseen un 75-85% de identidad en la secuencia de aa. Sin embargo, presentan dos regiones con un alto grado de divergencia: la región N-terminal de la secuencia codificante, que corresponde al *dso* y una región localizada en el extremo C-terminal, que comprende un segmento de 6 aa y constituye el determinante de especificidad de la proteína (Projan y Novick, 1988; Dempsey *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1992). Entre las dos regiones divergentes, se encuentra una región central altamente conservada que contiene la Tyr

implicada en la unión covalente al DNA durante la iniciación de la replicación (Thomas *et al*, 1990). Además de participar en la iniciación, las proteínas Rep participan en la terminación de la replicación, como se ha demostrado para ϕ X174 (van der Ende *et al*, 1982), fd (Meyer *et al*, 1981) y pT181 (Murray *et al*, 1989). Recientemente, se ha propuesto un modelo para la terminación de la replicación en pT181 (Rasooly y Novick, 1993), en el cual la subunidad intacta del homodímero de RepC produce un nuevo corte en la cadena nueva sintetizada (tras alcanzar el *dso* reconstituido y proseguir unos nucleótidos más) y por medio de un intercambio de hebras se libera una molécula dsDNA completa, un intermediario de ssDNA circular y un heterodímero de RepC compuesto por una molécula intacta y otra unida a un pequeño oligonucleótido (Rasooly *et al*, 1994a).

Por otra parte, y en base a datos genéticos, se ha propuesto (Noirot-Gross *et al*, 1994) que la proteína iniciadora de la replicación de pC194, RepA, podría poseer dos centros catalíticos no equivalentes que romperían enlaces fosfodiéster por dos mecanismos diferentes, transesterificación e hidrólisis. Predicciones de ordenador muestran que las proteínas Rep de la familia de pC194 poseen cinco regiones conservadas. La región IV muestra homología con el centro activo de la proteína GpA de ϕ X174, y dos de los aa conservados del sitio activo de la proteína RepA de pC194 (Tyr214 y Glu210) se encontrarían localizados en una región de α -hélice de la proteína. Sin embargo, hasta el momento las únicas proteínas Rep de la familia de pC194 que han sido purificadas son la proteína RepK de pKYM (Ozaki *et al*, 1994) y más recientemente la proteína RepU de pUB110 (Müller *et al*, 1995). Parece ser que la proteína RepK se une específicamente como monómero al *dso* de pKYM y que, a diferencia de lo que ocurre con la proteína RepC de pT181 (Wang *et al*, 1992), RepK no induce una curvatura del DNA tras su unión a la región del origen (Ozaki *et al*, 1994). Desafortunadamente, la proteína RepK purificada perdió la capacidad para introducir un corte monocatenario en el sitio de iniciación de la replicación del DNA (actividad de corte) tras usar para su purificación una columna de heparina-sefarosa (Ozaki *et al*, 1994).

Ilyina y Koonin (1992) han identificado motivos conservados entre las proteínas Rep y las proteínas Mob, éstas últimas relacionadas con la transferencia conjugativa

de DNA plasmídico. El motivo 1 (cuya secuencia consenso es: FUtltXXX o FUuypXXX, donde U representa un residuo hidrofóbico y X, cualquier residuo) está presente sólo en la región N-terminal de las proteínas Rep y no se le ha asignado función alguna. El motivo 2 (XpHUhUUX o XuHUhUUX), contiene dos His conservadas en un entorno hidrofóbico y, por analogías con metaloenzimas, podría estar implicado en la coordinación de iones metálicos requeridos para la actividad de estas proteínas. Finalmente, el motivo 3 (UXXYUXkXXX o UXXYUXhXXX), está localizado en la región C-terminal de las proteínas Rep y en el extremo N-terminal de las proteínas Mob, que contendría el residuo Tyr conservado, implicado en la unión covalente al DNA. Como se dijo anteriormente, las proteínas Rep no presentan motivos típicos de unión a DNA, aunque se ha postulado un motivo LZ en la proteína RepB de pLS1 (de la Campa et al, 1990). Para los plásmidos pT181 y pC221 se ha demostrado la existencia del determinante de especificidad en 6 aa de la región C-terminal de sus proteínas (Wang et al, 1992), localizándose el residuo Tyr activo en la región central (Thomas et al, 1988). Parece que la región C-terminal de la proteína gpII del fago f1, podría estar implicada en la regulación de la replicación, ya que se ha comprobado que la proteína del gen X, sintetizada a partir de un codón de iniciación interno del gen II (idéntica a un tercio del C-terminal de gpII), es un potente inhibidor de la síntesis *in vivo* del DNA del fago (Fulford y Model, 1988).

4.3. Origen de replicación de la cadena retrasada (*sso*)

El origen de cadena sencilla [*sso* u *ori*(-)] contiene el sitio de iniciación para la síntesis de la cadena retrasada. El *sso* se encuentra situado en la misma hebra que el *dso*, aunque separado físicamente de él. Se localiza dentro de una región no-codificante altamente estructurada y su actividad es dependiente de orientación (Gruss et al, 1987; del Solar et al, 1987b, 1993a; Novick, 1989). Basándose en homologías a nivel de DNA, se han descrito dos tipos principales de *sso*: *ssoA* representado por los plásmidos pT181 (Gruss et al, 1987) y pLS1 (del Solar et al, 1987b); y *ssoU* de pUB110 y pMV158 (van der Lelie et al, 1989). Muchos *sso* son específicos de huésped y en algunos casos como en *S.aureus* (Gruss et al, 1987), *S.pneumoniae* (del Solar et al, 1987b; Kramer et al, 1995) y *Streptomyces lividans* (Deng et al, 1988), la delección del *sso* causa acumulación de ssDNA, disminución del número de copias y/o inestabilidad segregacional plasmídica.

4.4. Modelo de replicación por círculo rodante

El modelo actual para explicar el mecanismo de replicación tipo RC (Fig. 5) está basado principalmente en los plásmidos, pT181, pC221 y pLS1 (Rasooly y Novick, 1993; Rasooly *et al*, 1994a, 1994b; Dempsey *et al*, 1995; del Solar *et al*, 1987b, 1993c). Se pueden distinguir tres etapas principales: iniciación y elongación de la síntesis de la cadena líder; terminación de la replicación de la cadena líder, y replicación de la cadena retrasada (conversión de ssDNA en dsDNA).

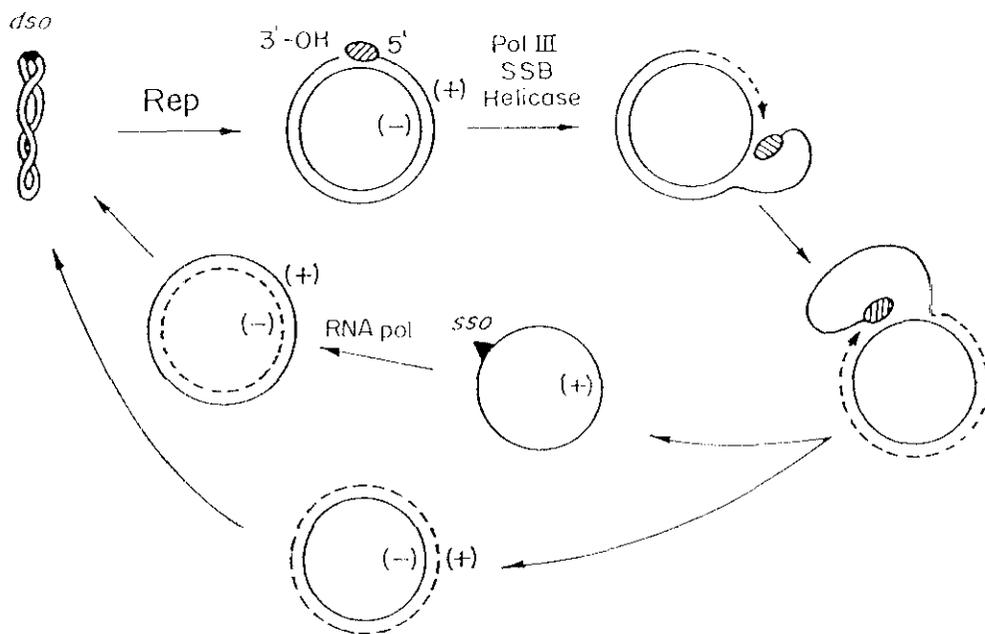


Figura 5. Modelo de replicación por el mecanismo de círculo rodante. La proteína Rep (⊖) reconoce DNA superenrollado, introduciendo una rotura específica dentro del origen de replicación de la cadena (+) (*dso*). El extremo 3'-OH generado, será usado como "primer" para la síntesis de la cadena líder nueva (línea discontinua). La proteína Rep permanece unida covalentemente al extremo 5'-P de la cadena parental(+), mientras ésta va siendo desplazada. Cuando la horquilla de replicación alcanza el *dso* reconstituido, termina la síntesis de la cadena líder y se produce la circularización y liberación de la cadena parental(+) desplazada como intermediario de ssDNA. La conversión de ssDNA a dsDNA se produce tras el reconocimiento del *sso* (▲) por la RNA polimerasa del huésped para la iniciación de la cadena(-).

Iniciación y elongación de la cadena líder

La unión asimétrica del homodímero de RepC (Fig. 4) de pT181 al sitio de reconocimiento del *dso* induce la formación de una curvatura en el DNA entre los elementos IR-II e IR-III (Koepsel y Khan, 1986), e incrementa la extrusión de la

estructura tallo-lazo de IR-II, que contiene la secuencia específica de corte (Noirot *et al*, 1990; Wang *et al*, 1993). Una de las subunidades de RepC introduce un corte específico de sitio en la cadena(+) y queda unida covalentemente al extremo 5' del sitio de corte mediante un enlace tirosil-fosfodiéster (Thomas *et al*, 1990). La reacción de corte genera el extremo 3'-OH que sería usado por la DNA polimerasa III para sintetizar una nueva cadena(+) usando como molde la cadena(-) del plásmido. Al mismo tiempo, la cadena(+) parental se iría desplazando mediante la acción de una helicasa del huésped, mientras que la proteína SSB cubriría la hebra parental desplazada como ssDNA. La replicación continúa hasta reconstituir el *dso* y se extiende unos 12 nucleótidos más allá.

Terminación de la replicación de la cadena líder

Como la replicación de la hebra líder se extiende unos nucleótidos más allá del *dso* reconstituido, la subunidad de RepC intacta iniciaría una reacción de transferencia de hebra mediante introducción de un corte en el nuevo *dso* sintetizado y unión a los 12 nt extra. El modelo actual de terminación (Rasooly y Novick, 1993) postula que el grupo 3'-OH que se ha generado ataca al *dso* parental, produciendo un nuevo 3'-OH que atacará el enlace entre la subunidad de RepC que inició la replicación y el DNA parental (Fig. 6). Al final, se obtendrían como productos de replicación una molécula dsDNA reconstituida, un intermediario de ssDNA y un heterodímero de RepC [constituido por dos subunidades de RepC, una de las cuales (RepC*) lleva unida covalentemente un corto oligonucleótido], que es inactivo en replicación. Los autores han demostrado que este mecanismo de inactivación de la proteína Rep se produce en otros miembros de la familia de pT181 tanto en *B.subtilis* como en *S.aureus* (Rasooly *et al*, 1994a). Recientemente, Müller *et al* (1995) han sugerido que la proteína RepU de pUB110 podría ser convertida durante la replicación en un hetero-oligómero inactivo RepU-RepU*, limitando con ello la cantidad de proteína RepU útil para iniciación de la replicación, del mismo modo que ocurre para pT181.

Como ya se ha indicado, el sitio activo de la proteína RepA de pC194 podría estar compuesto por dos centros catalíticos que actúan sobre los enlaces fosfodiéster mediante dos mecanismos distintos: transesterificación, como en las topoisomerasas e hidrólisis, como se ha descrito para algunas exo- y endonucleasas. Basándose en el

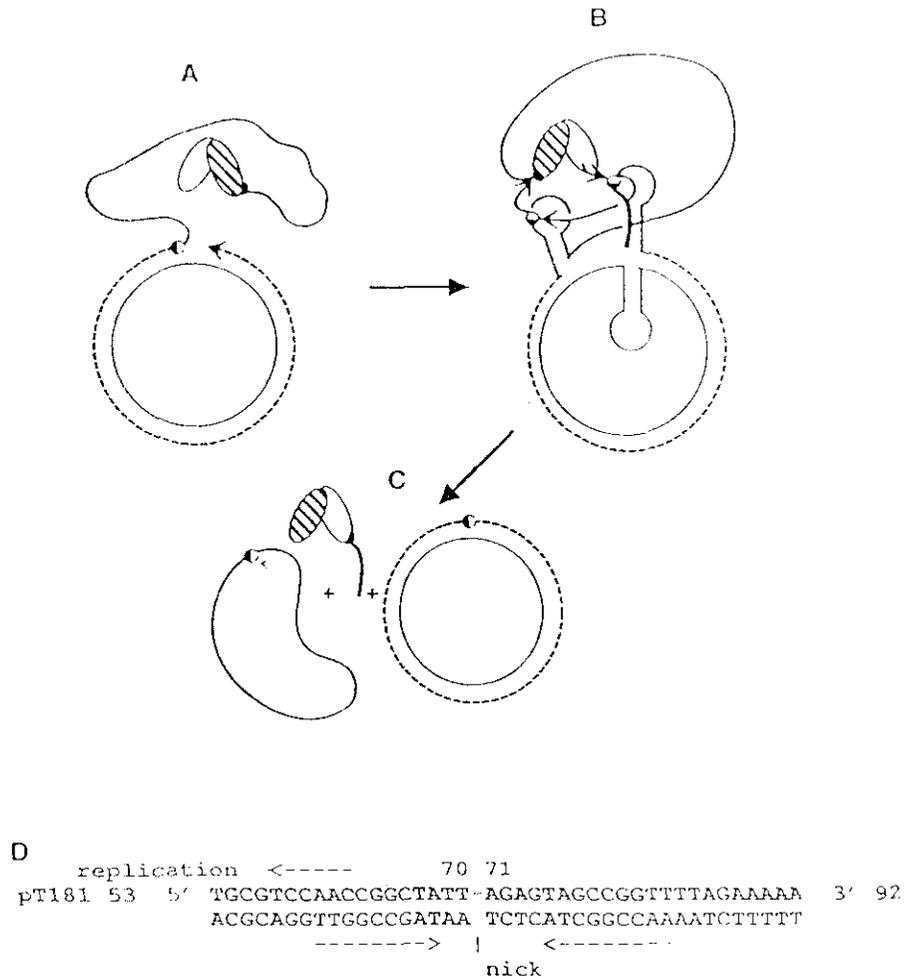


Figura 6. Modelo de terminación de la replicación del plásmido pT181. **A.** Diagrama de la configuración esperada de una molécula de DNA plasmídica hacia el final de un ciclo de replicación. Una subunidad (sombreada) del dímero de RepC está unida covalentemente al extremo 5' de la hebra desplazada y el punto de crecimiento de la hebra naciente (flecha) está próximo al sitio de corte del *dso* (●). **B.** El sitio de corte ha sido replicado, la cadena líder se extiende unos nt más allá y la horquilla del origen se ha formado en las cadenas líder nueva y desplazada, así como en la cadena retrasada. La segunda subunidad de RepC (no sombreada) inicia una reacción concertada de transferencia de hebra (flecha) cortando el origen recién sintetizado y quedando unida a un corto oligonucleótido que contiene aproximadamente 12 nt de la mitad 3' de la horquilla del *dso*. El grupo 3'-OH generado ataca el *dso* parental, y el 3'-OH desplazado ataca después el enlace viejo RepC-DNA, desplazando a la proteína y restaurando la continuidad de la hebra(+) desplazada, que es liberada como un círculo monocatenario. **C.** Los productos finales son: un monómero circular monocatenario que representa la cadena líder desplazada, un heterodímero de RepC con el oligonucleótido unido a una subunidad, y un monómero plasmídico bicatenario que contiene la cadena líder nueva. El monómero monocatenario replica después por un mecanismo independiente, que no implica RepC, para completar el ciclo. **D.** Se muestra la secuencia del *dso* alrededor del sitio de corte ("nick"). Las flechas discontinuas convergentes indican el tallo de la horquilla del *dso*. (Figura tomada de Rasooly y Novick, 1993).

análisis de mutantes en los residuos conservados de la proteína RepA de pC194, los autores (Noirot-Gross *et al*, 1994) especulan sobre un mecanismo de terminación distinto al de pT181, aunque no descartan una posible inactivación de la proteína RepA similar a la que se produce en RepC durante la replicación. La replicación se iniciaría a través del mecanismo de transesterificación, característico de las topoisomerasas, produciéndose el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de Tyr214 sobre el enlace fosfodiéster del DNA, quedando la proteína covalentemente unida al DNA. El residuo Glu142 podría facilitar el ataque uniendo un ión metálico (Mg^{2+}) que ayudaría a neutralizar las cargas negativas del sustrato fosfodiéster, como se ha descrito para la actividad exonucleasa 3'→5' de la DNA polimerasa I de *E.coli* (Beese y Steitz, 1991). Tras una ronda de replicación, el residuo Glu210 activaría una molécula de agua para que se produzca el ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster de la nueva hebra sintetizada, o promovería indirectamente la activación de la molécula de agua a través de la quelación de un ión metálico. Una nueva reacción de transesterificación generaría una molécula de ssDNA y rompería la unión de la proteína al extremo 5' del DNA.

Replicación de la cadena retrasada

La iniciación de la replicación de la cadena retrasada se produce tras el reconocimiento del *sso* por proteínas del huésped e implica la conversión de ssDNA en dsDNA (Fig. 5). Para los plásmidos que poseen *ssoA*, se ha demostrado que la replicación de la cadena retrasada no requiere funciones codificadas por el plásmido (Birch y Khan, 1992), pero sí se necesita el reconocimiento del *sso* (*ssoA* o *ssoU*) por la RNA polimerasa del huésped (Dempsey *et al*, 1995; Kramer *et al*, 1995). Se postula que la molécula ssDNA estaría cubierta por la proteína SSB, excepto en la región del *sso* que, al ser altamente estructurada, actuaría como señal para su reconocimiento por la RNA polimerasa. Este enzima sintetizaría un "primer" que sería elongado, posiblemente por la DNA polimerasa III, hasta alcanzar el extremo 5' del RNA "primer". La DNA polimerasa I gracias a su actividad exonucleasa 5'→3' escinde el RNA "primer" y polimeriza el DNA restante, cuyos extremos serán ligados por la DNA ligasa (Geider y Kornberg, 1974; Díaz *et al*, 1994).

Recientemente, se ha determinado *in vitro* el sitio de iniciación de la cadena retrasada para los plásmidos pT181, pE194, pSN2 y pUB110/pC194 (Dempsey *et al*, 1995). Para pT181 y pSN2 se han encontrado múltiples sitios de iniciación dentro, o cerca, del lazo central conservado de la estructura secundaria del *ssb*. Esta iniciación múltiple correspondería a un RNA "primer" de tamaño fijo, sintetizado en distintas posiciones, o a RNAs "primer" de distinta longitud sintetizados a partir del mismo punto. El punto de iniciación mayor para pE194 se localizó en la secuencia consenso 5'-TAGCGa-3' del lazo central de la estructura del *ssb*. Para pUB110, la iniciación se produce a partir de un único sitio, que ya había sido definido *in vivo* (Boe *et al*, 1989).

5. FAMILIA DE pLS1

El plásmido pLS1 (4408 pb) se construyó mediante delección del fragmento *EcoRI* B (1122 pb) (Stassi *et al*, 1981) de su plásmido parental, pMV158 (5536 pb), aislado de una estirpe de *S.agalactiae* (Burdett, 1980). Una de las características más relevantes de pLS1, es su amplio espectro de huésped, que viene determinado por la capacidad de pLS1 de replicar en bacterias gram(+) como *S.pneumoniae* y *B.subtilis* (Espínosa *et al*, 1982; Lacks *et al*, 1986), y en bacterias gram(-) como *E.coli* (Lacks *et al*, 1986). Se conoce la secuencia de DNA completa para ambos plásmidos (Lacks *et al*, 1986; van der Lelie *et al*, 1989; Priebe y Lacks, 1989). pLS1 es el prototipo de una familia de plásmidos que replican mediante el mecanismo de RC. Desde la iniciación del trabajo experimental que engloba esta Tesis hasta este momento, se han caracterizado once miembros en esta familia, que incluye una gran variedad de huéspedes tanto bacterias gram(+) como gram(-): *S.agalactiae* (pMV158); *Lactococcus lactis* (pWVO1, pFX2); *S.aureus* (pE194); *Lactobacillus plantarum* (pLB4, pA1); *Lactobacillus curvatus* (pLC2); *Helicobacter pylori* (pHPK255); *Mycoplasma mycoides* (pADB201, pKMK1) y *Leuconostoc lactis* (pCI411). Los autores que han llevado a cabo el aislamiento y caracterización de estos plásmidos se indican en la Tabla 1. El establecimiento de esta familia se ha realizado tomando como base las homologías existentes a nivel de la proteína iniciadora y el *dso* (del Solar *et al*, 1993c).

Tabla 1. Miembros de la familia de pLS1.

Plásmido	Huésped	Aislado en	Tamaño(pb)	Autores ^a
pMV158	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Estados Unidos	5536	Burdett (1980); Lacks <i>et al</i> (1986); Priebe y Lacks (1989)
pWV01	<i>Lactococcus lactis</i>	Países Bajos	2177	Leenthous <i>et al</i> (1991)
pFX2	<i>Lactococcus lactis</i>	Nueva Zelanda	3536 ^b	Xu <i>et al</i> (1991)
pE194	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rumanía	3728	Horinouchi y Weisblum(1982a); Villafane <i>et al</i> (1987)
pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reino Unido	3548	Bates y Gilbert (1989)
pA1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Yugoslavia	2820	Vujcic y Topisirovic (1993)
pLC2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Alemania	2489	Klein <i>et al</i> (1993)
pHPK255	<i>Helicobacter pylori</i>	Reino Unido	1455	Kleanthous <i>et al</i> (1991)
pADB201	<i>Mycoplasma pylori</i>	Australia	1717	Bergemann <i>et al</i> (1989)
pKMK1	<i>Mycoplasma pylori</i>	Estados Unidos	1875	King y Dybvig (1992)
pCI411	<i>Leuconostoc lactis</i>	Irlanda	2926	Coffey <i>et al</i> (1994)

(a) Los autores citados son los que han publicado (o corregido) la secuencia de nucleótidos del plásmido

(b) El tamaño de pFX2 (un derivado de pFX1) debería ser 2508, si no se considera el gen *cat* de pC194, introducido por los autores

Algunas de las características que definen a esta familia son: *dso* localizado "corriente arriba" del gen *rep*; presencia de secuencias directamente repetidas (iterones) en el *dso*; existencia de dos elementos de control del número de copias: un ctRNA y una proteína (Cop), que actúa como represor transcripcional, y transcripción de los genes *cop* y *rep* a partir de un único promotor. Casi todos los miembros de esta familia presentan la secuencia consenso 5'-TACTACGA-3', en una región desapareada de una estructura potencial de tipo tallo-lazo presente en el origen de replicación. Las proteínas Rep presentan motivos conservados (Ilyina y Koonin, 1992) en sus regiones N-terminal y central, y una mayor divergencia en la región C-terminal, que podría estar implicada en el reconocimiento y especificidad de unión a DNA como ocurre

en la familia de pT181 (Novick, 1989). La región de control de la replicación presenta analogías a nivel estructural entre los miembros de esta familia: poseen proteínas Cop pequeñas (45-55 aa) que contienen un motivo HTH, típico de proteínas que se unen a DNA, y su operador se encuentra cerca o dentro del promotor a partir del cual se transcriben *cop* y *rep*. Codifican pequeños ctRNAs que solapan con la señal de iniciación de la traducción del gen *rep*.

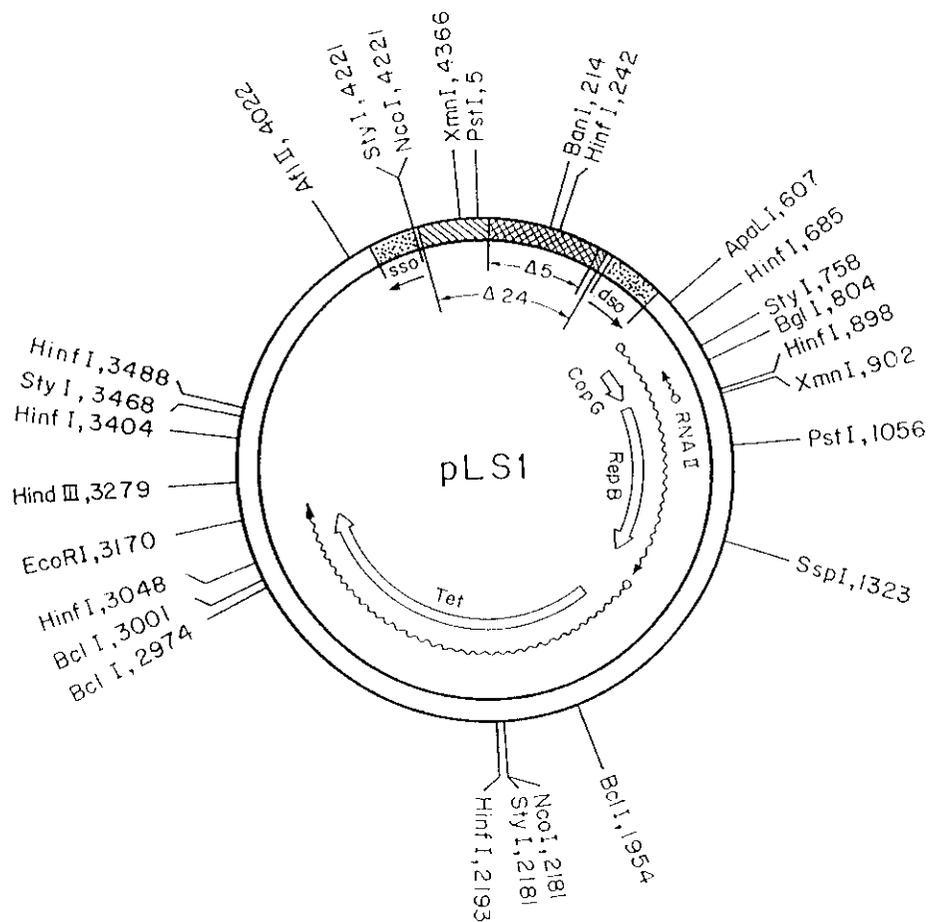


Figura 7. Mapa físico y funcional de pLS1. La región intergénica del plásmido (sombreada) incluye los orígenes *dso* y *ssoA*. Se indican la dirección de la replicación (flechas) de las cadenas líder (*dso*) y retrasada (*sso*), la extensión de las delecciones en pLS5 ($\Delta 5$) y pLS1 $\Delta 24$ *cop7* ($\Delta 24$), los promotores (círculos pequeños), RNAs (flechas onduladas) y los productos génicos (flechas anchas). Se muestran algunos sitios de restricción y las coordenadas de corte.

Tras el estudio de la organización genética del plásmido pMV158, se han identificado varios genes que constituyen diferentes módulos o cassettes, característicos de este tipo de plásmidos: la región de control e iniciación de la cadena líder (LIC) presenta los genes *repB*, *copG* y *mall*. Existe un determinante de resistencia a Tc (*tet*), y contiene el gen *mob* que está implicado en movilización conjugativa. Curiosamente, pMV158 posee dos regiones *sso* (*ssoA* y *ssoU*). El plásmido pLS1 carece de los módulos correspondientes al gen *mob* y a la región *ssoU*. pLS1 (Fig. 7) replica mediante el mecanismo tipo RC (del Solar *et al*, 1987b). Trabajos previos del laboratorio habían demostrado que la proteína iniciadora de la replicación, RepB, posee actividad topoisomerasa tipo I-5' (ver clasificación de topoisomerasas en Roca, 1995) e introduce un corte específico de sitio en la región *dso* (de la Campa *et al*, 1990). Se postuló que, tras el corte, se generaría un extremo 3'-OH que se usaría como "primer" para la síntesis de la cadena líder. Como productos de replicación se han observado moléculas de dsDNA e intermediarios de ssDNA (del Solar *et al*, 1987a, 1987b). Dentro del *dso*, se han descrito dos estructuras de tipo tallo-lazo, las Horquillas I y II, y tres repeticiones directas de 11 pb (Puyet *et al*, 1988), a las cuales la proteína RepB se une *in vitro* sobre DNA lineal (de la Campa *et al*, 1990). En el lazo de la Horquilla I se encuentra la secuencia consenso 5'-TACTACGA-3'. RepB reconoce esta secuencia y produce un corte específico entre los nt 448 (G) y 449 (A) (de la Campa *et al*, 1990). En la Figura 8 se muestra la secuencia de nucleótidos de la región LIC de pLS1, con la información relevante para el presente trabajo.

1
 CTGCAGAAGTAGTCGCTGATTTGGCTAATTTCAGCGTATCAAAGACAAAGGCGACCAAAAATAGCTTGAGTTTC
 TTTTAGAACAAAAAGAAAGACAGTAGTTGCACCTACTGTCTTTCTTTTGGGTTGTGCTTTTAGTTCCTCG
 AACTTTTAGCGTCAAGCAATTTATATTCATGGGGCGAGAAATCTGTCAAATAAATGCTATAATGCTTTTGA
 GGCACCTCAGCGATACGGTTCGGTGTGTAATCTCATTACGTAGGGCGACTGGAAACGGATAGCTCAAAG
 GGCGCGTTTGAGTGTGGGTGTGGGACTGCCTTCAGCTTCGGGCTGTAAAGACCCCTGATACTTTTGAATG
 AGATGACCCTTTGGGGTCTTTTTTGTTTTTTTAGGGAGATGTTGTGGGGGATTTTTTCTCCGAAAAATCT
 AAAATATGGGGGGCTACTACGACCCCCCTATAGTCCCGAGTGCCAAAATCAAAAAAAAACGCCTTAG
 CCTTAGAGCTGCAAGGGTTTGAGGCTCGTCAAATCTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTFA
 GAGATTTTTTGGGAAAAATACGAAAAAGATTGCAATTTGAGTGCACGGTTATGCTACTATAAGTTTTATAAAAT
 TTTGAGAGGTGACGCATGAAAAAAGATTGACGATAACATTAAGTGAATCGGTACTTGAAAAATCTTGAAAA
 M K K R L T I T L S E S V L E N L E K
 AATGGCAAGAGAGATGGGGTTATCAAATCTGCAATGATTTCTGTTGCCTTGAAAAATTACAAGAAAGGTC
 M A R E M G L S K S A M I S V A L E N Y K K G Q
 AAGAAAAATAAAAAAGCCGTGCTGGCAGGCACTGGCTAAAGTCAAACATTTCTTGGGTATATTATACTTT
 E K . K K P C W Q A L A K V K H F L G I L Y F
 Rep B ~~~~~
 ATGGCTAAAGAAAAGCAAGATACTTCACTTTTTTACTTTATCCTGAATCAATCCAAGCGACTGGGAGCT
 M A K E K A R Y F T F L L Y P E S I P S D W E L
 GAACTTGAAACGCTTGGAGTGGCGATGGCAATTAGTCCATTGCATGATAAGGATAAGAGTAGTATCAAAG
 K L E T L G V P M A I S P L H D K D K S S I K G
 GACAAAAATATAAGAAAGCTCATTATCATGTGCTTTATATAGCTAAAAATCCAGTFACTGCAGATAGTGTA
 Q K Y K K A H Y H V L Y I A K N P V T A D S V
 CGTAAAAAGATTAAATTATGCTTGGTGAAAAAGTCTTGCAATGGTGCAGGTTGTTCTCAATGTCCAAAA
 R K K I K L L L G E K S L A M V Q V V L N V E N
 TATGTATTGTATTTAACGCACGAGAGCAAGGACGCTATTGCTAAGAAGAACATGTTTATGATAAGGCTG
 M Y L Y L T H E S K D A I A K K K H V Y D K A D
 ATATAAGCTAATCAATAATTTTGATATTGACCGTTATGTGACGTTAGATGTCGAGGAAAAGACCGAACTT
 I K L I N N F D I D R Y V T L D V E E K T E L
 TTCAATGTGGTTGTATCGCTTATTCGTGCGTACACTCTCCAAAATATTTTTGATTTGTATGATTTCAATTGA
 F N V V V S L I R A Y T L Q N I F D L Y D F I D
 CGAAAATGGAGAAACTTATGGTTGACTATAAATTTGGTTAACGAAGTTATTGCAGGAAAAACTGGTTTTA
 E N G E T Y G L T I N L V N E V I A G K T G F M
 TGAAATTTGTTGTTGACGGAGCTTATCAACGTAGTAAGCGTGAACAAAGAACGAAGAGAGATAAAAAAGTT
 K L L F D G A Y Q R S K R G T K N E E R .
 GATCTTTGTGAAAACTACAGAAAGTAAAGAATGAAAAGAGTAATGCTAACATAGCATTACGGATTTTATGA
 CCGATGATGAAGAAAAGA¹⁵⁸⁰

Figura 8. Secuencia de nucleótidos desde la coordenada 1 a 1580 de pLS1. Las Horquillas I, II y III; y las tres repeticiones directas (I1-I2-I3) del *dso*, así como los posibles terminadores de transcripción se representan subrayados en el texto; las secuencias -10 y -35 del promotor de los genes *cop* y *rep* (P_{cr}), del promotor del RNAI (P_i) y del promotor del ctRNA II (P_{ct}) se muestran en cajas. Las secuencias de unión a los ribosomas (S.D. y a.r.b.s.) de los genes *copG* y *repB* se representan con líneas discontinuas. Asimismo se muestra la secuencia de aa de las proteínas CopG y RepB, debajo de la correspondiente secuencia de nucleótidos.

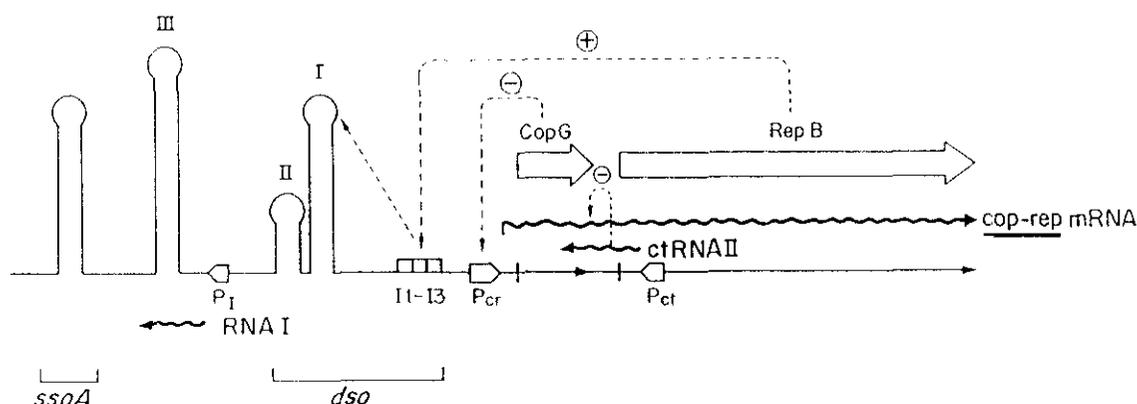


Figura 9. Control de la replicación del plásmido pLS1. Se representan el RNA I y el ctRNA II (líneas onduladas), los promotores P_I, P_{ct} y P_{cr} (cajas con punta de flecha) y las proteínas CopG y RepB (flechas anchas). Se indican las posiciones de los tres iterones (I1-I2-I3; cajas blancas) y las Horquillas I, II y III; así como las regiones correspondientes a los orígenes de replicación *dso* y *ssoA*. Mediante líneas discontinuas de trazo fino se muestran las interacciones proteína-DNA.

El *sso* de pLS1 es del tipo *ssoA*, está localizado en una región no codificante (Fig. 7). Posee capacidad para formar una estructura secundaria compleja que contiene la secuencia consenso 5'-TAGCGT-3' y el sitio de recombinación interplasmídico específico RS_B (Novick *et al*, 1984; Gruss *et al*, 1987; del Solar *et al*, 1987b, 1993a). La delección del *sso* puede reducir el número de copias plasmídico, causar inestabilidad segregacional y acumulación de ssDNA (del Solar *et al*, 1987b, 1993a). La proteína CopG, codificada por el plásmido, es un represor transcripcional con un motivo HTH (del Solar *et al*, 1989), que regula su propia síntesis y la de la proteína iniciadora, uniéndose a un elemento simétrico de 13 pb situado en la región -35 del promotor P_{cr} (del Solar *et al*, 1990). El determinante de resistencia a Tc, el gen *tet*, presenta homología con el gen *tet* del plásmido pT181 (Khan y Novick, 1983), aunque en el caso de pLS1 su expresión es constitutiva, y no inducible por el antibiótico como en pT181. Por último, hay que señalar la existencia de dos RNAs antisense en pLS1: el RNA I, localizado entre ambos orígenes y de momento, sin función conocida; y el RNA II, ctRNA complementario a la región 5' del mRNA *cop-rep*, que regula a nivel traduccional la síntesis de la proteína iniciadora de la replicación. Un esquema de los circuitos regulatorios descritos para pLS1 se muestra en la Figura 9.

OBJETIVOS

El planteamiento inicial de esta Tesis fue el estudio de las interacciones existentes entre la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pLS1, RepB y el origen de doble cadena (*dso*) del plásmido. Antes de comenzar este trabajo ya se había determinado el sitio de corte y se sabía que la proteína RepB se unía *in vitro* a las tres repeticiones del origen. Nos interesaba conocer la especificidad de secuencia de la proteína RepB y profundizar en el estudio de las actividades de corte/cierre y nucleotidiltransferasa de esta proteína. Asimismo era de interés el estudio de la diversidad de sustrato de la proteína, estudiar el *dso* como determinante de incompatibilidad y conocer el papel de los iterones, tanto *in vivo* como *in vitro*, en la replicación del plásmido. Uno de los puntos cruciales fue determinar si tras el corte producido en el origen de replicación por la proteína iniciadora RepB, se establecía una unión covalente proteína-DNA. Además, nos interesaba conocer si la proteína RepB de pLS1 sería capaz de reconocer los orígenes de replicación de otros plásmidos de la misma familia. Por último, se trataría de comenzar la determinación de algunos dominios funcionales de la proteína, mediante la caracterización de deleciones en las regiones N- y C-terminal de la proteína, así como el efecto que tendría el cambio de la Tyr posiblemente implicada en la unión a DNA, sobre las actividades de corte/cierre, nucleotidiltransferasa o de unión a DNA de RepB. Realizando comparaciones de secuencia entre las proteínas Rep de los plásmidos de la familia se determinaron cinco regiones de aa conservadas entre ellas.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS

Para ensayos de estabilidad e incompatibilidad, así como para la preparación y construcción de plásmidos derivados de pLS1 y de recombinantes basados en pC194cop se usó *S.pneumoniae* 708. Para la construcción y análisis de plásmidos recombinantes basados en pET5 se utilizaron las estirpes C600, MC1061 y BL21 de *E.coli*. Como huésped para la expresión del gen *repB* y derivados, se utilizó *E.coli* BL21(DE3), isogénica de la estirpe BL21 que posee el gen de la RNA polimerasa del fago T7 en el cromosoma (donada por F.W.Studier). En los experimentos de mutagénesis dirigida se utilizaron las siguientes estirpes de *E.coli*: BMH71-18mutS, que suprime *in vivo* la reparación de la mutación, y JM109; ambas fueron suministradas por Promega. La estirpe JM109 se usó también, para el análisis de curvatura del DNA usando el plásmido pBend2 y junto con *E.coli* DH5 α se usó en la construcción y preparación de plásmidos recombinantes basados en el pALTER-1. *B.subtilis* MB11 se utilizó para la determinación del número de copias del plásmido pLS1 y su parental pMV158, a temperaturas de crecimiento del cultivo superiores a 37°C. Las características genotípicas, así como la procedencia de todas las estirpes utilizadas se recogen en la Tabla 2.

2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo procedentes del replicón pMV158 fueron: pLS1, pLS4, pLS5, pLS1cop7, pLS5cop11, pLS1 Δ 24cop7, pLS1 Δ A4 y pLS1 Δ A15. Los recombinantes derivados de pC194cop fueron: pJS3cop7, pJS4, pCGA3, pCGA30, pCGA7, pCGA8, pCGA11 y pCGA12. Las construcciones realizadas durante este trabajo basadas en el replicón pLS1 fueron: pLS1 Δ A4-24, pLS1-520, pLS1-520 Ω 4, pLS1-570, pLS1-570 Ω 4 y pLS1BB; y las basadas en pC194cop: pC3BA, pC3BA-520 Ω 4 y pC3BA-570 Ω 4.

Como vectores de clonaje en *E.coli* se utilizaron el pET5 para los plásmidos pLS19, pLS19 Δ N, pLS19 Δ Ni, pLS19 Δ C y pLS19 Δ Ci; y el pALTER-1 para los

plásmidos: pALT-*PstIb*, pALT-*BamHI*, pALT-*BglII*, pALT-*BB*, pALT7:*cr-cat*, pALT7Y99F y pALT7Y99S. Por otra parte, se usó el plásmido pBend2, donado por S.Adhya, para la construcción del plásmido pBend-*dso*.

Otros plásmidos pertenecientes a la familia de pLS1, usados en este trabajo, fueron pE194 y pFX2, procedentes del Bacillus Genetic Stock Center y del Dr. L.E.Pearce, respectivamente. Las características más relevantes de todos estos plásmidos así como de sus parentales, se describen en la Tabla 3.

Tabla 2. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>S.pneumoniae</i> 708	<i>end-1 exo-2 trt-1 hex-4 malM594</i>	Lacks y Greenberg (1977)
<i>E.coli</i> C600	F' <i>thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 λ</i> '	Bachmann (1972)
<i>E.coli</i> MC1061	<i>hsdR mcrB ΔlacX74 galU galK rpsL thi araD139 Δ(araABC-leu)</i>	Kunkel y Seni (1988)
<i>E.coli</i> BL21	F' <i>r_B⁻m_B⁻ gal ompT</i>	Studier y Moffatt (1986)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F' <i>r_B⁻m_B⁻ gal ompT (int::P_{lacUV5}-T7 gen1 inu21 nin5)</i>	Studier y Moffatt (1986)
<i>E.coli</i> BMH71-18mutS	<i>thi supE Δ(lac-proAB) (mutS::Tn10) (F' proA⁺B⁺ laqI^qZΔM15)</i>	Kramer <i>et al</i> (1984)
<i>E.coli</i> JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17(r_k⁻m_k⁺) relA1 supE44 λ' Δ(lac-proAB) (F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al</i> (1985)
<i>E.coli</i> DH5α	<i>φ80d/lacZΔMIS recA1 endA1 gyrA90 hsdR17 supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Raleigh <i>et al</i> (1989)
<i>B.subtilis</i> MB11	<i>lys3 metB10 hisH2</i>	Colección del laboratorio

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pMV158	5536	Tc ^r	Plásmido natural de <i>S.agalactiae</i>	Burdett, 1980
pLS1	4408	Tc ^r	Δ EcoRI B de pMV158 (Δ mob)	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS5	4076	Tc ^r	Delección <i>in vivo</i> de pLS1, Δ (34-365) (Δ mal)	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS4	3438	Tc ^r	Δ HindIII-NcoI pequeño de pLS5 (Δ soa, Δ mal)	del Solar <i>et al</i> , 1987b
pLS1cop7	4408	Tc ^r	Transversión C→A, coord.743 en copG de pLS1	del Solar <i>et al</i> , 1987b
pLS5cop11	4080	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.607 de pLS5	del Solar y Espinosa, 1992
pLS1 Δ A4	4240	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 649-816) de pLS1 (Δ copG)	del Solar y Espinosa, 1992
pLS1 Δ 24cop7	3838	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 4240-401) de pLS1cop7 (Δ mal)	Puyet <i>et al</i> , 1988
pLS1 Δ A4-24	3672	Tc ^r	(Δ 4240-401, Δ mal) (Δ 649-816, Δ copG)	Este trabajo
pLS1 Δ A15	4313	Tc ^r	Delección por BAL31 (Δ 760-854) de pLS1 (Δ copG, Δ repB)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pLS1-520	4408	Tc ^r	Cambio C→A y G→C (coord.522 y 525 de pLS1). Creación del sitio BamHI	Este trabajo
pLS1-520 Ω 4	4412	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.520 de pLS1-520	Este trabajo
pLS1-570	4408	Tc ^r	Cambio T→C en la coord.574 de pLS1. Creación del sitio BglII	Este trabajo
pLS1-570 Ω 4	4412	Tc ^r	Inserción de 4 pb en la coord.570 de pLS1-570	Este trabajo
pLS1BB	4408	Tc ^r	Cambio C→A, G→C y T→C en las coord.522, 525 y 574 de pLS1. Creación de los sitios BamHI y BglII	Este trabajo
pJS37	7315	Tc ^r Cm ^r	Híbrido entre pLS1 y pC194	Ballester <i>et al</i> , 1986
pJS3cop7	4191	Cm ^r	Delección <i>in vivo</i> (Δ 2749-5875) de pJS37. Mutación cop7.	Ballester <i>et al</i> , 1986
pJS4	3354	Cm ^r	Delección <i>in vivo</i> (Δ 1911-5875) de pJS37 (Δ repB)	Ballester <i>et al</i> , 1986

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo (continuación).

Plásmido	Tamaño	Marcador	Características	Referencia
	(pb)			
pC194	2907	Cm ^r	Plásmido natural de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Horinouchi y Weisblum, 1982b
pC194cop	2907	Cm ^r	Mutante de copia de pC194	Ballester <i>et al</i> , 1990
pCGA3	3192	Cm ^r	Fragmento <i>AluI</i> (505)- <i>BglI</i> (804) de pLS1(<i>bind</i> y <i>copG</i>) clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop.	del Solar <i>et al</i> , 1989
pCGA30	3144	Cm ^r	(Δ <i>ApaLI-HgaI</i>) pequeño de pCGA3. (<i>bind</i>).	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA7	3088	Cm ^r	Fragmento <i>AluI</i> (320)- <i>AluI</i> (505) de pLS1 (<i>nic</i>) clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop. (<i>nic</i> ; orientación a)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA8	3088	Cm ^r	<i>Idem</i> (<i>nic</i> ; orientación b)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA11	3139	Cm ^r	Fragmento <i>NcoI-ApaLI</i> pequeño de pLS1 Δ 24cop7 clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop. (<i>bind-nic</i> ; orientación b)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pCGA12	3139	Cm ^r	<i>Idem</i> (<i>bind-nic</i> ; orientación a)	del Solar <i>et al</i> , 1993b
pC3BA	3298	Cm ^r	Fragmento <i>BanI-ApaLI</i> de pLS1BB clonado en <i>HindIII</i> de pC194cop	Este trabajo
pC3BA-520 Ω 4	3302	Cm ^r	Inserción de 4 pb en el sitio <i>BamHI</i> de pC3BA	Este trabajo
pC3BA-570 Ω 4	3302	Cm ^r	Inserción de 4 pb en el sitio <i>BglII</i> de pC3BA	Este trabajo
pBR322	4361	Ap ^r Tc ^r	Plásmido de <i>E.coli</i> basado en el replicón ColE1	Bolívar <i>et al</i> , 1977
pET5	~4240	Ap ^r	Vector basado en pBR322	Rosenberg <i>et al</i> , 1987
pLS21	~8310	Ap ^r Tc ^r	Híbrido pLS5-pET5	Lacks <i>et al</i> , 1986
pLS19	~7260	Ap ^r	Delección de los dos fragmentos <i>BclI</i> menores de pLS21	del Solar <i>et al</i> , 1989
pLS19 Δ N	~5272	Ap ^r	Fragmento <i>XmnI</i> (902)- <i>PvuII</i> (1934) de pLS1 clonado en <i>EcoRI</i> de pET5 (orientación a)	Este trabajo
pLS19 Δ Ni	~5272	Ap ^r	<i>Idem</i> al anterior (orientación b)	Este trabajo

Orientación a: clonado según la dirección de la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat o bla).
 Orientación b: clonado en dirección contraria a la expresión del gen de resistencia a antibiótico (cat o bla).

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo (continuación).

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pLS19ΔC	~4956	Ap ^r	Fragmento <i>Apa</i> I- <i>Ssp</i> I de pLS1 clonado en <i>Eco</i> RI de pET5 (orientación a)	Este trabajo
pLS19ΔCi	~4956	Ap ^r	<i>Idem</i> al anterior (orientación b)	Este trabajo
pALTER-1	5680	Tc ^r	Fagémido con el ori de f1	Promega
pALT- <i>Pst</i> Ib	6731	Tc ^r	Fragmento <i>Pst</i> I menor de pLS1 clonado en <i>Pst</i> I del pALTER-1 (orientación b)	Acebo, P.
pALT- <i>Bam</i> HI	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación del sitio <i>Bam</i> HI en la coord. 520 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> Ib	Este trabajo
pALT- <i>Bgl</i> II	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación del sitio <i>Bgl</i> II en la coord. 570 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> Ib	Este trabajo
pALT- <i>BB</i>	6731	Tc ^r Ap ^r	Creación de los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Bgl</i> II en las coord. 520 y 570 del fragmento de pLS1 clonado en pALT- <i>Pst</i> Ib	Este trabajo
pALT7: <i>crecat</i>	7545	Cm ^r	Fragmento <i>Hgi</i> AI- <i>Cla</i> I mayor de pJS3 ligado al fragmento mayor <i>Pst</i> I- <i>Cla</i> I de pALTER-1	del Solar, G.
pALT7Y99F	7545	Cm ^r Ap ^r	Cambio A→T en la coord. 2278 del fragmento de pJS3 clonado en pALT7: <i>crecat</i> (cambio Tyr99 de RepB a Phe)	Este trabajo
pALT7Y99S	7545	Cm ^r Ap ^r	Cambio A→C en la coord. 2278 del fragmento de pJS3 clonado en pALT7: <i>crecat</i> (cambio Tyr99 de RepB a Ser)	Este trabajo
pBend2	~2693	Ap ^r	Vector de clonaje basado en pBR322	Kim <i>et al</i> , 1989
pBend- <i>dso</i>	~3086	Ap ^r	Fragmento <i>Ban</i> I- <i>Apa</i> I menor de pMV158 clonado en el sitio <i>Sal</i> I de pBend2 (orientación b)	Este trabajo
pE194	3728	Em ^r	Plásmido de <i>S.aureus</i>	Horinouchi y Weisblum, 1982a; Villafane <i>et al</i> , 1987
pFX2	3536	Cm ^r	Plásmido de <i>Lactococcus lactis</i>	Xu <i>et al</i> , 1991

Orientación a: clonado según la dirección de la expresión del gen de resistencia a antibiótico (*cat*, *tet* o *bla*).

Orientación b: clonado en dirección contraria a la expresión del gen de resistencia a antibiótico (*cat*, *tet* o *bla*).

3. BACTERIÓFAGOS

Se usó el bacteriófago R408 (Promega) para infectar los cultivos de JM109/pALT-*Pst*Ib y obtener ssDNA para mutagenizar *in vitro*.

4. PROTEÍNAS

La DNA polimerasa I de *E.coli* y su fragmento Klenow (Pol IK), así como la mayoría de los enzimas de restricción y la DNA ligasa concentrada del fago T4, fueron suministrados por New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera, la DNA ligasa del fago T4, la fosfodiesterasa de veneno de serpiente (PDE) y la nucleasa P1 fueron suministrados por Boehringer Mannheim. La polinucleótido quinasa del fago T4 (T4 PNK), la transferasa terminal y la RNA ligasa del fago T4, fueron de Amersham Internacional. Pharmacia LKB suministró la DNA polimerasa del fago T7. Otras proteínas utilizadas, suministradas por Sigma, fueron: proteinasa K, RNasa A, lisozima, pronasa, seroalbúmina bovina (fracción V; BSA) y los marcadores de peso molecular. Las soluciones tampón de los enzimas de restricción fueron las recomendadas en cada caso por las firmas comerciales.

El represor transcripcional CopG fue purificado a homogeneidad por la Dra. del Solar (del Solar *et al*, 1989), la proteína SSB (3.2 mg/ml) fue de United States Biochemical Corporation y la topoisomerasa I de Promega.

5. MEDIOS DE CULTIVO

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales: Probus, Merck y Difco.

5.1. Medio de cultivo de *S.pneumoniae*

Para el crecimiento de *S.pneumoniae* en medio líquido se utilizó el medio AGCH (Lacks, 1966) suplementado, en el momento de inocular, con 0.3% de sacarosa y 0.2% de extracto de levadura. Cuando fue necesario, se añadieron los antibióticos correspondientes a las siguientes concentraciones finales: tetraciclina (Tc) 1 µg/ml y cloramfenicol (Cm) 1.5-3 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se mezclaron

las células y los antibióticos correspondientes con una capa basal compuesta por AGCH, sacarosa al 0.3%, extracto de levadura al 0.2% y agar al 1%. Una vez solidificada esta capa, se añadió una capa superficial compuesta por AGCH y agar al 0.75%. Dada la complejidad del medio AGCH, se detalla a continuación su composición.

Medio AGCH

Hidrolizado ácido de caseína	5 g
Hidrolizado enzimático de caseína	1 g
L-cisteína-HCl	40 mg
L-triptófano	6 mg
L-asparagina	50 mg
L-glutamina	10 mg
Adenina	5 mg
Cloruro de colina	5 mg
Pantotenato cálcico	1.2 mg
Acido nicotínico	0.3 mg
Piridoxina-HCl	0.3 mg
Tiamina-HCl	0.3 mg
Riboflavina	0.14 mg
Biotina	0.6 mg
K_2HPO_4	8.5 g
$NaC_2H_3O_7$	1.25 g
$NaHCO_3$	0.4 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.5 g
$CaCl_2$	0.6 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.5 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.2 mg
Albúmina bovina (fracción V)	0.5 g
Catalasa	3000 u
Agua destilada y desionizada c.s.p.	l l
pH 7.5	

5.2. Medios de cultivo de *E.coli*

Para el crecimiento de las estirpes de *E.coli* en medio líquido se utilizó normalmente el **medio TY** (Maniatis *et al*, 1982): 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl; suplementado o no, con las concentraciones de antibióticos siguientes: Tc 15 μ g/ml, Cm 15 μ g/ml y ampicilina (Ap) 50-200 μ g/ml. Para el

crecimiento en placa se suplementó el medio TY con agar al 1.5%. Durante la infección de los cultivos con el bacteriófago R408, para la obtención de ssDNA, aquellos se crecieron en **medio TYP** (Promega): 1.6% bacto-triptona, 1.6% extracto de levadura, 0.5% NaCl y 0.25% K_2HPO_4 . Para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E.coli* se utilizaron los medios **Penassay** (Antibiotic-Medium nº 3, Difco) y **SOB** (Hanahan, 1983): 2% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$. En la recuperación de las células, tras la electroporación, se utilizó el **medio SOC** (Bio-Rad): medio SOB suplementado con 20 mM glucosa.

Los cultivos de *E.coli* destinados a la expresión y purificación de proteínas se crecieron en el **medio mínimo M9** (Miller, 1972): 42.3 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 8.5 mM NaCl y 18.7 mM NH_4Cl ; ajustados a pH 7.4 y esterilizados por separado del resto de los componentes: 0.1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgSO_4$, 0.2% glucosa y los antibióticos correspondientes.

5.3 Medio de cultivo de *B.subtilis*

Para el crecimiento en medio líquido de *B.subtilis* se utilizó el **medio TY** (Maniatis *et al*, 1982) suplementado con Tc 10 $\mu g/ml$.

6. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS

De la casa Merck, se emplearon: cloroformo, fenol, etanol, isopropanol, 1-butanol, amoníaco concentrado, formamida, Tris, EDTA, DMSO y TCA. De la casa Sigma, se adquirieron: Cm, Tc, DTT, HEPES, MOPS, tRNA de *E.coli*, DNA de timo de ternera, DNA de esperma de salmón, camptotecina, cloroquina y β NMN. Boehringer Mannheim suministró: Ap, IPTG y los dNTPs no radiactivos. Pharmacia, los Sephadex G-25 y G-50. La agarosa fue suministrada por Pronadisa y Bio-Rad. Esta casa también suministró: acrilamida, bis-acrilamida, heparina-agarosa, TEMED y SDS. El β ME fue de la casa Eastman-Kodak, el PSA de BRL, la Heparina 1% de Laboratorios LEO S.A., el Na-DOC de Difco, el detergente Tween 20 de la casa Janssen y el Octil- β -D-glucopyranósido de la Corporación Calbiochem-Novabiochem. Amersham suministró el material radiactivo y el kit de marcaje en el extremo 3'.

Otros "kits" comerciales utilizados en este trabajo fueron: kit de secuenciación de la DNA polimerasa del fago T7 (Pharmacia); Sistema de mutagénesis *in vitro* (Promega); "GeneClean" y "MERmaid" (BIO 101), para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa y de poliacrilamida; y el kit para determinación de proteínas, BCA (Pierce). Otros productos usados fueron: membranas de nitrocelulosa para la transferencia de DNA (Schleicher & Schuell); filtros para diálisis (Millipore); película fotográfica T-55 (Polaroid), y películas X-Omat S para autorradiografías (Kodak).

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS

El cultivo en medio líquido de *S.pneumoniae* se realizó a 37°C sin agitación, en tubos de tamaño adecuado para mantener las condiciones microaerófilas necesarias para el crecimiento de esta estirpe. Para el cultivo en medio sólido, las células de *S.pneumoniae* se mezclaron con una capa basal de medio y antibiótico, a la cual se agregó una ligera capa superficial de medio. Para el recuento de bacterias se tuvo en cuenta que en *S.pneumoniae* cada u.f.c. contiene una media de cuatro células (López *et al*, 1989). El crecimiento de las estirpes de *B.subtilis* y *E.coli* se realizó a 37°C con agitación vigorosa. En algunas ocasiones, la temperatura de crecimiento de *B.subtilis* se elevó a 45 y 50°C, temperaturas a las que la bacteria crece bien por su condición de microorganismo mesófilo. El cultivo en medio sólido se realizó en superficie sobre placas petri con TY-agar.

El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría usando un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20. Se midieron las absorbancias de los cultivos de *B.subtilis*, *E.coli* y *S.pneumoniae* a las longitudes de onda de 550, 600 y 650 nm respectivamente. Para su conservación, a los cultivos de *S.pneumoniae* y *E.coli* se les añadió glicerol al 10% y se mantuvieron 10 min a 37°C, antes de ser congelados a -70°C. A las células de *B.subtilis* se les añadió DMSO al 5% y se congelaron rápidamente en una mezcla de nieve carbónica y etanol, antes de ser mantenidas a -70°C.

2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes de *S.pneumoniae* se prepararon siguiendo el método descrito por Lacks (1966). Se realizan dos diluciones sucesivas de un cultivo de *S.pneumoniae*, y se deja crecer hasta una $DO_{650} = 0.3$. En este momento, el cultivo se reparte en alícuotas (500 μ l) y se congela a -70°C . Para su transformación, el cultivo competente se diluye 20 veces en AGCH, suplementado con 0.2% sacarosa y 0.001% CaCl_2 , incubándose 20 min a 30°C . La saturación con DNA plasmídico se alcanza alrededor de 0.25 μg . Una vez añadido este DNA, se incuba 40 min más a 30°C . Para permitir la expresión del marcador de selección, el cultivo se mantiene 90 min a 37°C antes de proceder a la siembra en placa para seleccionar los transformantes. Dado que los genes de resistencia a Cm (*cat*) empleados en este trabajo derivan de pC194, y son inducibles por Cm, los últimos 20 min de expresión se realizaron en presencia de una concentración subinhibitoria del antibiótico (0.05-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para preparar las células competentes de *E.coli* se siguieron los métodos de Hanahan (Hanahan, 1983) y Kushner (Kushner, 1978). En ambos casos, se transformó con un máximo de 0.2 μg de DNA, correspondientes a 1/20 del volumen de células utilizado. Sólo en el caso de usar el método de Hanahan las células competentes se pudieron conservar a -70°C . En algunos casos, las células de *E.coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito por Dower (Dower *et al*, 1988) y utilizando el aparato "Gene Pulser" acoplado a un controlador "Pulse Controller" de Bio-Rad. Para preparar las células de *E.coli* para la electro-transformación se inocularon 100 ml de medio con 1/100 de volumen de un cultivo muy crecido, y se permitió su crecimiento a 37°C con agitación vigorosa hasta una $DO_{600} = 0.5$. El cultivo se enfrió en hielo durante 30 minutos y las células fueron recogidas por centrifugación (15 min, 4°C , 4000 x g). Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría, centrifugándolas de la misma forma. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células suavemente en 2 ml de glicerol al 10% frío. Se realizó una nueva centrifugación (15 min, 4°C , 2000 x g) y las células se resuspendieron con mucha suavidad en 0.25 ml de glicerol al 10% frío. La concentración final de células fue aproximadamente de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. El cultivo se repartió en alícuotas (200 μ l) que se congelaron a -70°C . Para su transformación las células se mezclaron con 1

ó 2 μ l de DNA (7.5-10 μ g/ml). Las condiciones del electroporador fueron las siguientes: 25 μ F, 2.5 kV y 200 Ω . Las células se diluyeron en 1 ml de SOC y se incubaron a 37°C durante 1 h, antes de ser extendidas en placas con un medio selectivo para aislar los transformantes.

3. PREPARACIONES DE DNA

3.1. Preparaciones de DNA total

Se utilizó para analizar de modo rápido el contenido plasmídico de los clones en estudio, y para determinar por densitometría el número de copias plasmídico (N) en las estirpes analizadas.

Para *S.pneumoniae* se empleó el procedimiento de Stassi *et al* (1981): las células de un cultivo crecido a $DO_{650} = 0.4$ (1.5 ml) se sedimentaron por centrifugación y resuspendieron en 100 μ l de solución de lisis (25% sacarosa, 0.15 M citrato trisódico, 0.01% SDS, 0.1% Na-DOC, 25 μ g/ml RNasa A). Se incubó 10 min a 30°C y se añadió SDS (1%, concentración final). Los lisados se mezclaron vigorosamente y se congelaron (-70°C) y descongelaron (37°C) cuatro veces, favoreciendo así la rotura del DNA cromosómico. Se añadió proteinasa K (230 μ g/ml) y se dejó actuar 20 min a 37°C. Se añadieron 50 μ l del colorante de carga CEC(3x) [0.02% azul de bromofenol (BFB), 50% glicerol, 2.5 mM EDTA], y se almacenaron a -70°C hasta la electroforesis.

En el caso de *E.coli* (Espinosa *et al*, 1982), las células de resuspendieron en 25 μ l de solución de lisis (4 mg/ml lisozima, 25% sacarosa, 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 μ g/ μ l RNasa A) y se incubó 10 min a 37°C. Se añadió 1% SDS y se mezcló vigorosamente antes de congelar-descongelar cuatro veces. Se añadió proteinasa K a 250 μ g/ml y se dejó actuar 10 min a t.a. Se añadieron 15 μ l del colorante de carga CEC(3x) y se procedió a la electroforesis. Para *B.subtilis*, los extractos totales se realizaron como en el caso de *E.coli*, aunque aumentando cuatro veces las cantidades de reactivos utilizados para el mismo volumen de células.

3.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico

La preparación de DNA plasmídico de *E.coli* a pequeña escala, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Birboim y Doly (1979), basado en una

desnaturalización alcalina y posterior precipitación del DNA cromosómico. En el caso de *S.pneumoniae* se siguió el mismo método incluyendo las modificaciones descritas por Stassi *et al* (1981). En alguna ocasiones, para *E.coli* se siguió el método de lisis alcalina descrito por le Gouill *et al* (1994), elegido por su rapidez y sencillez para el análisis inicial de un gran número de transformantes.

3.3. Preparación de plásmidos puros

Para la preparación de DNA plasmídico de *E.coli* y *S.pneumoniae* a gran escala, se utilizó el método de Currier y Nester (1976). La diferencia entre los dos microorganismos se encuentra básicamente en el procedimiento de lisis celular empleado:

La lisis de *E.coli* se llevó a cabo resuspendiendo las células en una solución de lisis (2mg/ml lisozima, 20% sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) e incubándolas 10 min a 37°C. Después de añadió EDTA (0.1 M, concentración final) y se mantuvo en hielo 10 min. La lisis clara se consiguió añadiendo una solución de SDS en TE(10:1) (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), hasta alcanzar una concentración final de SDS al 5 %, e incubando a 37°C durante 10 min.

Para la lisis de *S.pneumoniae*, las células se resuspendieron en 60 mM EDTA junto con la solución de lisis (25% sacarosa, 0.15 M citrato trisódico, 0.1% Na-DOC, 0.01% SDS). Se incubó a 37°C durante 5 min; se añadió pronasa (concentración final, 0.7 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 10 min. La lisis clara se obtuvo añadiendo una solución de SDS en TE(10:1), dejándolo a una concentración final de SDS del 1.2%.

Una vez obtenida la lisis clara, se siguió el protocolo descrito por los autores, realizando dos gradientes sucesivos de CsCl para asegurar una separación y eliminación completa del DNA cromosómico. La estimación de la pureza del DNA obtenido se obtuvo de la relación entre los valores de absorbancia a las longitudes de onda 258 y 280 nm. La contaminación con proteínas o fenol se reflejaría en un valor de la relación < 2 . La concentración del DNA se calculó midiendo la absorbancia (A) de la muestra a una longitud de onda de 258 nm, teniendo en cuenta que un valor de absorbancia igual a 1 corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dsDNA.

4. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS DEL DNA

El tratamiento del DNA con enzimas de restricción se realizó en las condiciones de tampón y temperatura recomendadas por las casas comerciales suministradoras. Otras modificaciones enzimáticas del DNA se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones descritas por Sambrook *et al* (1989). Cuando fue posible los enzimas se inactivaron por calor y en la mayoría de los casos, se llevó a cabo una desproteización de las muestras por tratamiento con una mezcla (1:1) de fenol saturado en TE(10:1) y de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Por centrifugación, se separó la fase acuosa que contiene el DNA y se procedió a su precipitación con 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico, pH 7.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Si la cantidad de DNA era inferior a 2 μg , se añadieron 5 μg de tRNA como coprecipitador. La mezcla se mantuvo durante 30 min a -70°C o durante toda la noche a -20°C , y se sedimentó por centrifugación a -10°C , 15 min. Para eliminar las sales que podrían haber coprecipitado con el DNA, se realizó un lavado con etanol al 70% y se centrifugó a -10°C , 10 min. El DNA sedimentado se secó bajo vacío para evaporar los restos de etanol de la muestra y se resuspendió en TE(10:1).

Muchas veces, las muestras de DNA se dializaron en filtros tipo VS de Millipore (tamaño del poro 0.025 μm) frente al mismo tampón TE(10:1) o al tampón adecuado para realizar una nueva digestión.

5. ELUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema "GeneClean" (BIO 101 Inc.), siguiendo las instrucciones de sus fabricantes. Normalmente, se utilizaron geles de agarosa al 0.8%; aunque este porcentaje se aumentó en el caso de extracción de fragmentos de un tamaño similar entre sí, con el fin de conseguir una mayor resolución en la separación.

Cuando los fragmentos de DNA eran pequeños (<200 pb) se llevó a cabo su extracción a partir de geles de poliacrilamida (PAA) al 5%, según el procedimiento de Maxam y Gilbert (1980). En este caso se troceó la banda de PAA y se sumergió en el tampón de elución (0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA). Se

incubó a 42°C toda la noche. El DNA se eluyó y se eliminaron los restos de PAA pasando las muestras a través de una columna de lana de vidrio. Se cambió el tampón de la muestra pasándola a través de una columnilla de Sephadex G-25 equilibrada en TE(10:1) y, cuando fue necesario, la muestra se concentró con un volumen de 1-butanol, descartando la fase superior hasta alcanzar el volumen deseado.

6. PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La mayoría de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por el servicio de Química de Proteínas del CIB. Los oligos se entregaron unidos a una resina, de la cual eran recuperados por un tratamiento con 32% NH₃ e incubación durante 14 horas a 50°C. Se eliminó el amoníaco por evaporación a vacío y se resuspendió el oligo en TE(10:1), purificándolo posteriormente mediante una columna de Sephadex G-50 o G-25 (para oligos menores de 16 nucleótidos). En algunas ocasiones, con el objeto de eliminar las moléculas truncadas o de síntesis incompleta, se retuvo el grupo tritilo de la última base incorporada y se purificaron los oligos utilizando los cartuchos para purificación de oligonucleótidos OPC de Applied Biosystems, para su detritilación.

Para la extracción de oligonucleótidos marcados a partir de geles de PAA se utilizó el sistema "MERmaid" (BIO 101 Inc.). Cuando los ensayos requerían una mayor pureza de los oligonucleótidos, estos fueron purificados por HPLC por el servicio de Química de Proteínas del CIB, usando una columna Vydac C-18 (4.5 x 15 cm) de la casa The Separation Group, con un tamaño de partícula de 5 μm y 30 nm de tamaño de poro. El flujo fue de 1 ml/min y se utilizaron las soluciones A (5% acetonitrilo en 0.1 N TEAA, pH 7.0) y B (40% acetonitrilo en 0.1 N TEAA, pH 7.0). Los oligos fueron posteriormente detritilados: para ello, se evaporaron las muestras y se resuspendieron en ácido acético al 80%, incubándolas 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se volvieron a evaporar o se pasaron por una columna de Sephadex G-50, lavándolas a continuación, varias veces con agua destilada.

Los oligonucleótidos tio-derivados fueron sintetizados y purificados por el Dr. Ramón Eritja en el European Molecular Biology Laboratory. Se purificaron por

HPLC con las condiciones descritas por Mizuuchi y Adzuma (1991): columna C-18, cargando la muestra en 10% acetonitrilo, 90% 50 mM acetato de amonio/agua y eluyendo los oligonucleótidos con 30% acetonitrilo. De esta forma se pueden separar las dos configuraciones del oligonucleótido fosforotioato: la forma S_p del diastereoisómero migra más rápido que la forma R_p .

En todos los casos, la concentración de los oligonucleótidos se calculó midiendo la absorbancia a 258 nm y teniendo en cuenta que una $A_{258} = 1$ corresponde a 33 $\mu\text{g/ml}$ de ssDNA.

7. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Para la secuenciación de mutaciones en el DNA, se siguió el método de terminación de cadena de Sanger (Sanger *et al*, 1977), utilizando el "kit" comercial de Pharmacia LKB con la DNA polimerasa del fago T7 y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Como DNA molde se usaron aproximadamente 2 μg de una minipreparación plasmídica, desnaturalizados por álcali. Como cebadores se usaron oligos de 17 nt y la relación cebador:molde usada fue de 10:1.

8. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La introducción de sitios de restricción en el *dso* de pLS1 o las mutaciones puntuales realizadas en el gen *rep* de pLS1, se llevaron a cabo utilizando el sistema de mutagénesis dirigida *in vitro* de Promega. El sistema se basa en la utilización de un vector único, pALTER-1. Este fagémido contiene el *ori* del fago f1 y dos genes de resistencia a antibióticos: el gen de resistencia a Tc (*tet*) que es siempre funcional, y el gen de resistencia a Ap (*bla*) que ha sido inactivado. El oligo mutagénico se anilla al ssDNA molde junto con un oligo que restaura la Ap^r en la hebra mutante durante la reacción de mutagénesis. Se sintetiza la hebra mutante usando la DNA polimerasa y la DNA ligasa del fago T4. A continuación, se realizan dos rondas sucesivas de transformación: primero, se utiliza una estirpe de *E.coli* deficiente en el sistema de reparación de bases erróneas (BMH71-18*mutS*), la cual suprime *in vivo* la reparación del error mutagénico, introducido en el gen *bla* y en el fragmento de DNA deseado.

Después, se realiza una segunda ronda de transformación en la estirpe JM109, para asegurar la segregación de los plásmidos mutantes.

El procedimiento seguido fue el siguiente: el fragmento de DNA a mutagenizar se clonó en el sitio de clonaje múltiple del vector pALTER-1 y se transformó la estirpe JM109. El DNA molde para la reacción de anillamiento con los oligos mutagénicos se obtuvo mediante dos formas distintas: a) infección del cultivo JM109/pALTER recombinante con el fago R408 para la obtención de ssDNA, usando una multiplicidad de infección (m.o.i., nº partículas de fago/célula) de 10; el DNA fágico junto con el DNA del fagémido recombinante fue precipitado según las instrucciones de Maniatis *et al* (1982); b) obtención del DNA plasmídico según Birboim y Doly (1979) y su desnaturalización por álcali. Por lo general, la reacción de mutagénesis se llevó a cabo anillando 0.1 pmol de ssDNA o dsDNA desnaturalizado con 0.5 pmol del oligo reparador de Ap fosforilado y 2.5 pmol del oligo mutagénico fosforilado. En cualquier caso, se mantuvieron unas relaciones oligo:molde de 5:1 para el oligo reparador de Ap y de 25:1 para el oligo mutagénico. La hebra mutante se extendió con la DNA polimerasa del fago T4 y se selló con la DNA ligasa del fago T4. Con el DNA así sintetizado se transformó la BMH71-18*mutS* siguiendo el método de Hanahan (1983) o mediante electroporación (Dower *et al*, 1988). Se seleccionaron los transformantes Ap^r por crecimiento en presencia de este antibiótico y se obtuvo el DNA por el método de Birboim y Doly (1979). Se transformó la estirpe JM109 para asegurar la segregación de los fagémidos mutantes. Posteriormente, la presencia de la mutación deseada se comprobó por secuenciación del fragmento de DNA correspondiente.

9. ELECTROFORESIS DE DNA

9.1. Geles de agarosa

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales con una concentración de agarosa variable entre 0.8 y 1.5%, dependiendo del tamaño del DNA a analizar. La agarosa se disolvió en tampón de electroforesis TAE (40 mM Tris base, pH 8.1, 20 mM ácido acético, 2 mM EDTA) o TBE (89 mM Tris base, pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA). A las muestras se les añadió

tampón de carga BXGE (0.025% BFB, 0.025% xilencianol, 6% glicerol, 1 mM EDTA) o CEC(1x). Las dimensiones de los geles, la duración de la electroforesis y las condiciones de voltaje variaron según las características del DNA a analizar. Los geles fueron teñidos en tampón TAE o TBE usado para la electroforesis añadiéndole bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 min a t.a. En algunos casos, el EtBr se incluyó en la preparación del tampón y en el gel de agarosa, obteniéndose así la tinción del DNA durante la electroforesis. El DNA se visualizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV) de onda larga (360 nm) o de onda corta (254 nm).

9.2. Geles de poliacrilamida nativos

Para la electroforesis de fragmentos de DNA pequeños (50-500 pb) se utilizaron geles verticales no desnaturizantes de 5% poliacrilamida (PAA; 30% acrilamida:0.8% bisacrilamida) en tampón TAE, polimerizando con 0.05% TEMED y 0.1% persulfato amónico (PSA). Las dimensiones de los geles variaron según el volumen de las muestras a analizar y la resolución de los fragmentos que se pretendía. Los geles grandes fueron de 14.5 cm de ancho, 12 cm de largo y 1 mm de espesor. Los geles pequeños se prepararon utilizando las cubetas "Mini-protean" de Bio-Rad y sus dimensiones fueron: 8.4 cm de ancho, 7.2 cm de largo y 0.75 mm de espesor. Para la electroforesis, las muestras se prepararon y tiñeron como en el apartado anterior, utilizando el tampón de carga BXGE. Para analizar las diferencias en la movilidad electroforética de un oligonucleótido mono- y bicatenario de 23 nt marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ en su extremo 5', se realizó un gel grande de 20% PAA, en tampón TAE, añadiendo 0.05% TEMED y 0.1% PSA. Las muestras se prepararon con tampón BXGE y se visualizaron por exposición autorradiográfica usando pantallas amplificadoras.

9.3. Geles de agarosa alcalinos

Este tipo de geles se preparó siguiendo el método descrito por Sambrook *et al* (1989), modificado por la Dra. P. López. Se prepara un gel de agarosa al 0.8% en agua y se deja enfriar a 60°C antes de añadirle la solución alcalina (50 mM NaOH, 1 mM EDTA). Las muestras se diluyen 1:1 con colorante para geles desnaturizantes 2x (100 mM NaOH, 10 mM EDTA, 6% ficoll, 0.025% verde de bromocresol, 0.5%

xilencianol). El tampón de electroforesis contiene 50 mM NaOH y 1 mM EDTA. La electroforesis se realiza a un voltaje constante bajo (30-40 V) ya que este tipo de geles presenta el problema de una gran resistencia. En parte, esto se puede solucionar realizando la electroforesis a 4°C y/o con recircularización del tampón. Tras la electroforesis, el gel se sumerge en una solución de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl) durante 30 min a t.a. Para visualizar el DNA, se sumerge el gel en tampón TAE con EtBr (1 µg/ml), 30 min a t.a., y se observa en un transiluminador UV de 254 nm. Si se quiere transferir el DNA a filtros de nitrocelulosa, se vuelve a sumergir el gel en la solución de neutralización durante otros 30 min, antes de hacer la transferencia.

9.4. Geles mixtos de agarosa-acrilamida

Este tipo de geles son adecuados para el análisis de complejos DNA-proteínas o de curvaturas en el DNA. La preparación de estos geles se realizó siguiendo el método descrito por Peacock y Dingman (1968). Son geles verticales de 1.8% acrilamida-0.5% agarosa, polimerizándose con 0.02% TEMED y 0.1% PSA. Sus dimensiones fueron de 14 cm de ancho, 16 cm de largo y 3 mm de espesor. La electroforesis se realizó a t.a. en tampón TAE.

9.5. Geles mono- y bidimensionales con cloroquina

Para la separación de topoisómeros de una preparación de DNA plasmídico puro se realizaron geles de agarosa con cloroquina como agente intercalante del DNA.

Los geles monodimensionales se realizaron según Bhriain y Dorman (1993). Se prepararon geles de agarosa al 1% con 2 µg/ml de cloroquina. La electroforesis se realizó en tampón TBE, a un voltaje constante de 2.7 V/cm, a t.a. y protegido de la luz. La cloroquina se eliminó mediante lavados exhaustivos con agua destilada y los geles se tiñeron con 5 µg/ml EtBr durante 1 h, lavándolos posteriormente después con agua destilada para eliminar el fondo de EtBr.

Para la separación de topoisómeros positivos y negativos, se realizaron geles bidimensionales tomando como referencia el trabajo de Chen *et al* (1994). La primera dimensión se realizó en geles de agarosa al 0.8% con 1.5 µg/ml de cloroquina en

tampón TBE. Para la segunda dimensión, se cortó la tira de gel que llevaba la muestra y se giró 90° en otra cubeta, la cual se rellenó con una preparación de agarosa al 1% con 15 µg/ml de cloroquina. El tampón de electroforesis fue TBE con cloroquina 15 µg/ml. Tras la segunda electroforesis, los geles se lavaron con agua destilada y se tiñeron con EtBr (1 µg/ml) durante 1 h, lavándolos a continuación con agua destilada antes de ser visualizados con un transiluminador UV de onda corta (254 nm).

9.6. Geles de secuenciación

Los productos de las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis en geles de 8% PAA (38% acrilamida:2% bisacrilamida), con 7 M urea, polimerizando con 0.05% TEMED y 0.06% PSA, en tampón TBE. Los productos de reacción en los ensayos de actividad de la proteína RepB con oligonucleótidos, se analizaron en geles de 20% PAA (38% acrilamida:2% bisacrilamida), con 8 M de urea, 0.02% TEMED y 0.06% PSA, en tampón TBE. Para los análisis de los oligonucleótidos con nucleasa P1 o PDE, se utilizaron geles de 24% poliacrilamida con urea al 50% (8.3 M).

En todos los casos, las dimensiones de los geles fueron 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0.35 mm de espesor. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga BXF (80% formamida desionizada, 10 mM NaOH, 0.1% BFB, 0.1% xilencianol, 1 mM EDTA) y se desnaturalizaron por calor durante 3 min a 85°C, enfriándolas rápidamente a 4°C. Se realizó una pre-electroforesis a 1800 V durante 1 h. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 1900 ó 2000 V.

10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICO

La determinación del número de copias plasmídico (N) en un huésped concreto y a unas condiciones dadas, se basó fundamentalmente en el método descrito por Projan *et al* (1983), con las modificaciones descritas por del Solar y Espinosa (1992). Se prepararon extractos de DNA total de los cultivos a analizar y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con tampón TAE. Los geles se tiñeron 30 min a t.a. con 1 µg/ml EtBr, y fueron lavados con agua destilada durante otros 30

min, para eliminar la fluorescencia de fondo. Los geles se expusieron a un transiluminador UV de onda corta, y se tomaron varias fotografías con diferentes tiempos de exposición, utilizando películas T-55 de Polaroid. La cuantificación densitométrica de las bandas de DNA, se realizó utilizando unas veces el densitómetro LKB Ultrosan 2202 acoplado a un ordenador Apple II y, más recientemente, un densitómetro 400, usando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

Debido a que el grupo planar del EtBr se intercala mejor en las formas lineales y circulares abiertas (OC o FII), que en formas circulares covalentemente cerradas (CCC o FI), fue necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo del número de moléculas de DNA plasmídico por equivalente cromosómico. Este factor de corrección fue estimado por Projan *et al* (1983) en 1.36. De esta manera, el valor de N se calculó:

$$N = \frac{(D_{p_1} + 1.36 D_{p_2}) \times M_c}{D_c \times M_p}$$

siendo D_{p_1} y D_{p_2} , los valores determinados por densitometría a las bandas correspondientes a las formas OC y CCC del plásmido; M_c , es el tamaño del DNA genómico, estimado en 3×10^6 pb para las tres especies bacterianas en estudio (Lacks *et al*, 1986); D_c , es el valor determinado por densitometría para la banda de DNA genómico; y M_p , es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

11. ENSAYOS DE ESTABILIDAD E INCOMPATIBILIDAD PLASMÍDICAS

11.1 Ensayos de estabilidad

Se realizaron según el método descrito en del Solar *et al* (1987b). Se partió de un cultivo inicial crecido hasta una $DO_{650} = 0.4$ en medio selectivo, al cual se le consideró la generación de partida ($g=0$). A partir de aquí, se realizaron diluciones sucesivas en una proporción 1:10³, en un medio sin presión selectiva hasta alcanzar de nuevo la $DO_{650} = 0.4$ (unas 10 generaciones). En general, se realizaron estos

ensayos por un período de 60 generaciones. Cada 10 generaciones se tomaron muestras del cultivo y se analizó: i) contenido de DNA plasmídico mediante preparaciones de DNA total, y ii) porcentaje de células con plásmido, mediante diluciones apropiadas de las muestras y cultivo en placas con y sin presión selectiva.

La tasa experimental de pérdida del plásmido por célula y generación (L_{ex}) se calculó a partir de la ecuación:

$$L_{ex} = 1 - (P/P_0)^{1/n}$$

siendo P_0 , la frecuencia inicial de células con plásmido y P , la frecuencia de células con plásmido tras crecer el cultivo n generaciones en un medio sin presión selectiva.

11.2 Ensayos de incompatibilidad

Dos plásmidos que comparten regiones implicadas en su replicación o control, son incapaces de coexistir en la misma célula huésped. Para realizar los ensayos de incompatibilidad, se empleó el test de Tipo I, según el método descrito por Nordström *et al* (1980a, 1980b). En este tipo de test, cultivos competentes de *S.pneumoniae* que llevan el plásmido de interés (residente) se transforman con un segundo plásmido (donador), que lleva un marcador de selección distinto al del plásmido residente. Para estudiar la posible incompatibilidad ejercida por el plásmido donador sobre el residente, se selecciona siempre para el marcador del plásmido donador. Los transformantes se aislaron en placas con el antibiótico marcador del plásmido donador y se crecieron en medio líquido hasta una $DO_{650} = 0.5$. En este momento, se tomaron muestras para analizar el contenido de DNA plasmídico y para calcular el porcentaje de células resistentes al primer marcador, y que por tanto, conservarían el plásmido residente. Se ha estimado que son necesarias unas 25 generaciones para que una u.f.c. dé lugar a una colonia de tamaño medio, y que transcurren unas 12 generaciones hasta que la colonia inoculada en el medio líquido da lugar a un cultivo con una $DO_{650} = 0.5$. Por ello, en este caso se analizan los efectos del plásmido donador sobre el residente, tras 37 generaciones sin presión selectiva para éste. Cuando se deseaban conocer los efectos en generaciones posteriores, los cultivos de los transformantes iniciales se diluyeron sucesivamente en medio con presión selectiva para el plásmido

donador. Se analizó el contenido de DNA plasmídico y se determinó el porcentaje de células que conservaban el plásmido residente.

En algunas ocasiones se deseaba conocer el efecto que ejercía la presencia del plásmido residente sobre el número de copias del plásmido donador. En estos casos se empleó el test Tipo II (Nordström *et al*, 1980a, 1980b), que consiste en seleccionar los transformantes con el marcador del plásmido donador en medio sólido y en un medio líquido inicial. A partir de aquí, los cultivos se diluyen sucesivamente en medio con presión de selección para el plásmido residente o en ausencia de presión selectiva, se realiza un análisis del contenido de DNA plasmídico y se calcula el porcentaje de células que contienen el plásmido donador.

12. MARCAJE RADIOACTIVO DEL DNA

12.1 Preparación de sondas radiactivas

Las sondas del DNA se prepararon realizando el marcaje del DNA con hexanucleótidos al azar, según el método de Feinberg y Vogelstein (1983).

El DNA plasmídico (1 μ g aproximadamente) que iba a servir de DNA molde se desnaturalizó por calor (10 min, 95°C) y se enfrió rápidamente. La reacción se realizó en 20 μ l, en presencia de 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTE (ditioeritritol), 0.2 mg/ml BSA, 30 μ Ci de [α -³²P]dCTP (actividad específica de 5000 Ci/mmol), mezcla de los dNTPs restantes a 75 μ M, 2.2 μ g de hexanucleótidos pd(N)₆ y 1 u de Pol IK. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C, y la reacción se paró por adición de 20 mM EDTA y 8 μ g de DNA de timo ternera. La eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado al DNA se hizo pasando la muestra por una columnilla de Sephadex G-50 equilibrada en TE(10:1). Las sondas se hirvieron durante 10 min, seguidas de un enfriamiento rápido antes de ser utilizadas.

12.2. Marcaje de fragmentos de DNA en 3'

Para este tipo de marcaje se emplearon fragmentos de DNA con extremos 5' protuberantes, cuyos tamaños oscilaron entre 50 y 1600 pb. La mezcla de reacción contenía 0.5-5 μ g de DNA en 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM β ME,

50-80 μCi del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) que se deseaba incorporar y 10 u de Pol IK. Se realizó una incubación de 15 min a t.a. y se añadió una mezcla de dNTPs a 60 μM , incubándose 5 min a t.a. El DNA fue posteriormente sometido a tratamiento con fenol:cloroformo y precipitación con etanol.

12.3. Marcaje de oligonucleótidos en 5'

El marcaje de oligonucleótidos en el extremo 5' se realizó utilizando la T4 PNK, tomando como base el método descrito por Sambrook *et al* (1989). Generalmente, la mezcla de reacción contenía 1 nmol de un oligonucleótido (cuyo longitud oscilaba entre 8 y 26 nt) en 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM βME , 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) y 10 u del enzima. Se realizó una incubación de 45 min a 37°C y se paró la reacción con 34 mM EDTA. Para la eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado, la mezcla se trató con fenol:cloroformo y posterior precipitación con 4 M acetato amónico y 2.5 volúmenes de etanol, seguido por un lavado con etanol al 80%.

12.4. Marcaje de oligonucleótidos en 3'

El marcaje de oligonucleótidos en el extremo 3' se llevó a cabo utilizando el kit de marcaje en 3' de Amersham. La mezcla de reacción contenía 1 nmol de oligonucleótido (longitud entre 8 y 23 nt) en el tampón cacodilato: cacodilato sódico, cloruro de cobalto, DTT, pH 7.2; 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$ (actividad específica de 5000 Ci/mmol) y 10 u de la transferasa terminal. Se realizó una incubación de 1 h a 37°C. En algunos casos, la eficiencia del marcaje se mejoró añadiendo 5 u más del enzima y prolongando la incubación 1 h más. La reacción se paró añadiendo 42 mM EDTA. La eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado se realizó como en el apartado anterior.

13. TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NITROCELULOSA

La transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa se basó en el método descrito por Southern (1975). Para la transferencia del DNA a partir de geles de agarosa no alcalinos, se realizó un tratamiento previo de desnaturalización: hidrolización parcial por inmersión de los geles en 0.12 M HCl durante 15 min. Después, los geles se

lavar con agua destilada y se sumergieron 40 min en la solución Soak I (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl). Los geles se volvieron a lavar con agua destilada y se sumergieron otros 40 min en la solución de neutralización Soak II (3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2). Los geles alcalinos, en los cuales el DNA ya estaba desnaturalizado, se sumergieron directamente en la solución de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 M NaCl).

A continuación, el gel se colocó sobre papel Whatman 3MM, cuyos bordes estaban en contacto con una solución SSC(10x) [1.5 M NaCl, 0.15 M citrato trisódico]. Se colocó encima del gel un filtro de nitrocelulosa humedecido en SSC(10x), tres papeles Whatman 3MM y una pila de servilletas de papel. Se puso un peso encima para favorecer el contacto entre las distintas capas de papel y se permitió la transferencia a t.a. durante 14 h. Tras este período, el filtro se secó a 37°C y se mantuvo 2 h a 80°C. Para su hibridación, el filtro de nitrocelulosa se sumergió en un tampón que contenía 50% formamida, 5 mM EDTA, 0.9 M NaCl, 48 mM fosfato sódico, pH 6.8, 0.1% SDS, 100 µg/ml DNA de esperma de salmón (o de timo de ternera) desnaturalizado, solución Denhart's 1x (preparada según Maniatis *et al*, 1982) y la sonda de DNA marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada por calor 10 min a 95°C. La hibridación se llevó a cabo a 37°C durante 12-14 h. Posteriormente, se lavaron los filtros con las soluciones I (50% formamida, 2 mM EDTA, 20 mM fosfato sódico, pH 6.8, 0.36 M NaCl, 0.1% SDS) y II (0.1 mM EDTA, 1 mM fosfato sódico, pH 6.8, 18 mM NaCl, 0.1% SDS). Para finalizar, se secaron los filtros a 37°C y se expusieron a una película autorradiográfica.

14. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles desnaturalizantes de PAA (30% acrilamida:0.8% bisacrilamida) a concentraciones variables entre 10 y 16%, en 0.375 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 0.06% TEMED y 0.06% PSA. Los geles se prepararon empleando las cubetas Mini-Protean de Bio-Rad. Las dimensiones de los geles fueron las descritas anteriormente. La electroforesis se realizó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM glicina, 0.1% SDS y 2 mM EDTA, a un voltaje constante de 200 V. Las muestras se prepararon para la electroforesis añadiéndoles el tampón de carga

SLB (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1% SDS, 2 mM EDTA, 5% β ME, 10% glicerol, 0.2 mg/ml BFB) e incubándolas a 95°C durante 3 min, antes de ser cargadas en el gel.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de azul brillante de Coomasie (CBB) al 0.25% en una mezcla de agua:metanol:ácido acético glacial (4:5:1) durante 40 min a t.a. El exceso de colorante se eliminó sumergiendo los geles durante 1 h en una solución de ácido acético:metanol (7.5% : 45%), pasándolos a continuación a una solución de ácido acético:metanol (7.5% : 5%) durante 14 h a t.a. En ocasiones, la tinción de los geles se realizó a 50°C. En estos casos, se utilizó una solución de CBB al 0.05% en una mezcla de agua:isopropanol:ácido acético glacial (6.5:2.5:1) durante 40 min; para desteñir los geles se usó ácido acético al 10% durante 1 h a 50°C.

15. HIPEREXPRESIÓN DE GENES BAJO EL PROMOTOR ϕ 10 DEL FAGO T7 Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para la **hiperexpresión específica de genes clonados bajo el promotor ϕ 10 del fago T7**, se utilizó el sistema de clonaje vector pET5/huésped BL21(DE3) descrito por Studier y Moffatt (1986).

La estirpe BL21(DE3) contiene un profago defectivo del fago λ que lleva el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*. El vector pET5 contiene el promotor ϕ 10, el cual es reconocido específicamente por la RNA polimerasa de T7; y bajo ese promotor se clona el gen que se quiere expresar. La adición de IPTG al sistema induce el promotor *lacUV5*, activándose de esta forma la síntesis de la RNA polimerasa del fago T7. Esta enzima promueve la transcripción a partir del promotor ϕ 10, expresándose así el gen de interés. Si añadimos rifampicina (Rif) se inhibirá la RNA polimerasa del huésped, pero no la del fago, con lo cual conseguiremos una expresión específica de nuestro gen. En algunos casos, se utilizó como vector el fagémido pALTER-1, el cual también contiene el promotor ϕ 10. Con cualquiera de los dos vectores, el marcador de selección utilizado fue Ap.

La **funcionalidad del sistema**, establecido por Studier, se podría ver afectada en tres casos: 1) por la presencia de genes clonados en el vector que diesen lugar a productos tóxicos para las bacterias; 2) por pérdida del plásmido y 3) por el hecho de que la β -lactamasa codificada por el vector, en cultivos suficientemente crecidos, puede degradar cierta cantidad de Ap del medio, favoreciendo con ello, el crecimiento de células sin plásmido. Para comprobar la eficacia del sistema se determinó el porcentaje de células con plásmido y de células en las que el sistema era funcional, de la siguiente forma:

El porcentaje de células con plásmido se determinó como:

$$\frac{\text{u.f.c. en medio TY con Ap}}{\text{u.f.c. en medio TY}} \times 100$$

El porcentaje de células que carecen de sistema funcional, o sea, aquellas células que pueden crecer en presencia de IPTG, bien porque hayan perdido el plásmido o porque son mutantes que carecen de capacidad para expresar el gen clonado, se determinaron como:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con } 125 \mu\text{M IPTG}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

El porcentaje de mutantes que conserven el plásmido pero sean incapaces de expresar el gen clonado, y que por tanto, crecerán en presencia de Ap y de IPTG, se determinó como:

$$\frac{\text{u.f.c. en TY con Ap e } 125 \mu\text{M IPTG}}{\text{u.f.c. en TY}} \times 100$$

Para la expresión de un determinado gen, se preparó un preinóculo de la estirpe BL21(DE3) con el plásmido recombinante de interés, en el medio M9 con Ap. Se incubó a 37°C con agitación y se permitió el crecimiento hasta una $DO_{650} = 0.3$. Seguidamente, el cultivo se diluyó 20 veces en el mismo medio y se dejó crecer hasta alcanzar una $DO_{650} = 0.45$. En este momento, se indujo el sistema por adición de 1 mM IPTG y se incubó 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió Rif (200 $\mu\text{g/ml}$) al cultivo y se incubó durante 90 min más a 37°C.

Para la **expresión de proteínas totales**, se recogieron las células por centrifugación (10 min, 4°C, 8200 x g) y se resuspendieron en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 2 mM EDTA, 1% β ME, 1% glicerol. Se calentaron las muestras 3 min a 95°C y se les añadió el colorante de carga SLB. Las muestras se analizaron en un gel de SDS-PAA al 10 o 12%.

16. PRECIPITACIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de las muestras proteicas se llevó a cabo por precipitación con acetona o TCA. En el primer caso, a la muestra se le añaden 5 volúmenes de acetona fría y se incuba 15 min a -20°C. El precipitado se recoge por centrifugación a 11200 x g durante 10 min a -15°C, se disuelve directamente en el tampón de carga SLB y se hierve durante 3 min antes de ser analizado por SDS-PAGE. La precipitación con TCA se realiza añadiendo a la muestra 0.03% Na-DOC y 10% TCA, se mantiene durante 1 h a 0°C y se recoge el precipitado por centrifugación a 9600 x g, durante 20 min a 0°C. Después, se disuelve con SDS al 5% y se añade el tampón SLB; si es necesario se ajusta el pH de la muestra con NaOH. El análisis se realiza mediante SDS-PAGE.

La concentración de proteínas de una muestra se valoró mediante el reactivo BCA (Pierce) siguiendo el protocolo estándar recomendado por la casa suministradora. Se preparó una curva patrón de seroalbúmina bovina entre 0.2 y 1.2 mg/ml.

17. PURIFICACIÓN DE RepB

La purificación de la proteína RepB se realizó, esencialmente, siguiendo el método descrito en el trabajo de la Campa *et al* (1990), con algunas modificaciones. Se preparó un preinóculo de *E.coli* BL21(DE3) con el plásmido pLS19 en 50 ml de M9 con 200 $\mu\text{g/ml}$ Ap y se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{650} = 0.3$. Se realizó una dilución 1/100 en 2 l de medio M9 con 200 $\mu\text{g/ml}$ Ap, y se incubó a 37°C hasta que al cultivo alcanzó una $\text{DO}_{650} = 0.45$. En este momento se añadió 1 mM IPTG y se incubó 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió Rif (200 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó el cultivo 90 min más a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación a 10800 x g durante 35 min, se lavaron con el tampón H (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% EG) suplementado con 150 mM KCl y se resuspendieron en 20 ml de ese mismo tampón. La lisis celular se llevó a cabo pasando la suspensión dos veces por una prensa French a una presión de 8.3 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 30 min a 10000 x g.

Para la precipitación de los ácidos nucleicos, al sobrenadante se le añadió gota a gota una solución de sulfato de estreptomicina (Sm) al 25% (6 ml), mientras la mezcla se agitaba a 0°C. La agitación se continuó durante 30 min más a 0°C y se eliminó el precipitado por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g). Al sobrenadante se le añadió, poco a poco, sulfato amónico hasta el 70% de saturación, manteniendo la mezcla a 0°C con agitación suave. Cuando la sal se hubo disuelto, se continuó la agitación durante 30 min más. La cantidad de sulfato amónico a añadir se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$g = \frac{533 \times (S_1 - S_2)}{100 - 0.3 \times S_2}$$

siendo S_1 el porcentaje de saturación inicial y S_2 el porcentaje de saturación final. Para un 70% de saturación hay que añadir 472 mg de sulfato amónico por cada ml de sobrenadante. El precipitado proteico se recogió por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g), se disolvió en 15 ml del tampón H suplementado con 300 mM KCl y se dializó frente a 1 l del mismo tampón (se realizaron dos cambios del tampón, cada uno al cabo de 3 h). Se analizó el contenido de la bolsa de diálisis, separando por

centrifugación las proteínas precipitadas de las solubles en estas condiciones. Se observó que RepB se encontraba mayoritariamente en el sobrenadante, por lo cual, éste se dializó frente a 1 l del tampón H sin adición de KCl. Este paso facilita la purificación de RepB ya que esta proteína pierde solubilidad respecto a las otras, al disminuir la fuerza iónica del tampón. Tras la diálisis sin KCl, las proteínas solubles e insolubles, se separaron por centrifugación (30 min, 4°C, 10000 x g).

El sedimento se disolvió en 20 ml de tampón H con 300 mM KCl y se aplicó a una columna de heparina-agarosa (Affi-Gel de Bio-Rad), equilibrada con el mismo tampón. Se empleó una columna K-9 de Pharmacia de 0.9 cm de diámetro y 8.3 ml de volumen. Tras la aplicación de la muestra, se realizó un lavado con el tampón H suplementado con 300 mM de KCl (10 volúmenes de columna). Las proteínas adsorbidas a la matriz de heparina-agarosa se eluyeron mediante un gradiente lineal de 300 a 600 mM de KCl (120 ml), a un flujo constante de 14 ml/h. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron 100 μ l de las fracciones que eluyeron aproximadamente entre 410 y 500 mM de KCl, precipitándolas con acetona o con TCA, y cargándolas en un gel de SDS-PAA. RepB se encontró de forma mayoritaria en las fracciones centrales analizadas; fracciones que se juntaron y dializaron frente a 1 l de tampón H con 300 mM de KCl.

Como última de etapa de purificación y concentración de la proteína, las fracciones dializadas de la primera columna se aplicaron a una segunda columna de heparina-agarosa equilibrada de la misma forma que la vez anterior. Se realizó un lavado de 10 volúmenes de columna con el tampón de equilibrado y, posteriormente, RepB se eluyó con un gradiente lineal de 0.3 a 1 M KCl (50 ml), a un flujo constante de 14 ml/h y recogiendo fracciones de 2 ml. Se procedió al análisis de 50 μ l de las fracciones, precipitándolas con TCA antes de ser cargadas en un gel de SDS-PAA y se juntaron las tres fracciones centrales que eluyeron aproximadamente a 425 mM de KCl, caracterizadas por una mayor pureza y concentración en RepB. El volumen se repartió en alícuotas de 50 μ l y se congeló a -70°C para su conservación.

18. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RepB Y CÁLCULO DE SU COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

La concentración proteica en la preparación de RepB fue determinada por el servicio de Química de Proteínas del CIB mediante el análisis de la composición molar de aminoácidos (aa). Para ello, se dializaron 950 μl ($\sim 40 \mu\text{g}$) de la muestra frente a 1 l de agua destilada, antes de proceder a su liofilización. Se realizó una hidrólisis en presencia de 6 N HCl y 5% ácido tioglicólico, y se inyectó una cuarta parte de la muestra, en el analizador automático de aa. Los aminoácidos se analizaron mediante un equipo Biotronik LC-7000. Para RepB se calculó una concentración de 45 ng/ μl .

La determinación del coeficiente de extinción molar teórico de RepB se realizó a partir de los valores de los aa: triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), presentes en la proteína, multiplicados por el coeficiente de extinción (ϵ) a 280 nm de cada aa. RepB posee 1 Trp, 12 Tyr y 7 Phe; y su masa molecular deducida a partir de su secuencia es de 24252 Da. Los coeficientes de extinción a 280 (ϵ_{280}) calculados para cada uno de los aa son los siguientes: 5559 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Trp, 1197 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Tyr, y 700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para Phe. Por tanto, el valor de ϵ_{280} para RepB se calculó de la siguiente forma:

$$\epsilon_{280} = \frac{(1 \times 5559 + 12 \times 1197 + 7 \times 700) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{24252 \text{ Da}} = \frac{24823 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}}{24252 \text{ g mol}^{-1}}$$

$$\epsilon_{280} = 1,0235 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$$

Se realizó una medida de la absorbancia de RepB a una longitud de onda $\lambda = 280$ nm frente al tampón H suplementado con 425 mM de KCl; para ello, se utilizó un espectofotómetro Shimadzu, modelo UV-160. El valor de absorbancia obtenido fue de 0,179.

19. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB

19.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado

En general, para este tipo de ensayos se incubaron 45 ng de proteína con 700 ng de DNA plasmídico en un volumen de 30 μ l de tampón B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 5 mM DTT) suplementado con 20 mM $MnCl_2$, durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con la adición de 125 μ g/ml proteinasa K e incubación de 10 min a t.a. A las muestras se les añadió el colorante de carga BXGE y se mantuvieron a 4°C, antes de ser analizadas mediante electroforesis en geles 1% agarosa en TBE, con 0.5 μ g/ml de EtBr. La electroforesis se llevó a cabo a 2.7 V/cm. Los geles se fotografiaron bajo luz UV (254 nm) y se realizaron densitometrías de los negativos.

Para determinar las mejores condiciones de actividad de RepB se realizaron ensayos variando las concentraciones de proteína y DNA, los tiempos y temperaturas de incubación, la concentración de $MnCl_2$ añadida a la mezcla de reacción, la presencia o no de otras proteínas, presencia de la heparina como competidor, etc. Asimismo, se probaron distintas condiciones para el análisis de los productos de reacción: porcentaje de agarosa, concentración de EtBr y presencia o no de éste durante la corrida del gel, tampón para la electroforesis y duración de ésta, etc. Todas estas variaciones serán explicadas en el apartado de Resultados.

RepB posee una actividad de corte/cierre tipo topoisomerasa I; por tanto, la reacción de RepB sobre DNA superenrollado circular covalentemente cerrado (CCC o FI) tendrá como productos de la actividad de corte, las formas circulares abiertas (OC o FII); y como productos de corte/cierre, las formas circulares relajadas (RC o FI'). Como estas tres formas de DNA plasmídico poseen intensidades de fluorescencia diferentes, debido a que el EtBr se intercala de distinta manera entre ellas, el rendimiento de los productos de corte/cierre de RepB se calculó por disminución de la señal de fluorescencia de las formas FI del DNA no tratado con RepB. También se observó que el KCl presente en el tampón de incubación, puede generar inespecíficamente formas FII en una pequeña proporción. Por ello, se calculó este porcentaje en la muestra no tratada y se descontó en los cálculos realizados para las muestras incubadas con RepB. La fluorescencia se cuantificó a partir de los negativos

obtenidos en un densitómetro 400, utilizando el programa ImageQuant (Molecular Dynamics) o directamente a partir de los geles teñidos, usando el aparato Gel-Doc 1000 de Bio-Rad (Molecular Analyst).

19.2. Ensayos de actividad de RepB sobre oligonucleótidos

Para este tipo de ensayos se utilizaron oligonucleótidos marcados en su extremo 5' con ^{32}P , que fueron incubados con la proteína, en una relación molar oligo:proteína de 1:7.5, en el tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 . Las mezclas de reacción se incubaron 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. El transcurso de la reacción se paró con la adición de 200 mM EDTA o 300 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K, con una incubación en este último caso de 20 min a 37°C. A continuación, se realizó una precipitación de las muestras añadiendo 5 μg de tRNA como coprecipitador, 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico, pH 7.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto. Se mantuvieron 1 h a -70°C y se recogió el precipitado por centrifugación (40 min, -10°C, 9500 x g). Las muestras se disolvieron directamente en el colorante de carga BXF y fueron analizadas en un gel de secuenciación del 20% PAA/8 M urea. Se detectó la radiactividad por exposición autorradiográfica y se cuantificaron las bandas con el programa ImageQuant del sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Para detectar los productos de la actividad de corte/cierre de RepB sobre oligonucleótidos monocatenarios, se mezclaron oligos marcados (1.3 pmol) con oligos no marcados (2.5 pmol) de distinta longitud, y se incubaron con distintas concentraciones de RepB (1.2 o 2.3 pmol) en el tampón B suplementado con 20 mM MnCl_2 , durante 30 min a las temperaturas ya indicadas. Las muestras se trataron y analizaron de la misma forma que en el apartado anterior.

20. AISLAMIENTO DE COMPLEJOS PROTEÍNA-DNA COVALENTES

Para intentar aislar o detectar intermediarios covalentes RepB-DNA, se realizaron cuatro tipos de ensayos:

a) Interfase. Se basa en la captura de complejos covalentes proteína-DNA (formas FII) por la interfase agua-fenol y en la detección de éstos como bandas retardadas en

un gel tras la digestión con un enzima de restricción (Pansegrau *et al*, 1990). En estos ensayos el DNA plasmídico se incubó con RepB en las condiciones indicadas en el apartado anterior. A continuación, se añadió SDS (2.5% concentración final) y se incubó durante 5 min a 37°C. La muestra se sometió a un tratamiento con fenol:cloroformo. Se separaron las fases acuosa y fenólica por centrifugación, recogiendo tanto la fase superior como la interfase. La interfase se dializó frente a 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM KCl y, al igual que la fase superior, fue precipitada con etanol. El sedimento se disolvió en el tampón adecuado para la digestión con un enzima de restricción, y parte de la muestra fue digerida. Todos los productos se analizaron por electroforesis, en un gel de agarosa al 0.8% con 0.5 µg/ml de EtBr y tampón TBE.

b) K⁺-SDS. Se realizó siguiendo fundamentalmente las indicaciones de Waters *et al* (1991). Se basa en la precipitación de complejos SDS-proteína y complejos SDS-proteína unidos covalentemente a DNA o RNA mediada por iones K⁺. Para realizar estos ensayos el DNA plasmídico se incubó con RepB en las condiciones ya indicadas. Tras los 30 min de incubación, las muestras fueron tratadas con 1% SDS en presencia de 10 mM EDTA, durante 10 min a t.a. Se añadió KCl (100 mM concentración final) y se realizó una incubación de 20 min a 0°C. Las muestras se centrifugaron 10 min, a 9500 x g y 4°C, y se recogió tanto el precipitado como el sobrenadante. Los precipitados se resuspendieron en el mismo volumen de los sobrenadantes y una parte se trató con proteinasa K (1 µg/µl). Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9%, con 0.5 µg/ml de EtBr y tampón TBE.

c) Retardo en gel de fragmentos de restricción. Este método ha sido descrito por Koepsel *et al* (1985) y consiste en someter las mezclas de reacción a un tratamiento con proteinasa K y SDS, digerirlas con un enzima de restricción y observar los intermedios covalentes como bandas retardadas en un gel. El DNA plasmídico se incubó con la proteína como siempre, tras lo cual una parte de las muestras se dializó frente al tampón del enzima de restricción que se iba a usar y otra parte, se precipitó con etanol. Las muestras precipitadas con etanol se dividieron en tres grupos: el primer grupo se trató directamente con el enzima de restricción. Los otros dos grupos se trataron primeramente con proteinasa K (12.5 µg/ml) y SDS (0.28%) durante 10 min a t.a., o con proteinasa K (125 µg/ml) y SDS (0.28%) durante 30 min a 0°C.

Después se realizó una extracción con fenol y una precipitación con etanol, y por último, se trató con el enzima de restricción. Todas las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de PAA al 5% en TAE, en condiciones no desnaturizantes.

d) Retardo en gel de complejos con oligonucleótidos. Este método se basa, como en el caso anterior, en la visualización de los complejos proteína-DNA covalentes como una banda de migración electroforética retardada, según el trabajo de Pansegrau *et al* (1993). Para realizar este ensayo se mezclaron 3.75 pmol de un oligonucleótido marcado en su extremo 3' con distintas concentraciones de RepB (5.5, 14 y 28 pmol) en 90 μ l del tampón B suplementado con 20 mM MnCl₂. La mezcla se incubó durante 30 min a 37, 45 o 60°C. A continuación, se trató con proteinasa K (215 mg/ml) durante 20 min a 37°C. Los productos de reacción se precipitaron con etanol y se analizaron en un gel de secuenciación del 20% PAA/8 M urea. Las bandas se visualizaron mediante una exposición autorradiográfica.

21. ANÁLISIS DE LA QUIRALIDAD DEL FOSFATO IMPLICADO EN LA UNIÓN DE LA PROTEÍNA RepB AL DNA

El análisis de la estereoquímica del fosfato implicado en la transferencia del DNA a la proteína, requiere un fosfato quiral entre los nt donde se va a producir el corte en el DNA y un fosfato interno marcado radiactivamente con ³²P situado en el nt situado a 5' del corte, que nos va a permitir visualizar los productos obtenidos tras la reacción de transferencia y el análisis con nucleasas estereoespecíficas. El fosfato quiral se consigue substituyendo uno de los oxígenos, que no forman parte del enlace fosfodiéster, por un átomo de azufre. Como ya hemos comentado anteriormente, estos oligonucleótidos tio-derivados fueron sintetizados y purificados por el Dr. Ramón Eritja en el European Molecular Biology Laboratory, según las condiciones descritas por Mizuuchi y Adzuma (1991).

La construcción de un oligonucleótido con la secuencia de corte de la proteína RepB y que llevase el fosfato quiral en la posición del fosfato implicado en la unión a la proteína, se realizó de dos formas:

a) Ligación de los oligonucleótidos tio-derivados de 9-mer marcados (configuraciones R_p y S_p : 5'-Gp^sApCpCpCpCpCpCpC_{OH}-3', donde p^s representa el fosfato quiral situado entre los nt G/A donde se produce el corte) y del oligonucleótido de 15-mer (5'-TpGpGpGpGpGpGpGpCpTpApCpTpApC-3', que contiene la secuencia consenso de RepB situada a 5' del sitio de corte) con la T4 RNA ligasa. Previamente, los tio-derivados fueron marcados en sus extremos 5' con la T4 PNK y [α -³²P]dATP y se les bloqueó el grupo -OH en 3' usando ddATP y la transferasa terminal, obteniéndose como resultado el oligonucleótido 5'-p*Gp^sApCpCpCpCpCpCpCpA_H-3', con cada uno de los tioderivados (donde p* indica el fosfato marcado radiactivamente). La reacción de ligación usando la T4 RNA ligasa se realizó siguiendo las recomendaciones de Brennan *et al* (1983): concentraciones de oligonucleótidos y enzima más altas que las que se usan normalmente para unir moléculas de RNA, exceso del aceptor-OH de 1 a 10 veces (molar) respecto al donador-P, tiempos de reacción más largos (1-10 días), incubación a baja temperatura (5-15°C), concentraciones de ATP a valores bajos (de 0.1 a 0.9 respecto al donador) y presencia de Mn(II). Para realizar la ligación se preparó una mezcla con 300 pmol de oligonucleótido tio-derivado marcado en su extremo 5' (donador-P, 30 μ M de concentración final), 1.2 nmol del oligonucleótido 15-mer (aceptor-OH, 120 μ M de concentración final), 0.15 nmol de ATP (15 μ M), 1 mM fosfocreatina pH 9.0 y 2 mM espermina pH 7.9; esta mezcla se llevó a sequedad en una bomba de vacío y luego se añadieron los siguientes componentes: 50 mM HEPES-NaOH pH, 7.9, 10 μ g/ml BSA, 20 mM DTT, 175 u/ml de creatina-fosfato-quinasa, 170 u/ml de adenilatoquinasa, 10 mM MnCl₂ y 50 u de T4 RNA ligasa, en un volumen final de 10 μ l. Las muestras se analizaron en un gel 24% PAA/50% urea. Otras condiciones para realizar una ligación de oligonucleótidos con la T4 RNA ligasa se describen en Tessier *et al* (1986): se usa una relación aceptor:donador de 5:1, 20 μ M ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM HCC (cloruro de hexamin-cobalto), 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 μ g/ml BSA y 25% PEG. En este caso la reacción se incubó durante 16 h a 25°C y no se necesita un sistema para la regeneración de ATP.

b) Ligación de los oligonucleótidos tio-derivados de 9-mer fosforilados (configuraciones R_p y S_p : 5'-pGp^sApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3') y del oligonucleótido de 14-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3', que contiene la secuencia consenso de RepB situada a 5' del sitio de corte) con la T4 DNA ligasa. Para realizar

esta ligación, los oligonucleótidos se anillaron previamente a DNA desnaturalizado del plásmido pFX2 (que contiene la secuencia de corte de la proteína RepB). La desnaturalización del DNA de pFX2 (15 pmol, 35 μ g) se realizó mediante un tratamiento con 0.4 M NaOH, y se precipitó con 0.45 M acetato sódico y 3 volúmenes de etanol. El sedimento se disolvió directamente en la mezcla de anillamiento, que contenía el oligo quiral fosforilado (30 pmol) y el oligo de 14-mer (15 pmol) en la solución SSC y 10 mM Tris-HCl pH 8.0. Para hibridar los oligonucleótidos al DNA molde se calentaron las mezclas de anillamiento (volumen final de 50 μ l) durante 5 min a 70°C, tras lo cual se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar la t.a. A la mezcla se le añadió la T4 DNA ligasa (6 u) en el tampón recomendado por la casa suministradora (volumen final de 70 μ l) y se incubó durante 16 h a 16°C; se añadió más ligasa y se incubó 2 h más a 16°C. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación con etanol; como producto de ligación se obtendría, de forma mayoritaria, el oligonucleótido de 23-mer (5'-TpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpAp CpGp⁵ApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3'), que contiene la secuencia de corte completa. Por otro lado, se sintetizó el oligonucleótido de 24-mer (5'-ApApGpCpGpApApTpTpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApC_{OH}-3'), se anilló al DNA de pFX2 desnaturalizado de la misma forma que la vez anterior y mediante la T7 DNA polimerasa se incorporó [α -³²P]dGTP en su extremo 3', obteniéndose como resultado un oligo de 25-mer con el nt G del sitio de corte marcado radiactivamente. La polimerización se realizó añadiendo [α -³²P]dGTP (20 pmol, 60 μ Ci), dGTP (40 pmol) y T7 DNA polimerasa (11.5 u) en 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 5 mM DTT, en un volumen final de 70 μ l; se incubó 15 min a t.a. y se añadió más enzima, incubando otros 15 min más a t.a.; la reacción se paró con 25 mM EDTA en hielo. La comprobación de la eficiencia de polimerización se realizó tomando una alícuota de 0.5 μ l que se mezcló con 2.5 μ l de agua y se repartió en dos filtros Whatman DE81; uno de los filtros se dejó secar a t.a. (cpm total) y el otro filtro se lavó seis veces con 0.5 M HPO₄Na₂ durante 5 min y 2 veces con agua destilada 1 min (cpm incorporadas), se secó a 80°C y se contaron las cpm de los dos filtros en un contador de centelleo. La incubación del oligo quiral de 23-mer y del oligonucleótido de 25-mer marcado radiactivamente con la proteína RepB en condiciones de corte/cierre que permitan el intercambio de hebras nos dará como producto un oligonucleótido quiral de 33-mer con un fosfato interno (5'-ApApGpCpGpApApTp TpTpTpGpCpTpTpCpCpGpTpApCpTpApCp*Gp⁵ApCpCpCpCpCpCpA_{OH}-3'). La

eliminación del DNA molde de pFX2 se llevó a cabo pasando las muestras, previamente diluidas y desnaturalizadas por calor (10 min a 95°C) por un microconcentrador Microcon 100 (de Amicon), durante 15 min a 500 x g y 20°C. El corte de membrana de este microconcentrador es de 100 KDa, con lo cual el DNA era retenido y los oligos o nt no incorporados se recuperaban en el filtrado. Este filtrado se pasaba nuevamente por otro microconcentrador Microcon 3 (de Amicon, corte de membrana de 3 KDa), durante 1 h a 14000 x g y 20°C, para la eliminación del nt no incorporado y del oligo quiral (9-mer) no anillado.

Una vez obtenido el oligonucleótido quiral sustrato se realizó una incubación con dos concentraciones de RepB (0.6 y 1.9 pmol), durante 20 min a 45°C. Las muestras se trataron con proteinasa K (125 µg/ml) durante 10 min a t.a. y se precipitaron con etanol; se analizaron en un gel 20% PAA/8 M urea y se eluyó la banda de PAA correspondiente al producto de la actividad de corte/cierre de RepB. El análisis de la quiralidad del fosfato del oligonucleótido eluído se realizó mediante digestiones con dos nucleasas esteroespecíficas: la nucleasa P1, que reconoce el enlace R_p-fosforotio y la PDE, que actúa preferentemente sobre el enlace S_p-fosforotio. La reacción con la nucleasa P1 se llevó a cabo con 0.0015 u del enzima en 20 mM acetato sódico pH 5.3, 0.1 mM ZnCl₂ y 11.7% glicerol, y una incubación a 37°C. La reacción con la PDE se realizó con 0.15 u del enzima en 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM MgCl₂ y 11.7% glicerol, e incubando a t.a. (28°C). En ambos casos se tomaron alícuotas (7.5 µl) a los 5 y 60 min de incubación, se les añadió un volumen de una mezcla de tampón BXF:agua (1:1) y se evaporaron a vacío hasta un volumen final de 7.5 µl. Los productos de reacción se analizaron en un gel 24% PAA/8.3 M (50%) urea.

22. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL

Este tipo de ensayos se realizaron para analizar curvaturas intrínsecas en el DNA o inducidas por la unión de una proteína (y mutantes de ésta) a determinadas zonas del DNA. En este trabajo se realizaron dos tipos de ensayos:

22.1. Curvaturas intrínsecas: ensayos en ausencia de RepB

El fragmento de DNA objeto de estudio (fragmento *BanI-ApaI* de 393 pb de pMV158) se clonó en el sitio único *SalI* del vector pBend2 (Kim *et al*, 1989). El plásmido recombinante pBend-*dso* fue digerido con distintas enzimas de restricción, originando fragmentos de la misma longitud con la zona del DNA a estudiar localizada en distintas posiciones. Aquellos fragmentos que presenten una curvatura en su zona central migrarán más lentamente que aquellos que posean la curvatura en un extremo. Las diferencias en la migración de los fragmentos se verá favorecida si la electroforesis se realiza a 5°C. Por el contrario, en una electroforesis realizada a 50°C, los fragmentos curvados tenderán a migrar igual que aquellos que no lo están (Poljak y Gralla, 1987). Tras la digestión de pBend-*dso* (0.4 µg) con distintas enzimas de restricción, la muestra se repartió en dos (0.2 µg), se añadió el colorante de carga BXGE y se analizó por electroforesis en dos geles nativos 6% PAA, a un voltaje de 20 V/cm en tampón TAE. Una de las electroforesis se realizó en una cámara fría (5°C) y la otra se llevo a cabo en un incubador a 50°C. Se midieron las movilidades relativas (R_1) de cada fragmento a 5 y 50°C.

22.2. Curvaturas inducidas: ensayos en presencia de RepB

Este tipo de ensayos han sido descrito previamente en los trabajos de Garner y Revzin (1981) y de Fried y Crothers (1981). El plásmido pBend-*dso* (0.4 µg) fue nuevamente digerido con enzimas de restricción y la muestra se dividió en dos (0.2 µg) para ser tratado o no con la proteína RepB (~110 ng) en el tampón B. Las mezclas se incubaron 30 min a t.a. y se analizaron por electroforesis en un gel de PAA al 6%, a 16 V/cm en tampón TAE. Alternativamente, se emplearon geles de 0.5% agarosa-1.8% PAA, a 6 V/cm en tampón TAE. En este último caso, se incluyó una muestra a la que se trató con heparina (0.2 µg/µl), añadiéndola en los últimos 10 min de incubación.

22.3. Complejos RepB-DNA

Se utilizaron fragmentos de DNA eluidos a partir de un gel de PAA que fueron marcados en su extremo 3'. Se incubaron con distintas cantidades de proteína durante 30 min a t.a., y se analizaron en un gel de PAA al 5%, a 25 V/cm en tampón TAE. Las bandas se visualizaron por autorradiografía.

23. ENSAYOS DE UNIÓN PROTEÍNA-DNA EN FILTRO

Los ensayos de unión de complejos RepB-DNA a filtros (de la Campa *et al*; 1990) se realizaron para conocer la naturaleza de éstos. Para estos ensayos, se mezclaron 3.75 pmol de un oligonucleótido marcado en su extremo 3'(que contenía el sitio de corte de RepB) con 23 pmol de RepB en 90 µl de tampón B suplementado con 20 mM MnCl₂. La mezcla se incubó 5 min a 60°C y se paró la reacción con 900 µl de tampón L frío (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT) suplementado con 50 mM EDTA. Las mezclas de reacción se aplicaron sobre filtros de nitrocelulosa (HA 0.45 µm, Millipore) pre-lavados con el tampón L y con un exceso de 10 veces de un oligonucleótido inespecífico. El flujo se ajustó a 1.5 ml/h. Después, los filtros se lavaron con 9 ml del tampón L y se secaron a 50°C durante 45 min. La radiactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo (Cerenkov).

Para analizar la estabilidad de los complejos RepB-DNA, los filtros se lavaron con tampones L preparados a diferentes pH (entre 7.0 y 9.5), o suplementados con distintas cantidades de KCl (0.02, 0.5 y 1 M), NaCl (0.02, 0.5, 1 y 1.5 M) o SDS (0, 0.5, 1 y 1.5%). Se calculó el porcentaje de radiactividad retenida en los filtros, tomando como valor 100 las cpm retenidas en el filtro lavado con el tampón L básico (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 5 mM DTT).

24. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB MEDIANTE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

La masa molecular de la proteína RepB se determinó mediante la técnica de equilibrio de sedimentación. Previamente, la proteína RepB se dializó frente a 1 l del tampón C (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM KCl), con objeto de eliminar de la muestra el DTT y EG, que podrían interferir en las medidas de absorbancia.

Los experimentos de ultracentrifugación analítica fueron ejecutados por el Dr. Germán Rivas en el CIB. Para ello, muestras de RepB (0.02 y 0.04 µg/ml) equilibradas en tampón C fueron centrifugadas a 25000 rpm y 10°C en una

ultracentrífuga analítica modelo XL-A (Beckman Instruments Inc.) equipada con un sistema de absorción VIS-UV, empleando células con piezas centrales de epon-charcoal, de doble sector y 12 mm. Después de 8 horas se midió la distribución de absorbancia (230 y 280 nm) con la distancia radial, en intervalos de dos horas, tomándose cuatro promedios por punto y con una densidad de barrido de 0.001 cm. El cálculo de la masa molecular (M_r) de RepB se realizó ajustando la expresión (I) a los datos experimentales, empleando los programas EQASSOC y XLAEQ (suministrados por Beckman Instruments Inc.; Minton, 1994):

$$A_r = A_0 \exp[M_r (1 - v \rho) \omega^2 (r^2 - r_0^2) / 2RT] \quad (I)$$

donde A_r es la absorbancia correspondiente a una distancia radial r , A_0 es la absorbancia a una posición de referencia, v es el volumen específico parcial de RepB, ω es la velocidad angular del rotor, R es la constante de los gases, y T la temperatura absoluta. El volumen específico parcial de RepB, calculado a partir de la composición de aa de la proteína (Laue *et al*, 1992), fue de 0.749 ml/g.

25. ANÁLISIS POR ORDENADOR

Las comparaciones de secuencias de DNA, mapas de restricción, predicciones en general sobre tamaños de fragmentos, etc., así como las predicciones de curvaturas en DNA se realizaron con los programas DNASTAR. Los alineamientos más complejos de secuencias de DNA y proteínas se realizaron con los programas GCG de la Universidad de Wisconsin. La temperatura de fusión de los oligos se calculó con el programa OLIGO (versión 3.4) y los ajustes matemáticos para el cálculo de la masa molecular de RepB, se realizaron con los programas EQASSOC y XLAEQ.

RESULTADOS

1. DEFINICIÓN DEL ORIGEN MÍNIMO DE REPLICACIÓN DE LA HEBRA LÍDER DE pLS1

El origen funcional de un plásmido se puede definir como el segmento de menor tamaño requerido en *cis* para que se inicie la replicación de la hebra líder. Como pLS1 puede replicar en extractos libres de células preparados a partir de *E.coli* (del Solar *et al.*, 1987a), se pudo determinar *in vitro* que el sitio de iniciación de la replicación se localiza en el fragmento *HinfI* D (Fig. 10), situado entre las coordenadas 242 y 685 de pLS1 (Puyet *et al.*, 1988). Dentro de este fragmento se encuentran dos estructuras tipo tallo-lazo [Horquillas I (H-I) y II], las tres repeticiones directas (iterones I1-I2-I3), el promotor P_{cr} para la transcripción de los genes *copG* y *repB* y el codón de iniciación para la proteína CopG. Anteriormente, se había determinado que la proteína RepB purificada se une, *in vitro*, a los tres iterones de 11 pb y que realiza un corte en el DNA plasmídico a 84 pb a la izquierda del primer nucleótido del iterón I1, entre los nt G (448) y A (449) de la secuencia 5'-TACTACGA-3' situada en el lazo de H-I (de la Campa *et al.*, 1990; Fig. 8).

Basándonos en estos datos anteriores, pensamos que, *in vitro*, el elemento mínimo en *cis* de pLS1 capaz de actuar como *dso* debería estar comprendido entre las coordenadas 431 (extremo 5' de H-I) y 565 (último nt del iterón I3; Fig. 8). Consecuentemente, decidimos delimitar el origen mínimo de replicación de la hebra líder de pLS1. Para ello, se hizo uso de derivados plasmídicos delecionados en esta región, concretamente los plásmidos que tienen las deleciones denominadas $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Ambas deleciones limitarían el *dso* a las secuencias comprendidas entre las coordenadas 401 y 649, ya que los plásmidos pLS1 $\Delta 24cop7$ y pLS $\Delta A4$ muestran las deleciones más cercanas a izquierda y derecha del *dso*, respectivamente (Fig. 11). El plásmido pLS1 $\Delta 24cop7$ (Puyet *et al.*, 1988) se construyó a partir de la digestión de DNA de pLS1*cop7* linearizado en el sitio *BanI* con la nucleasa BAL31 y posee una deleción de 569 pb (Δmal ; Fig. 7) situada entre las coordenadas 4240 y 401, siendo la deleción que más se aproxima al sitio de corte de la proteína RepB. Por otro lado, el plásmido pLS1 $\Delta A4$ (del Solar y Espinosa, 1992) se construyó por digestión con

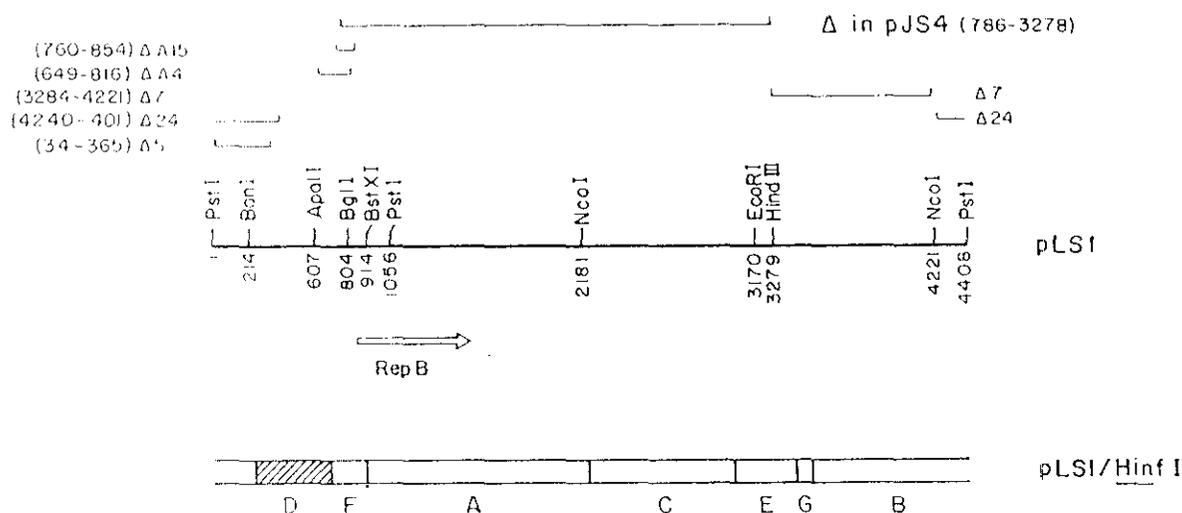


Figura 10. Mapa de deleción de pLS1. Las líneas situadas sobre el mapa de restricción indican las regiones delecionadas (coordenadas entre paréntesis) en los derivados de pLS1. Las deleciones indicadas como $\Delta A15$, $\Delta A4$, $\Delta 7$, $\Delta 24$ y $\Delta 5$, corresponden a los plásmidos pLS1 $\Delta A15$, pLS1 $\Delta A4$, pLS4, pLS1 $\Delta 24cop7$ y pLS5. Se muestran algunos sitios de restricción y sus coordenadas de corte en pLS1. Se indica mediante una flecha, la posición de la secuencia codificante para RepB. En la parte inferior se muestra el mapa de pLS1 para el enzima *HinfI*: el fragmento D (sombreado) contiene la región de iniciación de la replicación, como se demostró mediante ensayos *in vitro* realizados con extractos libres de células (Puyet *et al*, 1988).

BAL31 del DNA de pLS1 linearizado en el sitio *BglI*. Su deleción de 167 pb ($\Delta copG$) es la más cercana al iterón I3 de pLS1 y se encuentra entre las coordenadas 649 y 816 (Fig. 11). Con el fin de definir *in vivo* el origen funcional de pLS1 que estaría delimitado a derecha e izquierda por las dos deleciones mencionadas, se construyó el plásmido pLS1 $\Delta A4-24$ a partir de un intercambio de fragmentos *ApaI-SspI* entre pLS1 $\Delta 24cop7$ y pLS1 $\Delta A4$. Así se podría delimitar el *dso* funcional incluyéndolo en una región de 247 pb. Se realizó una digestión doble de ambos plásmidos (3 μ g de DNA) y, a partir de un gel de agarosa, se purificó el fragmento *ApaI-SspI* grande del pLS1 $\Delta 24cop7$ (3123 pb) y el fragmento pequeño de pLS1 $\Delta A4$ (549 pb). Ambos fragmentos se mezclaron en una proporción 1:1 en moléculas y la ligación se realizó con la T4 DNA ligasa en presencia de 66 mM Tris-HCl, 0.05 mM ATP, 1 mM espermidina, 10 mM MgCl₂, 14 mM DTT, 0.2 μ g/ μ l BSA, en un volumen final de 30 μ l, durante 16 h a 14°C. Se usó un tercio de la mezcla de ligación para transformar *S.pneumoniae* 708, obteniéndose 3.8×10^3 transformantes por ml. Todos los

transformantes analizados por mapeo de restricción presentaban las deleciones $\Delta A4$ y $\Delta 24$. Se eligió un clon entre ellos y se procedió a determinar el número de copias y la estabilidad del plásmido pLS1 $\Delta A4$ -24.

Para la determinación del número de copias, se realizaron preparaciones de DNA total a partir de cultivos de *S.pneumoniae* que contenían pLS1 $\Delta A4$ -24, pLS1, pLS1*cop7*, pLS5 o pLS1 $\Delta 24$ *cop7*, y se analizaron en geles de agarosa. El número de copias de pLS1 $\Delta A4$ -24 se calculó por comparación del número de copias de pLS1 (22

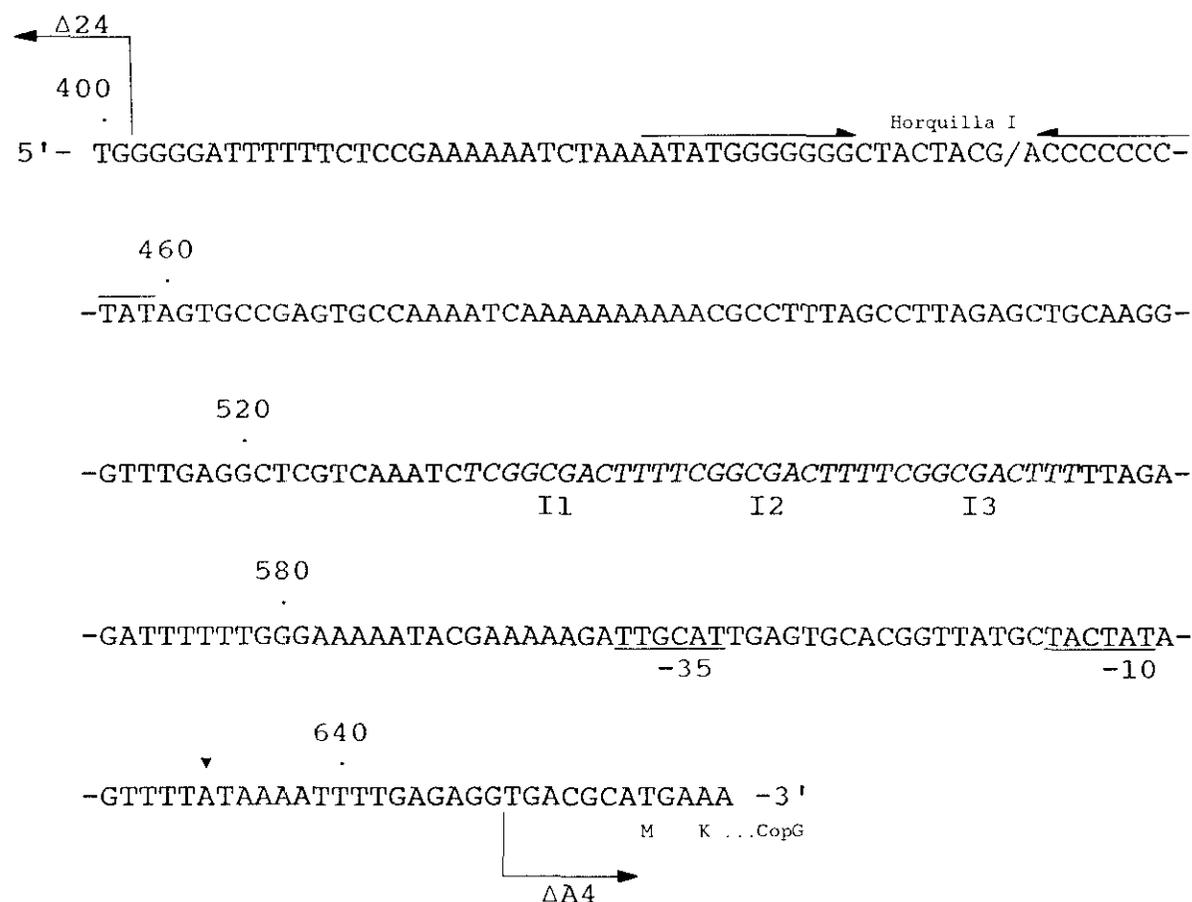


Figura 11. Secuencia de nucleótidos del origen funcional (*dso*) de pLS1. Se muestran los bordes a la derecha e izquierda de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Se indican la Horquilla I (coordenadas 431-460) que contiene el sitio de corte (/) de la proteína RepB, las tres repeticiones directas (iterones I1-I3, en *itálica*), el promotor *cop-rep* (cajas -35 y -10, subrayadas en el texto), el punto de iniciación del mRNA *cop-rep* (▼) y los dos primeros codones del gen *copG*.

copias) y pLS1*cop7* (110 copias), que ya habían sido calculados previamente. Los resultados mostraron que el plásmido pLS1ΔA4-24 presenta un número de copias similar al de pLS1Δ24*cop7*, aproximadamente 70 copias (Fig. 12A).

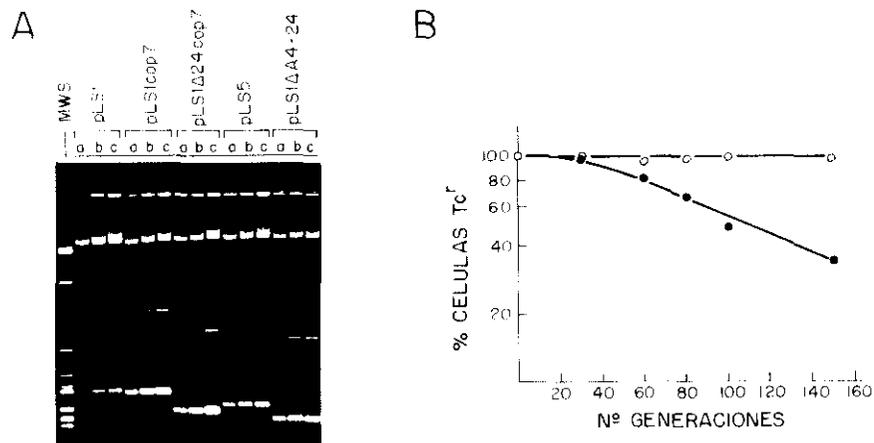


Figura 12. Fenotipos de pLS1 y algunos de sus derivados. **A.** Comparación del número de copias de los plásmidos pLS1, pLS1*cop7*, pLS1Δ24*cop7*, pLS5 y pLS1ΔA4-24 en *S.pneumoniae*. Se analizó el contenido de DNA total de los cultivos crecidos a una $DO_{650} = 0.5$. En un gel de agarosa al 1.2% se cargaron tres cantidades [5 (a), 10 (b) y 15 μl (c)] distintas de cada preparación y los cálculos se realizaron mediante densitometrías de los negativos obtenidos. **B.** Estabilidad segregacional de los plásmidos pLS1 (○) y pLS1ΔA4-24 (●) en *S.pneumoniae*. Los cultivos de esta estirpe conteniendo los plásmidos se crecieron, en medio líquido sin antibiótico, durante las generaciones indicadas. Mediante recuento en placa se calcularon los porcentajes de células Tc⁺ y se representaron en función del número de generaciones en ausencia de presión selectiva.

Por otra parte, interesaba determinar si pLS1ΔA4-24 era segregacionalmente estable, es decir, si las deleciones afectaban a la herencia estable del plásmido. Para analizar la estabilidad de pLS1ΔA4-24 en *S.pneumoniae*, se realizaron diluciones sucesivas sin presión de selección a partir de un cultivo inicial ($DO_{650} = 0.5$) considerado como generación $g=0$ y que fue crecido en presencia de Tc. Cada 10 generaciones se analizó el porcentaje de células Tc⁺ (células con plásmido) mediante recuentos en placas con o sin medio selectivo. El plásmido pLS1ΔA4-24 resultó ser bastante estable tras 60 generaciones sin presión selectiva (82% de Tc⁺; Fig. 12B). Sin embargo, al cabo de 100 generaciones sin presión de selección ya se observa una

pérdida plasmídica (47%). Se puede considerar que pLS1 Δ A4-24 es ligeramente inestable ya que la tasa de pérdida, tras 100 generaciones fue de $L_{ex} = 0.0076$.

Podemos concluir que, *in vivo*, la región mínima que contiene un origen funcional necesario *in cis* para la replicación de pLS1 se encuentra en un fragmento de 247 pb, entre las coordenadas 402 y 648. Además, este origen puede ser dividido física y funcionalmente en dos regiones separadas: la región *nic*, donde la proteína produce el corte en el DNA y la región *bind*, que contiene las tres repeticiones directas a las cuales se une la proteína RepB (Fig. 13).

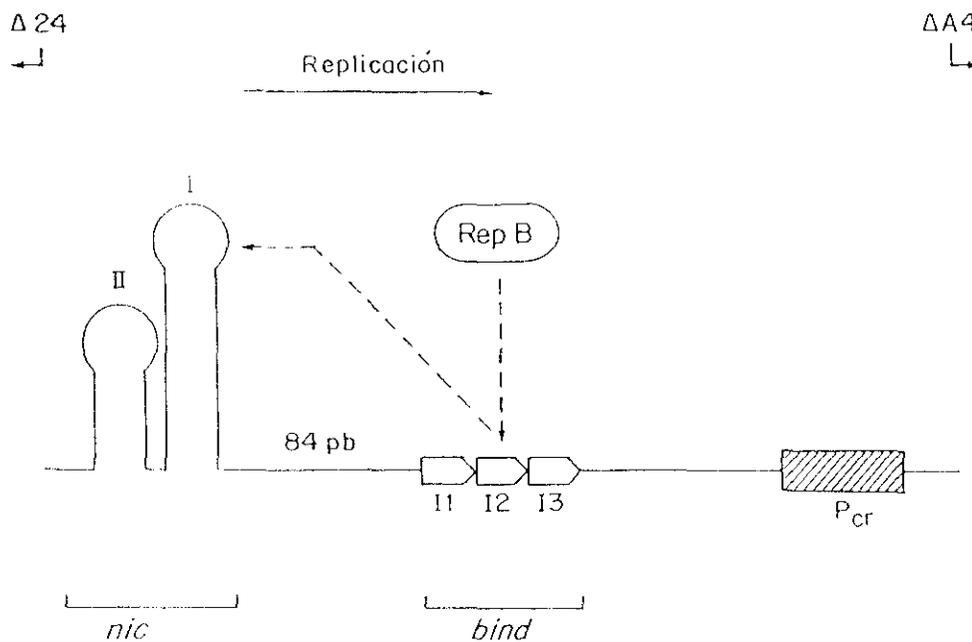


Figura 13. Representación esquemática de las características del origen de la cadena líder de pLS1. Se indican los extremos de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$, que definen los bordes del origen, a la izquierda y derecha, respectivamente. Dentro de la región *nic* se encuentran las Horquillas I y II (aunque posiblemente no se forme por su alto contenido en A+T). Los iterones (11-13) constituyen la región *bind* y se indica su posición respecto a la región *nic* y al promotor P_{cr} (a partir del cual se cotranscriben los genes *copG* y *repB*). La línea discontinua muestra las posibles interacciones RepB-DNA. Asimismo se indica con una flecha, la dirección de la replicación desde el origen de la cadena líder de pLS1.

2. EL dso ES UN DETERMINANTE DE INCOMPATIBILIDAD

Una característica de los plásmidos es que si comparten regiones implicadas en su replicación y control son incapaces de coexistir en la misma célula en ausencia de presión selectiva, es decir, son incompatibles. Por lo tanto, era de esperar que el origen de replicación de la hebra líder fuese un determinante de incompatibilidad.

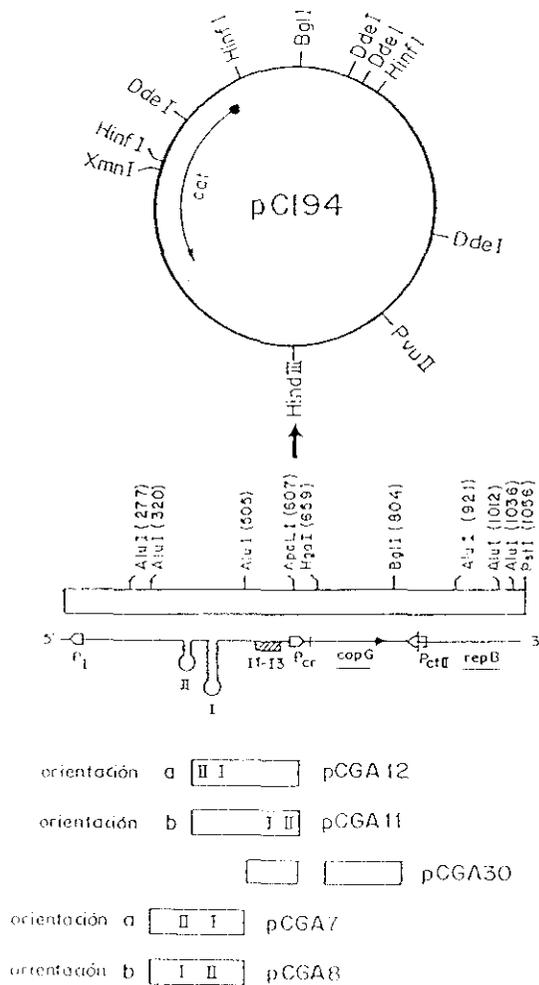


Figura 14. Construcciones utilizadas para analizar el *dso* como determinante de incompatibilidad. Se muestra un mapa circular de pC194_{cop} con la dirección del gen *cat* y los sitios de restricción relevantes. Todos los clonajes se realizaron en el sitio *HindIII* único de pC194_{cop}, que se ha señalado con una flecha. Debajo del mapa físico de la región pertinente de pLS1 se indica la posición relativa de las Horquillas I y II, de los tres íterones (I1-13), de los promotores P_{cr}, P_{ctII} y P_I y de los genes *copG* y *repB*. Se muestran los nombres de las distintas construcciones, los fragmentos de pLS1 clonados en cada una de ellas y la orientación de los fragmentos clonados.

Para la realización del estudio sobre el *dso* de pLS1 como elemento de incompatibilidad, se utilizaron los plásmidos pCGA30, pCGA7, pCGA8, pCGA11 y pCGA12, que fueron construidos clonando la región *bind*, la región *nic*, o el *dso* entero, en el sitio único *HindIII* de pC194*cop* (replicón compatible con pLS1; Fig. 14). Los plásmidos pCGA7 y pCGA8 llevan el fragmento *AluI*(320)-*AluI*(505) de pLS1, que contiene la región *nic* del origen, en las dos orientaciones posibles. Estos plásmidos se emplearon como donadores en los ensayos de incompatibilidad. Para ello, cultivos competentes de *S.pneumoniae* que contenían pLS1 (plásmido residente) se transformaron con 1.4 μ g de DNA de los plásmidos pCGA7 y pCGA8, empleando pC194*cop* como control. En todos los casos se seleccionó para Cm, ya que los plásmidos donadores presentan resistencia a este antibiótico (gen *cat*). Las eficiencias de transformación fueron del orden de 2×10^4 transformantes/ml. Se eligieron varios clones, que se analizaron mediante preparaciones de DNA total y recuento en placa. Los análisis se realizaron en una situación inicial, que ha sido estimada en 37 generaciones (es decir, 25 generaciones necesarias para que una u.f.c. dé lugar a una colonia de tamaño medio y 12 generaciones más para que la porción de la colonia inoculada en medio líquido dé lugar a un cultivo crecido hasta una DO = 0.5; del Solar *et al*, 1989) y tras 60 generaciones más de crecimiento en presencia de Cm. En estas condiciones, se calcularon los porcentajes de células viables totales, los de células Cm^r (que contenían el plásmido donador) y los de células Tc^r (que mantenían el plásmido residente). Asimismo, se comprobó si existía algún cambio en el número de copias de pLS1. Los resultados obtenidos tras 97 generaciones de crecimiento con presión selectiva para el plásmido entrante, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. La región *nic* por sí sola no ejerce incompatibilidad sobre pLS1.

	<u>Plásmido donador</u>		
	<u>pCGA7</u>	<u>pCGA8</u>	<u>pC194</u>
Células viables	1.8×10^8	1.6×10^8	1.8×10^8
% Cm ^r	97.8	100	100
% Tc ^r	94.5	100	100

Como se puede deducir, no se observó incompatibilidad apreciable mediada por la región *nic* del origen de replicación frente a pLS1 (Fig. 15A). Por otra parte, se observó una total compatibilidad entre pLS1 y pCGA30 (región *bind*).

Los ensayos de incompatibilidad realizados con pCGA11 y pCGA12, que llevan clonados el *dso* de pLS1 entero (región *bind* y *nic*) mostraron que en la situación inicial (37 generaciones), el número de copias de pLS1 se redujo notablemente (Fig. 15B). Tras 97 generaciones el porcentaje de células Tc^r (células que contenían pLS1)

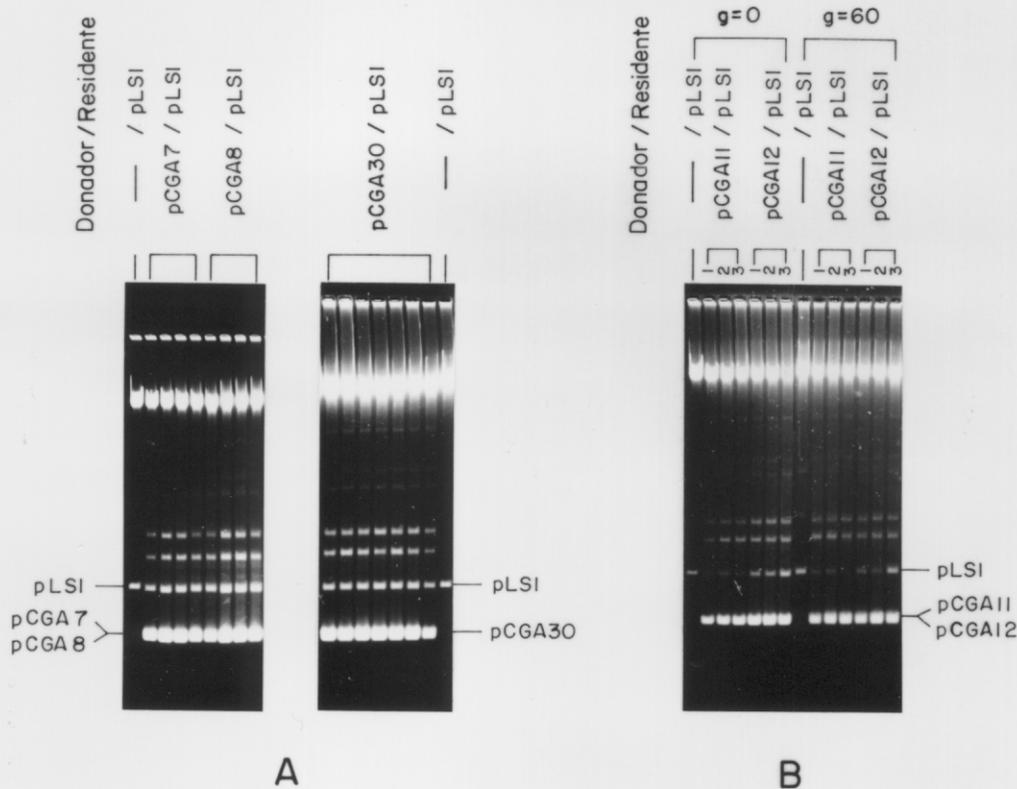


Figura 15 A, B. Efecto en *trans* de las regiones *nic*, *bind* y el *dso* intacto de pLS1 clonadas en pC194cop sobre el número de copias y estabilidad de pLS1. Cultivos de *S.pneumoniae* con el plásmido pLS1 como residente se transformaron con DNA del plásmido donador indicado. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido con Cm (medio selectivo para el plásmido entrante). Se escogieron varios clones que fueron crecidos en medio líquido en presencia de Cm (g=0) hasta la mitad de la fase exponencial. Mediante diluciones apropiadas, estos cultivos se crecieron en el mismo medio durante 60 generaciones más (g=60). Se analizó el contenido de DNA total de la población heteroplasmática a g=60. En el caso de los clones heteroplasmáticos que llevan pLS1 y pCGA11 o pCGA12 (que mostraron una ligera incompatibilidad) también se muestra el contenido de DNA total en la generación g=0.

fue del 60%, con una tasa de pérdida para pLS1 de $L_{ex} = 0.005$ (del Solar *et al*, 1993b). Como pCGA11/12 no llevan las secuencias que codifican para los determinantes de incompatibilidad de pLS1 (RNA II y CopG; del Solar y Espinosa, 1992), la incompatibilidad observada debe atribuirse a competición por la utilización de RepB. Estos experimentos indican que se necesita el *dso* entero (región *bind* y *nic*) para la funcionalidad *in vivo* de RepB y que cualquiera de las dos regiones del origen por separado no son suficientes para secuestrar RepB y reducir el número de copias de pLS1.

3. RepB ES CAPAZ DE ACTUAR EN TRANS

Para comprobar que la proteína RepB podría ser secuestrada por el *dso* entero clonado en un plásmido compatible y que, por tanto, es activa en *trans*, se utilizó el plásmido pLS1 Δ A15, derivado delecionado de pLS1 cuya deleción abarca las coordenadas 760-854 (Fig. 16). El plásmido pLS1 Δ A15 carece del RNA II, de parte del gen *copG* y del codón de iniciación del gen *repB*. Estudios preliminares de caracterización de pLS1 Δ A15 revelaron la presencia de un plásmido acompañante, que resultó ser pLS1. El análisis de la población heteroplasmídica inicial mostró que el número de copias plasmídico total fue de aproximadamente $N = 70$, y el número de copias de pLS1 se redujo a 15 (el valor N medio de pLS1 en *S.pneumoniae* es 22),

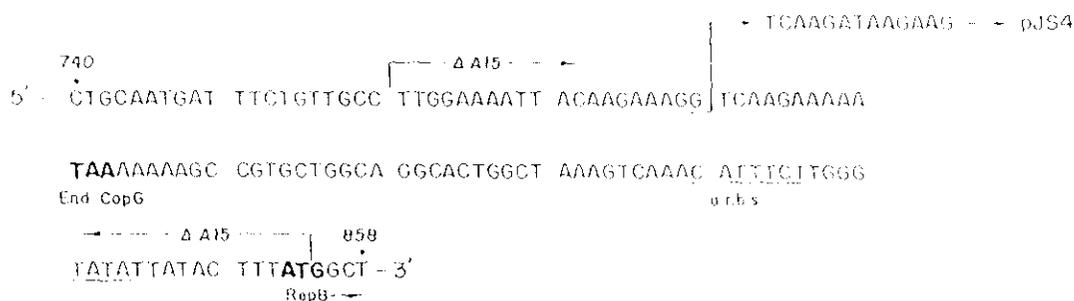


Figura 16. Secuencia de nucleótidos de pLS1 entre las coordenadas indicadas. Se indica la deleción Δ A15 y el borde izquierdo de la deleción en pJS4. Se muestran en negrita el codón de terminación del gen *copG* y el codón de iniciación del gen *repB*, subrayado se encuentra el sitio atípico de unión a los ribosomas (a.r.b.s.) propuesto para el gen *repB* (Lacks *et al*, 1986).

ya que se observó que la proporción de pLS1 Δ A15 era de aproximadamente 3.7 veces más que el pLS1 acompañante. El plásmido pLS1 Δ A15 difiere de pLS1 en 95 pb. Esta diferencia se puede observar al digerir los DNAs de ambos plásmidos con *Apa*LI (coordinada 607 de pLS1) y *Bst*XI (coordinada 914 de pLS1), ya que pLS1 Δ A15 genera un fragmento de 212 pb y pLS1 uno de 307 pb. Estas digestiones se analizaron en un gel 5% PAA, y se realizaron densitometrías de varios negativos. Tras realizar las correcciones correspondientes al tamaño de las bandas, se obtuvo una relación de 3.7 veces más para la banda de 212 pb (pLS1 Δ A15) con respecto a la de 307 pb (pLS1). Cuando la población heteroplasmídica se creció en ausencia de presión selectiva se observó que, tras 60 generaciones, el porcentaje de células con plásmido (clones Tc^r) era del 3.4%, siendo la tasa de pérdida de $L_{ex} = 0.054$ (Fig 17). En este caso, la competición por la utilización de RepB entre plásmidos que comparten un *dso* entero podría ser un factor de incompatibilidad.

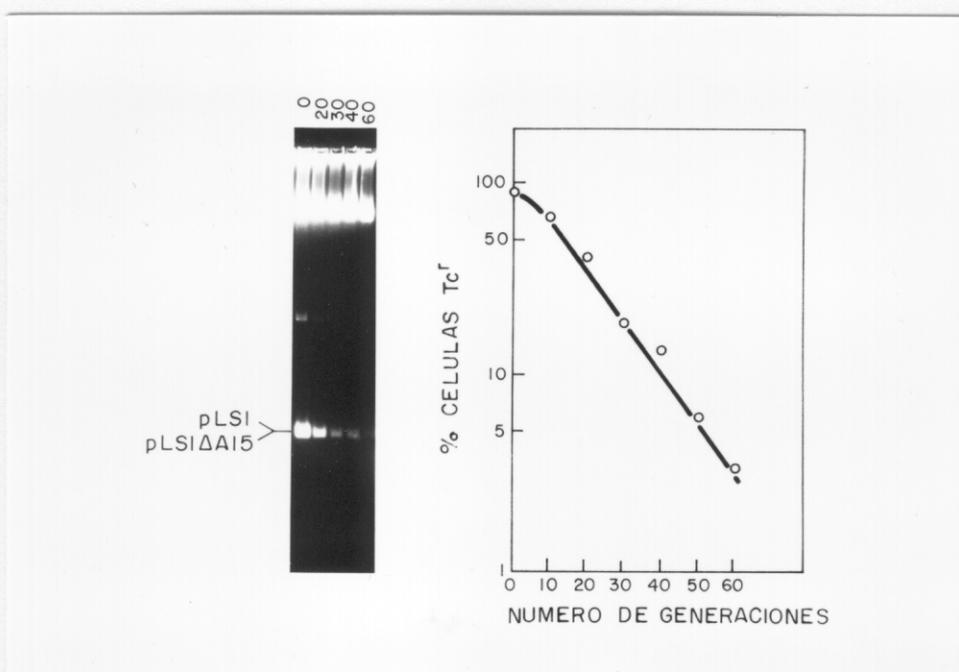


Figura 17. Actividad de RepB en *trans*. Se analizaron células de *S.pneumoniae* conteniendo pLS1 y pLS1 Δ A15, en condiciones de crecimiento sin presión selectiva durante las generaciones indicadas. Se obtuvieron preparaciones de DNA total a estas generaciones y se analizaron en geles de agarosa al 1.2%. Para los mismos cultivos se determinó, mediante siembra en placa, el porcentaje de células Tc^r. Los resultados se representaron en función del número de generaciones en ausencia de presión selectiva.

La estructura genética de pLS1 Δ A15 sugiere que no es un plásmido auto-replicativo, aunque puede replicar cuando RepB se suplementa *en trans*. Para comprobar esta hipótesis, intentamos separar pLS1 Δ A15 del pLS1 acompañante mediante una doble digestión *BanI-BstXI* que permite diferenciar los fragmentos pequeños de pLS1 (700 pb) y de pLS1 Δ A15 (605 pb). Los fragmentos correspondientes a pLS1 Δ A15 se purificaron, y el plásmido se reconstituyó mediante ligación. Se usó un cuarto de la ligación para transformar cultivos competentes de *S.pneumoniae* sin plásmido, obteniéndose tan sólo 730 transformantes/ml. El análisis del contenido de DNA plasmídico de varios clones reveló que la mayoría de ellos albergaban pLS1 Δ A15 acompañado de pLS1. En otros casos apareció pLS1 sólo, quizás debido a contaminación de bandas durante la extracción. Otra parte de la ligación que reconstituye pLS1 Δ A15 se utilizó para transformar células de *S.pneumoniae* con el plásmido pJS3*cop7* como residente (pJS3 está basado en el replicón pLS1 y lleva como marcador de selección el gen *cat* de pC194). Se escogieron dos clones que presentaban ambos plásmidos y se crecieron durante 60 generaciones más, seleccionando para el plásmido entrante (Tc') o para el plásmido residente (Cm') o bien en ausencia de presión de selección. Cuando se seleccionó para el plásmido entrante (pLS1 Δ A15, Tc'), como sería lógico suponer, no se observó ninguna pérdida del plásmido residente (pJS3*cop7*, Cm') ya que este plásmido es el que proporciona RepB *en trans* a pLS1 Δ A15. En los otros dos casos se observó una pérdida inicial de pLS1 Δ A15 (sólo el 85% de las células fueron Tc'). Esta pérdida se incrementó tras sucesivas generaciones: el porcentaje de células Tc' fue del 34% cuando se seleccionó para el plásmido residente y sólo del 9% en ausencia de presión selectiva para ambos plásmidos (no mostrado). Quedaría por explicar por qué pLS1 Δ A15 se mantiene en un alto número de copias (aproximadamente 55) al estar acompañado de pLS1 (que reduce su número de copias a 15) ya que el primero no parece utilizar mejor la proteína RepB que pLS1 en ensayos *in vitro* (ver más adelante). No obstante, los resultados demuestran que RepB es activa *en trans*.

El plásmido pFX2 de *L.lactis* (Xu *et al*, 1991), de la familia de pLS1, se pudo transferir a *S.pneumoniae* con eficiencia relativamente alta. Se determinó el número de copias de pFX2 en este huésped preparando extractos de DNA total de cultivos de *S.pneumoniae* que contenían los plásmidos pLS1, pLS1*cop7*, pLS1 Δ 24*cop7*, pLS5

y pFX2. Distintas cantidades de los extractos totales se analizaron en un gel de agarosa (1.2% en TAE). Se realizaron densitometrías de los negativos, calculándose el número de copias de pFX2 por comparación con los valores conocidos de pLS1 (22 copias) y pLS1*cop7* (120 copias). Se observó que pFX2 en *S.pneumoniae* presenta, aproximadamente, unas 11 copias por equivalente cromosómico (no mostrado). Asimismo, se determinó la estabilidad segregacional de pFX2. Para ello, se preparó un cultivo inicial, crecido hasta una $DO_{650} = 0.5$ en presencia de Cm (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el cual se consideró como generación $g=0$. A partir de este cultivo, se realizaron diluciones sucesivas en medio sin presión selectiva durante una serie de generaciones, hasta $g=100$. Cada 10 generaciones se tomaron muestras del cultivo para analizar su contenido de DNA plasmídico y para las generaciones 0, 40, 60 y 100 se calculó el porcentaje de células con plásmido mediante recuento en placas con y sin presión selectiva. Se comprobó que, tras 100 generaciones en medio sin presión selectiva, pFX2 se mantiene estable (95% de Cm') en *S.pneumoniae* (resultados no mostrados).

Puesto que pLS1 y pFX2 presentan una alta homología en su región *nic* y en sus proteínas Rep, pero no en sus elementos de control (ctRNAs y proteínas Cop), resultaba interesante conocer su comportamiento cuando coexistiesen en el mismo huésped. Los estudios de incompatibilidad se realizaron en ambas direcciones, es decir, utilizando como plásmido entrante (donador) tanto pLS1 como pFX2, en estirpes de *S.pneumoniae* que ya contenían uno u otro de los plásmidos como residentes. Inicialmente la selección se realizó para el plásmido donador (Cm para pFX2 y Tc para pLS1) y se pudo comprobar que, en todos los casos, el número de transformantes fue mayor al utilizar pFX2 como plásmido donador. Tras realizar las correcciones oportunas por las diferencias en la competencia de ambos cultivos (transformaciones cromosómicas $T4/pLS1 = 6.1 \times 10^5 \text{ mal}'/\text{ml}$ y $T4/pFX2 = 3.5 \times 10^6 \text{ mal}'/\text{ml}$), se observó que la eficiencia de establecimiento de pFX2 fue unas 200 veces mayor que la de pLS1. Esta diferencia podría deberse, quizás, a que el gen *cat* (pFX2) se estuviese expresando mejor en *S.pneumoniae* que el gen *tet* (pLS1). No obstante, esta hipótesis se descartó comprobando que pC194*cop* (con el mismo gen *cat* que pFX2) se estableció con la misma o menor eficiencia que pLS1 en pneumococos (resultados no mostrados). La incompatibilidad ejercida por pFX2 sobre pLS1 se analizó por transformación de un cultivo competente de *S.pneumoniae* conteniendo

pLS1 (plásmido residente) con DNA de pFX2. Los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante, analizándose el contenido de DNA total de varios clones. Encontramos tres situaciones iniciales: i) disminución del número de copias de pLS1 (clon 5), ii) pérdida acusada de pLS1 (clones 1 y 2), iii) ausencia de pLS1 (clones 3, 4 y 6). Se escogió un clon representativo de cada una de las situaciones iniciales ($g=0$) y mediante diluciones sucesivas, se crecieron durante 60 generaciones en medio con presión selectiva para el plásmido entrante (pFX2). Como control se creció un cultivo de *S.pneumoniae* con pLS1 en medio sin presión selectiva. Se analizó el contenido de DNA total de los tres clones elegidos (clones 1, 3 y 5) en la generación inicial ($g=0$) y tras 60 generaciones más en medio con Cm ($g=60$), y cada 10 generaciones se calculó el porcentaje de células que contenían pLS1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18A y los valores determinados para la presencia de pLS1 (residente) en cada caso y generación, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Incompatibilidad ejercida por pFX2 hacia pLS1.

Nº Clon	% Células Tc ^f en la generación		L _{ex}
	g= 0	g= 60	
5	44	32	0.005
1	25	9.6	0.016
3	0.02	0.00025	>0.076

Estos resultados sugieren que durante el establecimiento de pFX2 se produce incompatibilidad hacia el plásmido pLS1 residente. Una vez establecidos ambos plásmidos, los clones que contenían pLS1 en cantidades detectables (clones 1 y 5) se crecieron en medio sin presión selectiva o seleccionando para el plásmido residente (Tc) durante 60 generaciones más. En el primer caso, no se observó pérdida apreciable de ninguno de los plásmidos, mientras que cuando la selección se realizó para pLS1 se observó que el número de copias de éste fue aumentando hasta más del doble del valor original (resultados no mostrados). Para estudiar la situación inversa, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pFX2 con DNA de pLS1 y se

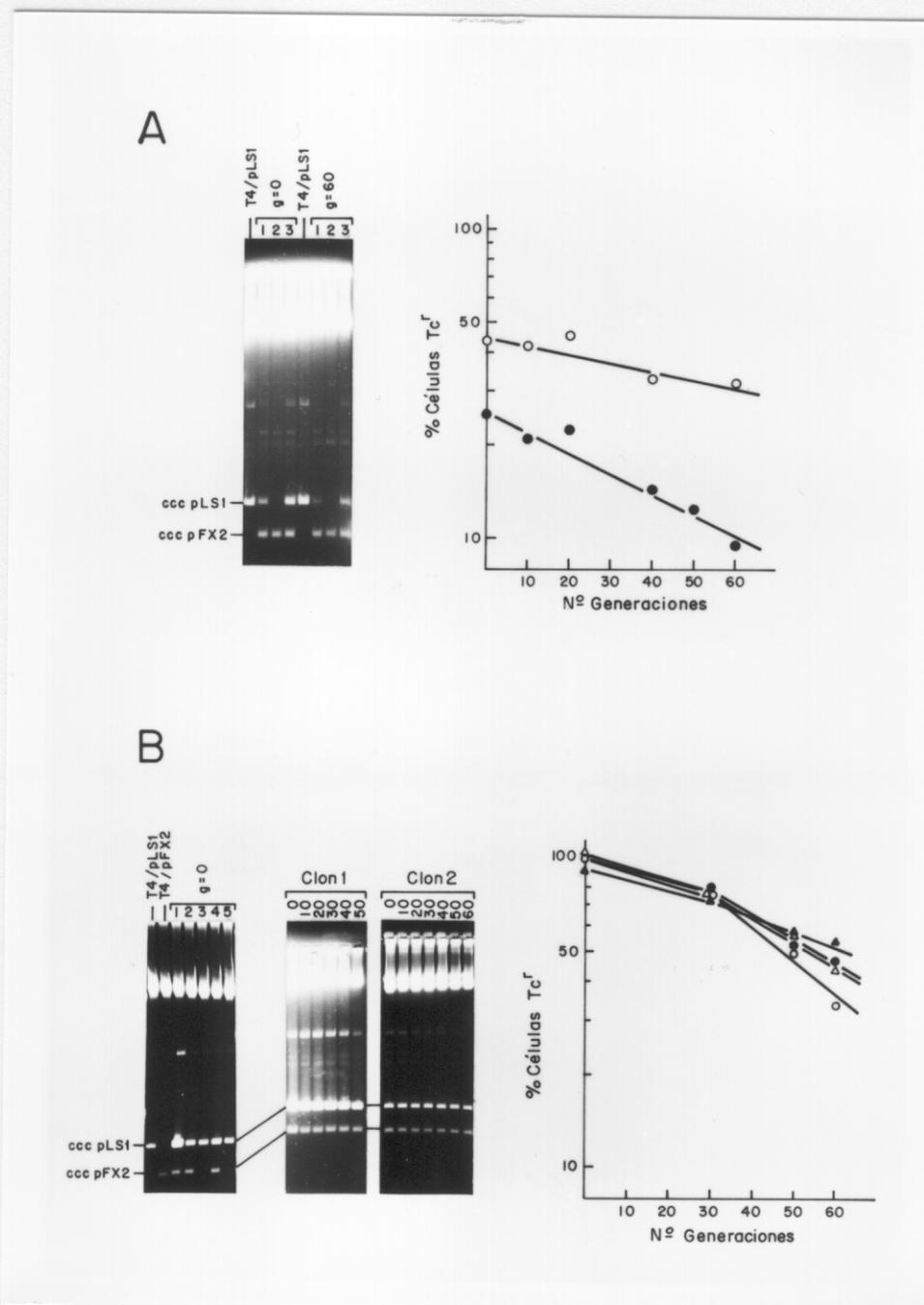


Figura 18. Incompatibilidad entre pLS1 y pFX2 en *S.pneumoniae*. **A.** Células de *S.pneumoniae* con pLS1 se transformaron con pFX2 y los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante. Se escogieron tres clones (1, 3 y 5) que fueron crecidos en medio con Cm ($g=0$) y por diluciones sucesivas en este medio se crecieron durante 60 generaciones más ($g=60$). Como control se incluyó un cultivo de *S.pneumoniae* con pLS1. Se analizó el contenido de DNA total a la $g=0$ y $g=60$ de cada clon en geles de agarosa al 1.2% y se representó gráficamente el porcentaje de células Tc^r para cada 10 generaciones del cultivo seleccionando para Cm. **B.** Cultivo de *S.pneumoniae* conteniendo pFX2 como plásmido residente se transformó con DNA de pLS1. Los transformantes se seleccionaron para el plásmido entrante y fueron crecidos durante 60 generaciones en medio con Cm (selección para el plásmido residente). Se analizó el contenido de DNA total de varios clones a la $g=0$ y $g=60$ en geles 1.2% agarosa. Representación gráfica del porcentaje de células Tc^r (que contienen el plásmido entrante) en varios clones seleccionados, a las generaciones indicadas de crecimiento en medio selectivo con Cm.

seleccionó para el marcador del plásmido entrante (Tc). El análisis de los transformantes nos mostró cuatro situaciones iniciales: i) presencia de los dos plásmidos en su número de copias normal (clones 2' y 4'); ii) aumento acusado del número de copias de pLS1 y valor normal para pFX2 (clones 1, 2, 3, 6, 8, 1', 7' y 10'); iii) disminución del valor de N de pFX2 y valor normal para pLS1 (clon 12'); y iv) ausencia de pFX2 (clones 4, 5, 7, 3', 5', 6', 8', 9' y 11'). Se analizaron las situaciones que presentaban ambos plásmidos y un valor de N normal para el pFX2. Cuando se seleccionó para el plásmido entrante (pLS1) en aquellos clones que presentaban un alto número de copias de pLS1, no se observó pérdida del plásmido residente (pFX2) y se mantuvo el valor de N para pLS1, durante las primeras 30 generaciones. De igual forma, en los clones con un valor normal de N para ambos plásmidos, la situación se mantuvo estable al seleccionar para el plásmido entrante (no mostrado). Si la selección se invierte (seleccionando ahora para el plásmido residente, pFX2), el número de copias del pLS1 se mantuvo prácticamente igual en los clones que presentaban ambos plásmidos con un valor de N normal, pero disminuyó claramente en aquellos clones que presentaban inicialmente un valor N alto para pLS1; el valor medio para la tasa de pérdida en estos clones fue de $L_{cx} = 0.015$ (Fig 18B).

Los resultados sugieren que existe una débil incompatibilidad entre plásmidos que comparten homologías en el *dso* y que esta incompatibilidad parece ejercerse más fuertemente durante el establecimiento plasmídico que una vez establecida la situación heteroplasmídica.

Replicación conducida por la proteína RepB

A continuación, se realizaron intentos para conseguir la replicación conducida de plásmidos recombinantes que llevan el *dso* entero de pLS1 (pCGA11 y pCGA12) suministrando RepB en *trans*. Para ello, se realizaron dos ensayos: i) delección de parte del gen *rep* de pC194*cop*, y ii) delección de la horquilla del *dso* de pC194*cop*. En primer lugar, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae* con DNA de pLS1*cop*7 (110 copias) como plásmido donador de RepB en *trans*, y estos cultivos se pusieron, a su vez, competentes. La delección del gen *rep* de pC194*cop* se realizó por digestión de DNA de pCGA11 (5 μ g) con *Nsi*I, ya que dentro del gen *rep* se encuentran dos sitios *Nsi*I separados aproximadamente 460 pb (Fig. 19). El fragmento

grande de pCGA11/*Nsi*I fue extraído de un gel de agarosa y recircularizado. Se usó la mitad de la ligación para transformar *S.pneumoniae* con pLS1*cop*7 y se seleccionó en medio sólido suplementado con Tc y Cm. No se obtuvo ningún transformante. Se realizó una nueva transformación con el resto de la ligación con el mismo resultado negativo.

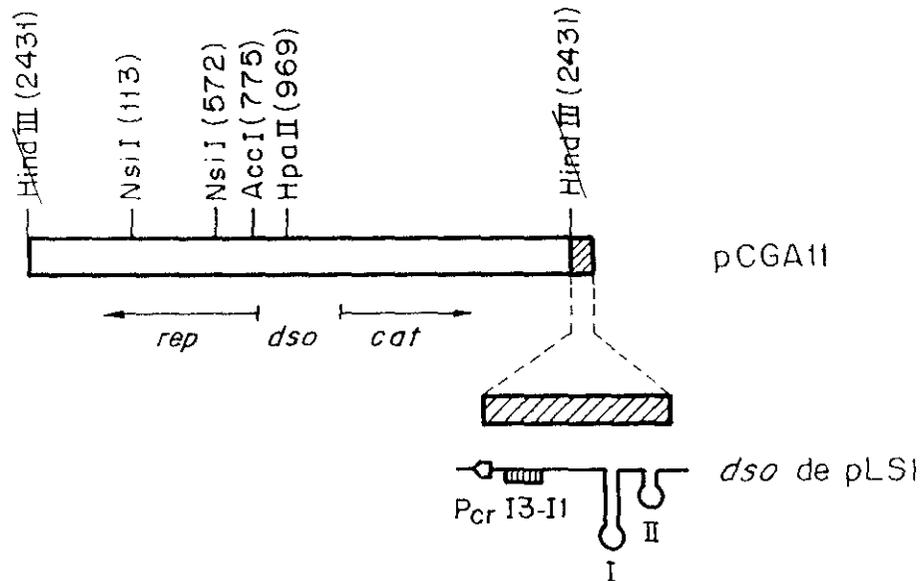


Figura 19. Mapa físico y funcional del plásmido recombinante pCGA11, en el que se muestra el fragmento de pLS1 clonado en el sitio *Hind*III único de pC194*cop*. Se indican los sitios de restricción más relevantes y las coordenadas de corte en pC194*cop*. Se indica asimismo, la localización de los genes *rep* y *cat* y del origen de replicación (*dso*) de pC194*cop*. Debajo del fragmento de pLS1 se muestra la posición de las Horquillas I y II, los tres iterones (II-III) y el promotor P_{cr} .

El segundo intento para conducir replicación se hizo mediante delección del *dso* de pC194*cop*, la cual se llevó a cabo por doble digestión *Acc*I-*Hpa*II de pCGA11 (Fig. 19). De esta manera, se elimina un fragmento de 194 pb que contiene el origen de replicación de pC194*cop*. El fragmento grande de pCGA11/*Acc*I-*Hpa*II se purificó, se rellenaron los extremos 5'-protuberantes y se recircularizó el plásmido. Tampoco este experimento tuvo éxito, ya que no se obtuvieron transformantes. Por tanto, y con las salvedades de los resultados negativos, concluimos que no se puede construir un plásmido basado en el replicón de pC194 que lleve solamente el *dso* de pLS1 y cuya replicación sea conducida por RepB suministrada en *trans*.

Utilizando el plásmido pFX2, se realizaron dos nuevos ensayos con la intención de conducir la replicación de este plásmido, suministrando en *trans* la proteína RepB de pLS1. El primer intento consistió en eliminar 109 aa (47%) de la región N-terminal de la proteína RepX de pFX2. Para ello, se eliminó el fragmento pequeño *Bst*UI-*Nde*I de 385 pb (328 de los cuales pertenecían al gen *repX*). Tras purificar el fragmento mayor, rellenar los extremos 5'-protuberantes con Pol IK y ligar, se transformó un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pLS1. Todos los clones analizados (22 clones) contenían un pFX2 intacto. En el segundo ensayo se digirió DNA de pFX2 con *Nde*I, sitio único situado hacia la mitad del gen *repX*. El relleno de los extremos introduce 2 pb, cambiándose el marco de lectura de *repX* e introduciéndose un codón de terminación. Después de transformar un cultivo competente de *S.pneumoniae*/pLS1, se analizaron 20 clones. Sólo tres de ellos contenían pFX2 y los tres poseían un sitio *Nde*I intacto, mientras que el resto de los clones *Cm*^r no mostraron plásmido. También se realizó un intento para conducir la replicación de pLS1 suministrando en *trans* la proteína RepX de pFX2. En este caso, se intentó introducir un codón de terminación en la región N-terminal de RepB, digiriendo con *Bst*XI (sitio único en la coordenada 914 de pLS1) y rellenando los extremos (con lo cual se introducirían 4 pb nuevas). La ligación se volvió a digerir con *Bst*XI, obteniéndose el mismo resultado negativo que en el caso anterior, ya que no se consiguió ningún transformante de *S.pneumoniae*/pFX2 que tuviese los mutantes deseados de pLS1.

Concluimos, por tanto, que a pesar de los repetidos intentos empleando diversas estrategias, no se ha podido, hasta el momento, conducir replicación de pLS1 suministrando RepX de pFX2 en *trans* o viceversa, ni conducir replicación del *dso* de pLS1.

4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RepB

Para purificar la proteína RepB se empleó el sistema de clonaje vector pET5/huésped *E.coli* BL21(DE3), descrito por Studier y Moffatt (1986), buscando con ello una hiperexpresión específica del gen *repB*. La estirpe BL21(DE3) contiene un profago defectivo de λ , que lleva el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor inducible *lacUV5*. A su vez, el vector pET5 contiene el promotor $\phi 10$, que es reconocido específicamente por la RNA polimerasa de T7 y bajo el cual se clona el gen que se quiere expresar. Empleamos la estirpe BL21(DE3) que contiene el plásmido pLS19 (Fig. 20; del Solar *et al*, 1989). Este plásmido es un derivado de pLS21 (híbrido formado por pLS5 y pET5, unidos en sus sitios *EcoRI* únicos; del Solar *et al*, 1989) al que se le delecionaron los dos fragmentos *BclI* menores situados en el interior del gen *tet* de pLS5. En trabajos anteriores (de la Campa *et al*, 1990; del Solar, 1991) se ensayaron diferentes condiciones de inducción con IPTG y de tratamiento con Rif, así como distintas construcciones de plásmidos con el fin de obtener el mejor rendimiento de RepB. Esto se consiguió usando la estirpe BL21(DE3) que contiene el plásmido pLS19 y realizando una inducción de 30 min a 37°C con 1 mM IPTG seguida por un tratamiento con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Rif durante 90 min a 37°C. Para la purificación de RepB se siguió el método descrito por de la Campa *et al* (1990) con las modificaciones indicadas en Materiales y Métodos.

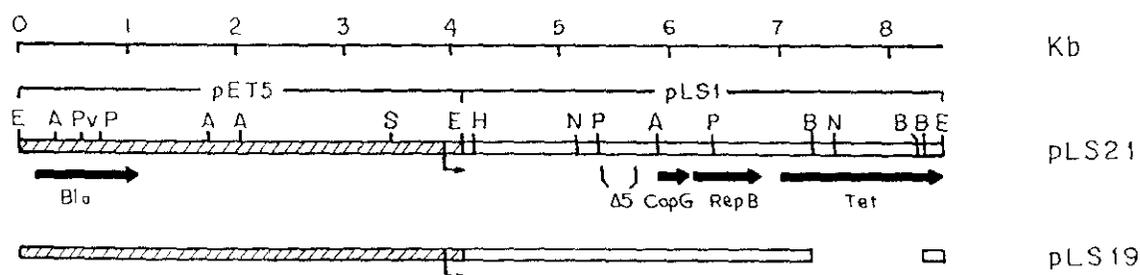


Figura 20. Mapa físico y funcional del plásmido recombinante pLS19, utilizado para la hiperexpresión de *repB*. El plásmido pLS21 es un híbrido entre pET5 y pLS5. En el mapa se indica la posición y dirección de transcripción (\rightarrow) del promotor $\phi 10$, la región de pLS1 delecionada en pLS5 ($\Delta 5$), los productos génicos *Bla*, *CopG*, *RepB* y *Tet* (\Rightarrow) y algunos sitios de restricción (E: *EcoRI*, A: *ApaI*, Pv: *PvuI*, P: *PstI*, S: *SalI*, H: *HindIII*, N: *NcoI*, B: *BclI*). La región delecionada en el plásmido pLS19 se muestra como una zona hueca.

Se partió de 2 l de cultivo, crecido a una $DO_{600} = 0.45$. En este momento se indujo con IPTG y se incubó a $37^{\circ}C$ durante 30 min, seguido de adición de Rif e incubación durante 90 min. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón H (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT y 5% EG) suplementado con 150 mM KCl. Se lisaron las células, y los ácidos nucleicos y proteínas asociadas a ellos se eliminaron por precipitación con 6% de sulfato de estreptomicina (Sm). La fracción proteica se recogió por centrifugación, tras una precipitación con sulfato amónico al 70% de saturación. El sedimento se disolvió en tampón H suplementado con 300 mM KCl y se dializó frente a 1 l del mismo tampón. El contenido de la bolsa de diálisis presentaba un aspecto ligeramente turbio. Por ello, las proteínas precipitadas se separaron de las solubles por centrifugación y se analizaron mediante SDS-PAGE. La proteína RepB se detectó mayoritariamente en el sobrenadante. A continuación, se dializó este sobrenadante frente a 1 l de tampón H sin KCl. El contenido de la bolsa de diálisis presentaba un aspecto turbio, por lo

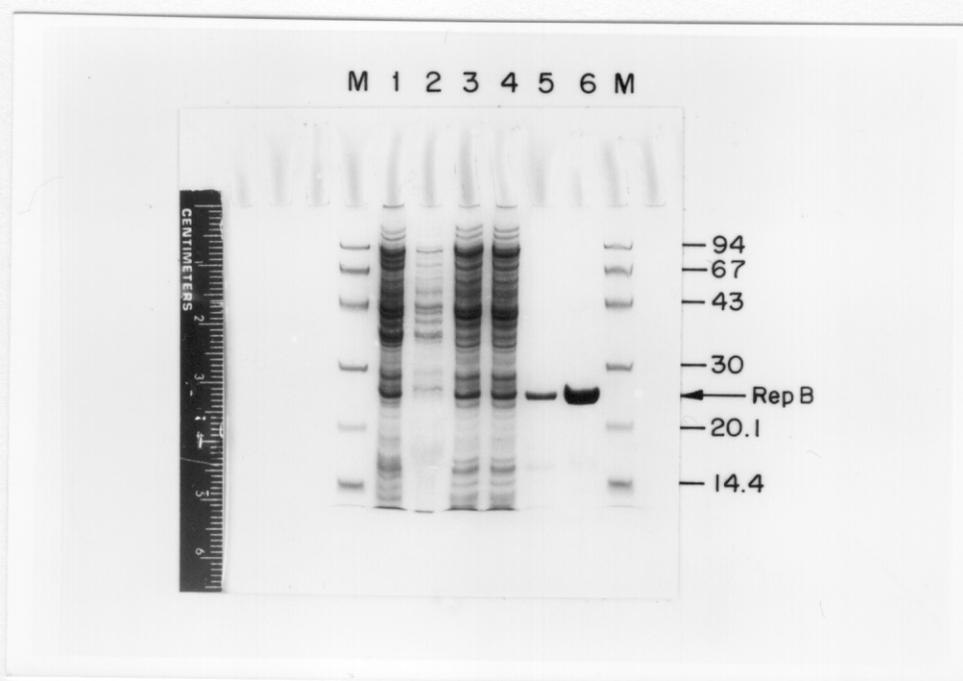


Figura 21. Etapas de la purificación de la proteína RepB analizadas mediante SDS-PAGE (12% PAA). En el gel se cargaron muestras ($3 \mu l$) correspondientes a: (1) extracto crudo, (2) sobrenadante de la etapa de precipitación con sulfato de Sm, (3) fracción precipitada con sulfato amónico y (4) fracción dializada frente a 0.3 M de KCl. Asimismo, se cargaron: (5) $1.5 \mu l$ de una muestra de $100 \mu l$ precipitada con TCA obtenida de la primera columna de heparina-agarosa y (6) $3 \mu l$ de una muestra de $50 \mu l$, conteniendo RepB pura, obtenida de la segunda columna de heparina-agarosa. Como control de tamaño se utilizó un patrón de proteínas estándar (M).

Tabla 6. Resumen de las etapas de purificación de RepB. La determinación de las concentraciones proteicas de cada una de las distintas etapas de purificación se realizó utilizando el sistema BCA (Pierce).

Etapa de purificación	Muestra		Valores totales	
	A ₁ -A ₀	[μ g/ml]	Volumen(ml)	Proteína(mg)
Extracto crudo	0.473	400	20	240.0
Sulfato de Estreptomicina	0.651	560	26	218.0
Sulfato amónico	0.314	270	22	178.0
1ª Diálisis	0.273	230	15	103.5
1ª Heparina-agarosa	0.044	110	20	3.0
2ª Heparina-agarosa	-	-	6	0.3

cual, se separaron por centrifugación las proteínas solubles de las insolubles (o con muy baja solubilidad) en estas condiciones. Nuevamente, se analizó el precipitado y el sobrenadante mediante SDS-PAGE y se observó un gran enriquecimiento de RepB en el precipitado. A continuación, se disolvió el precipitado en 20 ml de tampón H suplementado con 300 mM KCl y se cargó en una columna de heparina-agarosa equilibrada con el mismo tampón. Las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron con un gradiente lineal de tampón H con KCl (300 a 600 mM), recogiendo fracciones de 2 ml. De las fracciones 68 a 88 (que incluían un pico proteico) se tomaron muestras de 100 μ l, se precipitaron con acetona o con TCA, y las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE. El rendimiento obtenido en la precipitación fue mucho mayor con TCA. Se eligieron las fracciones 80 a 89 y se cargaron en una segunda columna de heparina-agarosa. La elución se realizó con un gradiente lineal de KCl (0.3 a 1 M), recogiendo fracciones de 2 ml. Se analizaron 50 μ l de las fracciones 63 a 69 correspondientes al pico proteico, precipitándolas con TCA y se eligieron las fracciones 64, 65 y 66 por su mayor concentración de RepB y gran pureza (>95%). Para su conservación, la proteína RepB pura se repartió en alícuotas de 50 μ l que se congelaron inmediatamente a -70°C (Fig 21; Tabla 6). La proteína mantuvo su actividad por lo menos un año en estas condiciones.

5. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR Y COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE RepB

La concentración de la proteína RepB purificada se calculó a partir del análisis de su composición de aa realizado por el Servicio de Química de Proteínas del CIB (Tabla 7). Aunque hubo problemas en la determinación de Trp y Arg, los valores obtenidos experimentalmente se ajustaron fielmente a los valores esperados. La concentración calculada para RepB fue de 45 ng/ μ l. En una segunda purificación de RepB, se obtuvo una preparación de 55.8 ng/ μ l, cuya concentración se calculó por densitometría de geles SDS-PAA teñidos con CBB. Se calculó el coeficiente de extinción molar teórico de RepB a partir del valor del número de residuos por el coeficiente de extinción a $\lambda=280$ para los aa Trp, Tyr y Phe respecto a la masa molecular de RepB (ver Materiales y Métodos). El valor obtenido fue de 1.0235 ml $\text{mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Se realizó una medida de la absorbancia de RepB a 280 nm frente a tampón H suplementado con 425 mM de KCl; el valor obtenido fue de 0.179.

Tabla 7. Análisis de la composición de aminoácidos de RepB. El valor de la masa molecular de RepB determinado a partir de su secuencia es igual a 24252.2 Da. El volumen inyectado en el analizador fue de 50 μ l frente a un volumen total de muestra de 200 μ l. La cantidad de μ g hidrolizados fue de 42.91 μ g.

aa	nmol	ng	nº residuos	%	aa esperados	nmol/residuos
Asx	10.67	1228.47	24.13	11.04	25	0.43
Thr	5.24	530.16	11.86	5.42	11	0.48
Ser	4.70	409.11	10.62	4.86	10	0.47
Glx	9.66	1246.48	21.83	9.99	19	0.51
Pro	2.50	242.75	5.65	2.59	5	0.50
Trp	0.00	0.00	0.00	0.00	1	0.00
Gly	8.63	492.63	19.50	8.92	9	0.96
Ala	7.00	497.70	15.83	7.24	13	0.54
Val	5.85	579.77	13.23	6.05	16	0.36
Met	1.73	226.62	3.90	1.79	5	0.34
Ile	5.94	672.13	13.42	6.14	14	0.42
Leu	10.63	1203.65	24.04	11.00	24	0.44
Tyr	5.61	915.14	12.68	5.80	13	0.43
Phe	4.46	657.14	10.09	4.62	8	0.56
Lys	11.63	1491.56	26.30	12.03	25	0.46
His	2.44	334.21	5.51	2.52	5	0.49
Arg	0.00	0.00	0.00	0.00	7	0.00
Total	96.69	10727.50	218.58	100.01	210	Valor medio 0.459

6. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB MEDIANTE EQUILIBRIO DE SEDIMENTACIÓN

Para conocer la configuración nativa de la proteína RepB se llevaron a cabo experimentos de equilibrio de sedimentación, realizados a dos concentraciones distintas de proteína (0.02 y 0.04 $\mu\text{g/ml}$) y a 10°C (ver Materiales y Métodos). El cálculo de la masa molecular aparente de las distintas muestras fue corregido para el valor del volumen específico parcial (v) de la proteína (0.749 ml/g; calculado a partir de la composición de aa) y para el valor de la masa molecular del monómero de RepB (24252 Da, calculado a partir de los datos de secuencia). El resultado correspondiente a la masa molecular de RepB, determinada por equilibrio de sedimentación fue de 136000 ± 3500 Da (Fig 22), que se corresponde, aproximadamente, a la de un hexámero (valor igual a 6.056) de RepB (24252 Da de secuencia). El hecho de que al diluir a la mitad la concentración de proteína (0.02 $\mu\text{g/ml}$), la masa molecular disminuya (114000 ± 2700 Da) es indicativo de que RepB no es una especie única, probablemente debido a un equilibrio de homo-asociación (McRorie y Voelker, 1993). Experimentos adicionales realizados a temperaturas superiores (25 y 37°C) nos mostraron una pérdida acusada en la señal de absorbancia. Se comprobó que esto era debido a la adherencia de la proteína RepB a las paredes de las células utilizadas para los experimentos a esas temperaturas.

7. ACTIVIDAD TIPO TOPOISOMERASA I DE RepB: CONDICIONES ÓPTIMAS PARA SU ACTIVIDAD

Para comprobar la actividad de RepB sobre DNA superenrollado, se realizó un primer ensayo con el plásmido pLS1 Δ 24cop7, utilizando distintas concentraciones de DNA y proteína. Se realizó una mezcla inicial que contenía tampón B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 5 mM DTT), DNA de pLS1 Δ 24cop7 (concentración final de 28 ng/ μl) y 20 mM MnCl₂, manteniéndose durante 10 min a t.a. Distintas cantidades de esta mezcla inicial (entre 25 y 29.7 μl ; de 700 a 840 ng de DNA) recibieron distintas cantidades de RepB (11.2 a 135 ng) llevándolas a un volumen final de reacción de 30 μl . Se incluyeron cuatro muestras (entre 2.2 y 22.5

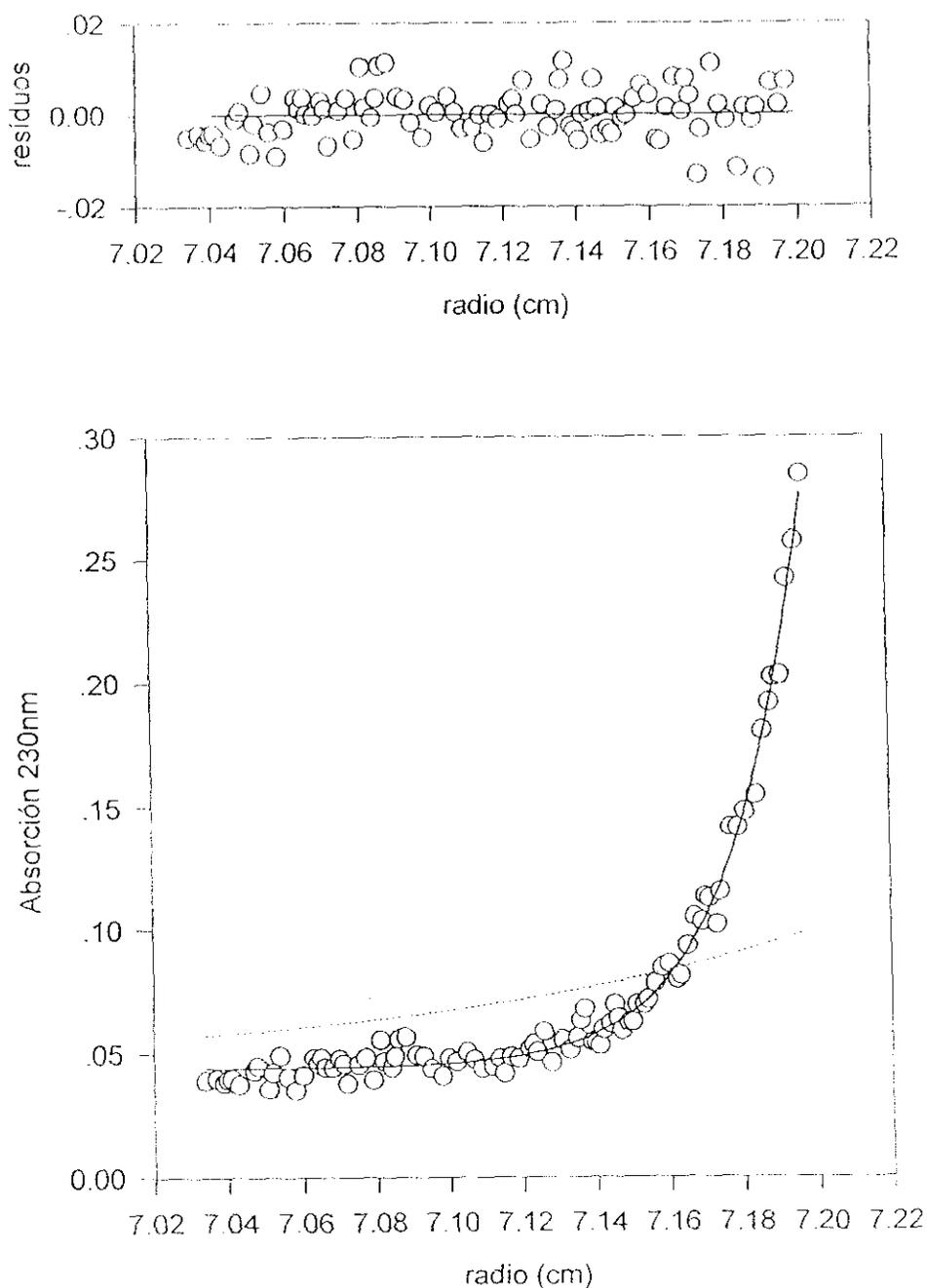


Figura 22. Panel inferior. Perfil de equilibrio de sedimentación de RepB ($0.04 \mu\text{g/ml}$). Distribución radial de absorbancias (230 nm) a 25000 rpm y 10°C . Los símbolos representan los puntos experimentales y la línea continua representa la distribución radial del mejor ajuste experimental a un modelo simple de equilibrio de sedimentación (136000 Da, ver Materiales y Métodos). A modo ilustrativo se indica con trazo discontinuo el perfil de equilibrio de sedimentación del monómero de RepB (24000 Da). Panel superior. Distribución de residuos en el ajuste estadístico.

ng de RepB) de la proteína diluida 10 veces en tampón D (tampón B suplementado con $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA). Todas las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C , y la reacciones se pararon con $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K, incubando durante 10 min a 20°C . Tras añadir el tampón de carga BXGE, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1% en tampón TBE con $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr), a un voltaje constante de 45 V durante 20 h. El gel fue fotografiado bajo luz UV y se realizó una densitometría del negativo con el fin de calcular el porcentaje de actividad de RepB. Puesto que RepB posee una actividad de corte/cierre tipo topoisomerasa I-5', su acción sobre DNA superenrollado circular covalentemente cerrado (formas CCC o FI) dará dos productos: formas circulares abiertas (OC o FII) como productos de la actividad de corte, y formas circulares relajadas (RC o FI) como productos de corte/cierre. Estas tres formas de DNA plasmídico poseen intensidades de fluorescencia diferentes, debido a que el EtBr se intercala de distinta manera entre ellas. Por ello, el rendimiento de los productos de corte/cierre de RepB se calculó por disminución de la señal de fluorescencia de la forma FI del DNA no tratado con RepB. También se observó que el KCl presente en el tampón de incubación, puede generar inespecíficamente una pequeña proporción de formas FII. Por ello, se calculó este porcentaje en la muestra no tratada y se restó en los cálculos realizados para las muestras incubadas con RepB.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo se muestran en la Figura 23. En ningún caso se consiguió una actividad total de RepB, ya que en todas las muestras se pudo observar una determinada cantidad de DNA superenrollado (formas FI). Hay que señalar que en las muestras tratadas con la proteína RepB diluida 10 veces no se observó actividad alguna, lo que indicaría que la dilución de la proteína en el tampón usado, conduce a su inactivación.

Para determinar diversos parámetros de la actividad de RepB, se estudiaron las condiciones óptimas de análisis de los productos de reacción. Asimismo, se hicieron otra serie de ensayos en los que se variaron las concentraciones de los distintos componentes de la reacción, los tiempos y las temperaturas de incubación. Se ensayó, además, la actividad de RepB en presencia o no de otras proteínas, de un inhibidor de la topoisomerasa I, y en presencia de algunos detergentes.

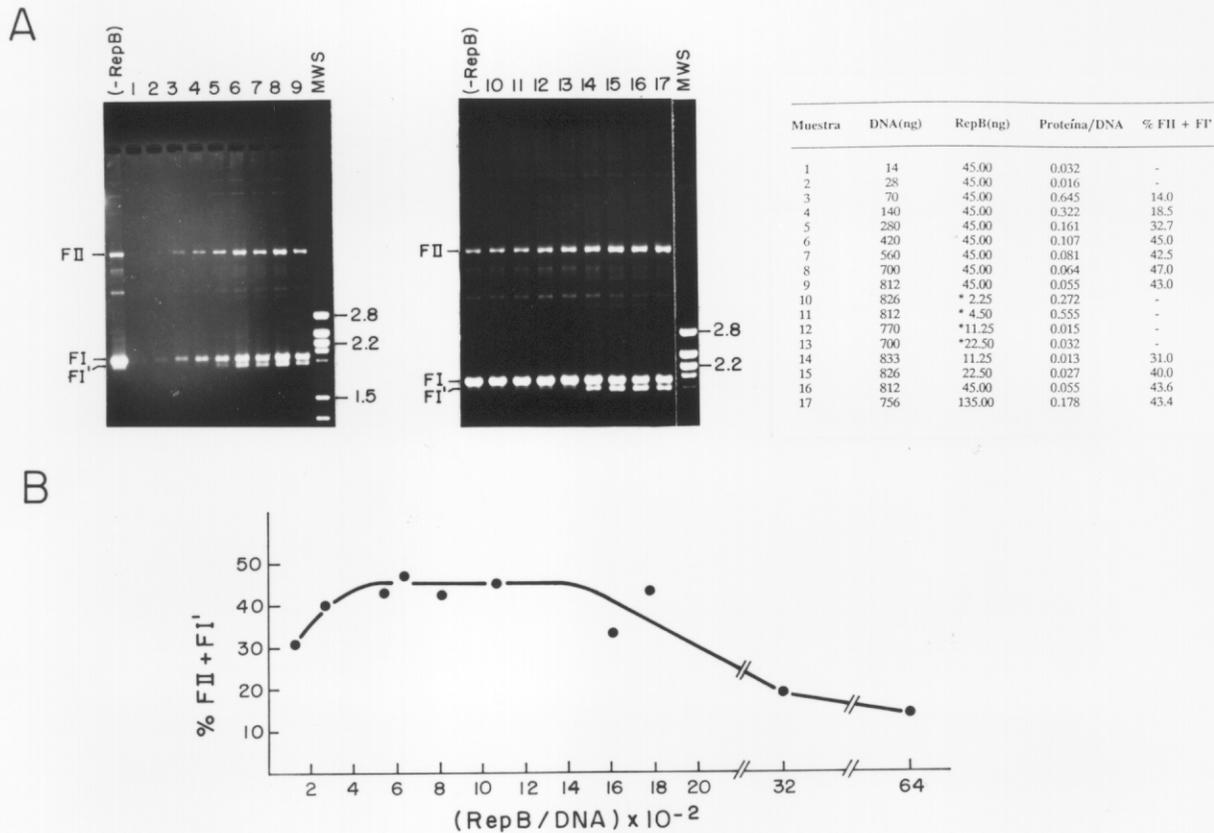


Figura 23. A. Actividad de la proteína RepB sobre DNA de pLS1 Δ 24*cop7* a concentraciones variables de DNA y proteína. En las muestras señaladas con un (*) se utilizó la proteína RepB diluida 10 veces en tampón D (ver texto). El símbolo (-) indica producto no detectable. Los ensayos se realizaron durante 30 min a 37°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TBE con 1 μ g/ml de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular cerrada y relajada; MWS: marcadores de peso molecular. **B.** Representación gráfica de los productos generados por RepB (% FII + FI') frente a la relación proteína/DNA utilizada en la reacción.

7.1. Condiciones de análisis de productos de reacción. Para optimizar los resultados se probaron distintas condiciones en el análisis de los productos de reacción: porcentaje de agarosa, concentración de EtBr y presencia o no de éste durante la electroforesis, tampón de electroforesis y duración de ésta, etc. Se realizó un ensayo de actividad de RepB (45 ng) sobre el plásmido pLS1 Δ 24*cop7* (810 ng) en presencia de tampón B con 20 mM MnCl₂ en un volumen final de 30 μ l. La mezcla se incubó 30 min a 37°C y se paró la reacción por adición de 125 μ g/ml de proteinasa K. Los

productos de reacción se analizaron en geles con distintos porcentajes de agarosa (0.7, 1, 1.5 y 2%). Asimismo, se ensayaron dos concentraciones distintas de EtBr (0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$), incluyéndolo en la preparación del gel y en el tampón de electroforesis (no mostrado). Los mejores resultados en cuanto a resolución y nitidez de bandas, se obtuvieron con el gel de agarosa al 1% que contenía 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr. A porcentajes mayores de agarosa, se obtuvo una mejor separación para las formas FI y FI', pero se observaba una difusión de las bandas a lo largo del gel, que dificultaría la cuantificación de los productos de reacción. En cuanto a la elección del tampón de electroforesis y duración de la misma, se optó por el tampón TBE, por su mayor estabilidad en electroforesis de larga duración, realizadas a voltajes bajos. Se observó una mayor resolución y separación de las bandas FI y FI' en las electroforesis que realizamos entre 2.5 y 3 V/cm (no mostrado); por ello, se optó por utilizar cubetas horizontales largas, voltajes bajos (30-40 V) y tiempos largos de electroforesis (16-20 h). De la misma forma, se realizaron geles en ausencia de EtBr en el tampón de electroforesis, que fueron teñidos posteriormente con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ EtBr. En estos casos, se observaron distintas bandas correspondientes a las formas FI', que migran en distintas posiciones entre la banda de formas FII y la banda de FI, y manifiestan su distinto grado de superenrollamiento, provocado por la presencia de EtBr. Los geles sin EtBr no se utilizaron cuando era necesario una cuantificación de los productos de reacción.

7.2. Concentración de sustrato. A partir de una mezcla inicial compuesta por DNA de pLS1 Δ 24*cop7* (a una concentración final de 28 ng/ μl), tampón B y 20 mM MnCl₂, se prepararon distintas muestras con cantidades variables de DNA (valores comprendidos entre 14 y 812 ng) y una concentración constante de proteína RepB (45 ng). Las reacciones se llevaron a un volumen final de 30 μl y se incubaron a 37°C durante 30 min, al cabo de los cuales se les añadió proteinasa K. Las muestras se analizaron por electroforesis y se calculó el porcentaje de moléculas (FII + FI'), productos de la actividad de RepB (no mostrado). El mayor porcentaje de actividad con 45 ng de RepB se consiguió con 700 ng de DNA, siendo el cociente DNA/proteína igual a 15.5.

7.3. Concentración de proteína. Para analizar el efecto de la concentración de RepB sobre su actividad, se prepararon varias muestras con una cantidad constante de DNA de pMV158 (700 ng), a las cuales se les añadió una cantidad variable de proteína (entre 11.2 y 112.5 ng; Fig. 24B). Las reacciones se llevaron a cabo de la misma forma que la vez anterior. Con el fin de obtener un mayor porcentaje de formas (FII + FI') frente a las moléculas FI (sobre las que RepB no ha actuado), se realizó un segundo experimento disminuyendo la cantidad de DNA sustrato (232 ng) y utilizando cantidades de proteína comprendidas entre los 45 y 112.5 ng (Fig. 24A). En ninguno de los casos, el porcentaje de actividad superó el 30% de formas (FII + FI').

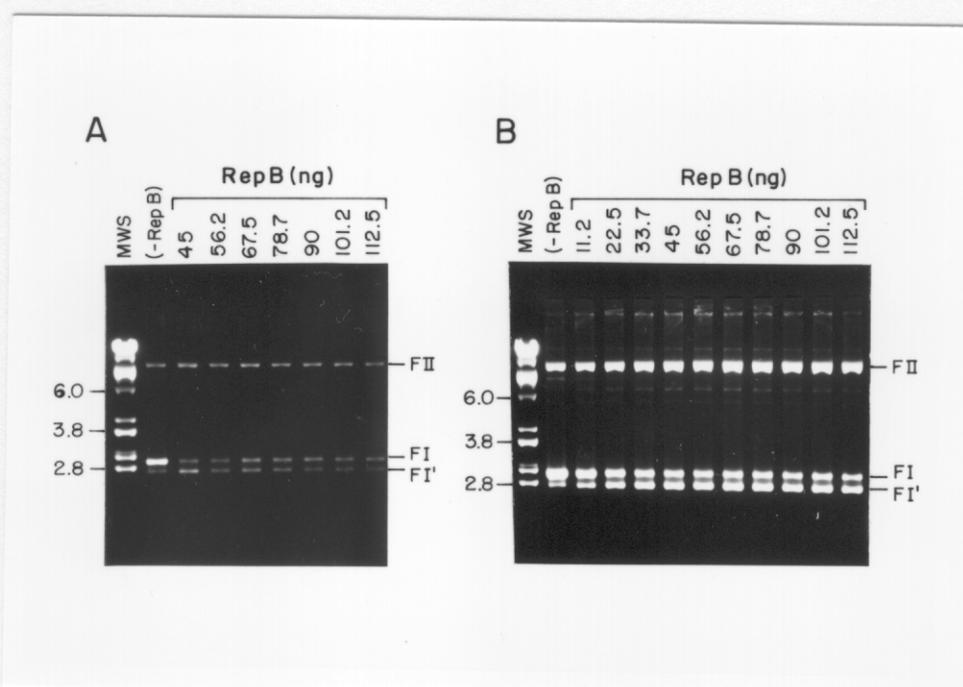


Figura 24. Efecto de la concentración de RepB en su actividad sobre DNA sustrato superenrollado. **Gel A.** Ensayo de actividad sobre 232 ng de DNA de pMV158 y las siguientes concentraciones de RepB: 45, 56.2, 67.5, 78.7, 90, 101.2, 112.5 ng. **Gel B.** Ensayo de actividad sobre 700 ng de DNA de pMV158 y las siguientes cantidades de RepB: 11.2, 22.5, 33.7, 45, 56.2, 67.5, 78.7, 90, 101.2, 112.5 ng. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE con 0.5 µg/ml de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular cerrada y relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

7.4. Temperatura de incubación. Se prepararon varias muestras con DNA de pMV158 (700 ng), tampón B, 20 mM MnCl₂ y 45 ng de RepB. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperaturas comprendidas entre 28 y 60°C, y las reacciones se

pararon como en los ensayos anteriores. Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr y se calculó el porcentaje de actividad de RepB a las temperaturas indicadas (Fig. 25). Los mayores porcentajes de formas FII + FI se obtuvieron a temperaturas superiores a los 45°C. Para ensayos posteriores, se eligieron las temperaturas de 37, 45 y 60°C.

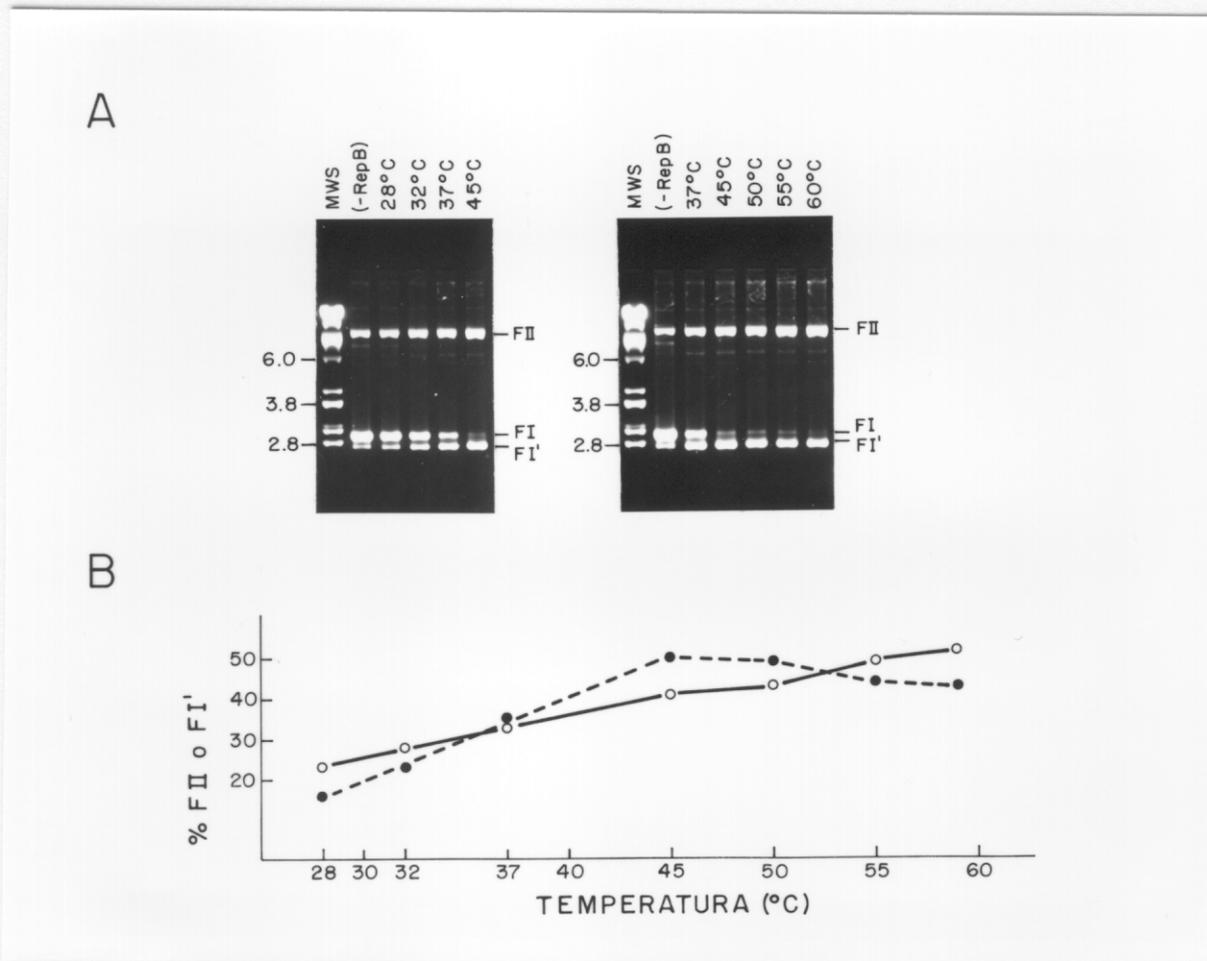


Figura 25. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de RepB en DNA superenrollado. **A.** Ensayos de actividad: 700 ng de DNA de pMV158 se incubaron con 45 ng de RepB durante 30 min a las siguientes temperaturas: 28, 32, 37, 45, 50, 55 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr. **B.** Representación gráfica de los productos de reacción generados por RepB [FII (○) o FI (●)] para cada una de las temperaturas ensayadas.

7.5. Influencia de la concentración de KCl en el tampón de incubación sobre la actividad de RepB. En este caso, DNA de pLS1 (420 ng) se trató con 27 ng de RepB en presencia de 20 mM MnCl_2 y tampón B suplementado con distintas concentraciones de KCl (de 0.1 a 0.5 M). Las muestras se prepararon por triplicado

y fueron incubadas durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis y se calcularon los porcentajes de formas FII + FI obtenidos en cada caso. Como el KCl puede generar inespecíficamente formas FII, se prepararon muestras con las distintas concentraciones de KCl, que no fueron tratadas con la proteína, pero sí se incubaron durante el mismo tiempo a las temperaturas indicadas. Se observó que la actividad de cierre de RepB se inhibe a concentraciones de KCl entre 250 y 300 mM (Fig. 26). En presencia de KCl aparecen formas FII inespecíficas, que van en aumento hasta alcanzar una concentración de KCl de 300 mM.

7.6. Influencia de cationes en la actividad de RepB. Se realizó un ensayo con 700 ng de DNA de pMV158 y 45 ng de RepB, en tampón B suplementado con 20 mM $MnCl_2$ o con 20 mM $MgCl_2$. Las muestras se incubaron 30 min a 60°C y las reacciones se pararon con proteinasa K. RepB no presentó actividad detectable de corte/cierre en presencia de 20 mM $MgCl_2$. En un ensayo distinto se probaron tres concentraciones de $MnCl_2$ (5, 20 y 50 mM) mezclando la proteína (18 ng) con tampón B y el catión durante 5 min a t.a., precalentando o no a tiempos cortos a 60°C. Las reacciones se iniciaron por adición de DNA de pMV158 (280 ng) y se incubaron 5 min a 60°C (ver apartado de tiempos de reacción). Sólo se observó algo de actividad en las muestras precalentadas 15 y 30 segundos a 60°C, con 20 mM de $MnCl_2$. La proteína RepB en ausencia de $MnCl_2$ no manifiesta actividad de corte/cierre sobre DNA plasmídico. Otros cationes ensayados (Ca^{2+} , Zn^{2+}) no mostraron influencia alguna en la actividad de RepB (resultados no mostrados).

7.7. Actividad de RepB en presencia de camptotecina. La camptotecina es un inhibidor específico de la topoisomerasa I eucariótica. Su acción se ejerce estabilizando las formas OC (circulares abiertas o FII) unidas a proteína (Hsiang *et al*, 1985; Avemann *et al*, 1988), con lo cual impide que la topoisomerasa I pueda completar su acción y cerrar la molécula. Como RepB presenta una actividad de corte/cierre similar a la que realiza la topoisomerasa I, se pensó que la camptotecina podría actuar de igual forma sobre ambas enzimas. Para comprobar esto, se realizó un ensayo de actividad de RepB (18 ng) sobre DNA de pLS1 (280 ng) en presencia de tres concentraciones de camptotecina (54, 108 y 216 μM). Además de los controles I (sin RepB) y II (sin

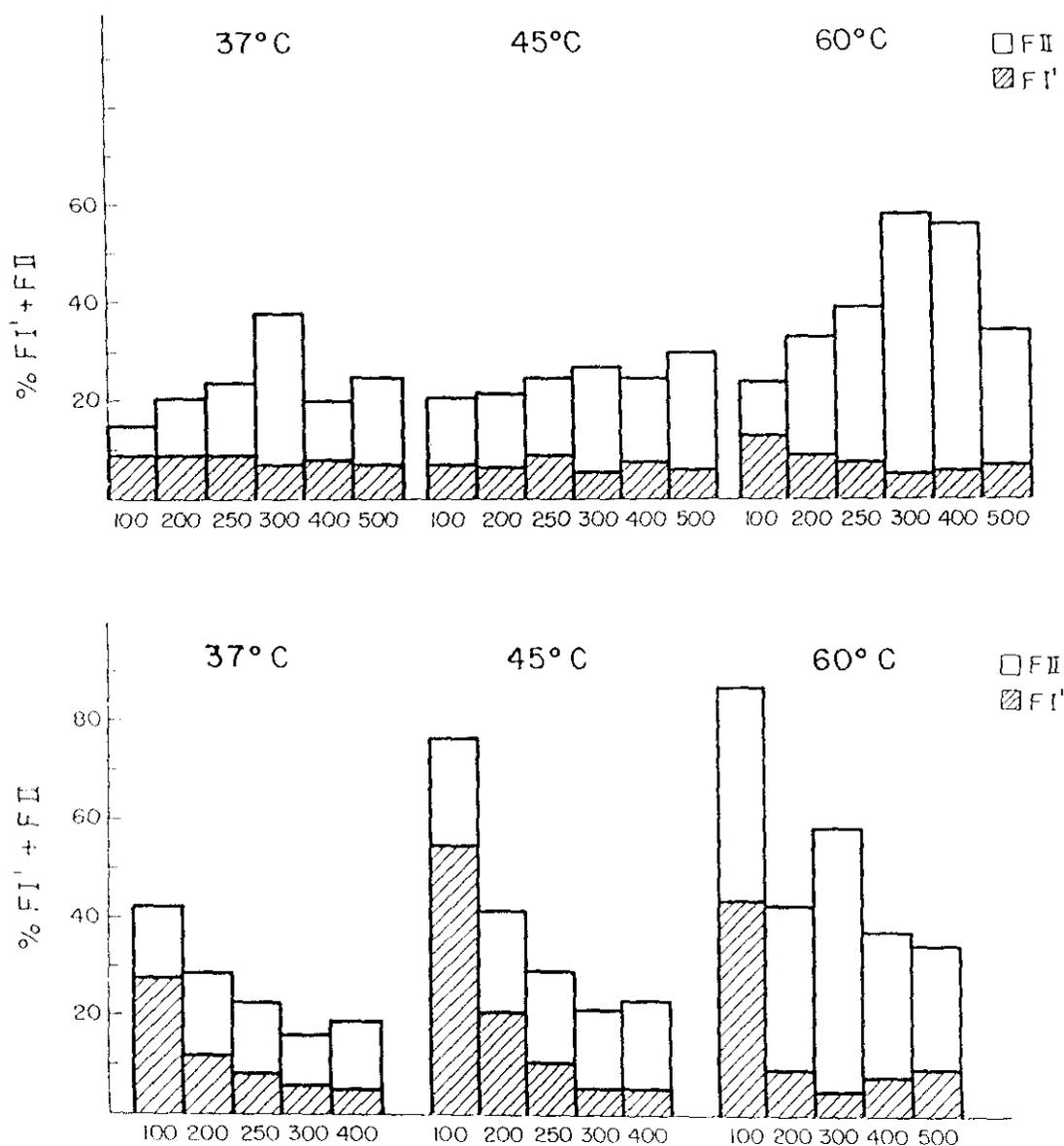


Figura 26. Efecto de la concentración de KCl presente en el tampón de reacción sobre la actividad de RepB. Para realizar este ensayo, se incubó DNA de pMV158 (700 ng) en presencia o ausencia de RepB (45 ng), durante 30 min a las temperaturas indicadas, en presencia de distintas concentraciones de KCl en el tampón de reacción: 100, 200, 250, 300, 400 y 500 mM. **Parte superior:** representación gráfica de los productos generados inespecíficamente tras 30 min de incubación en ausencia de RepB y con distintas concentraciones de KCl. **Parte inferior:** representación gráfica de los productos generados por RepB en presencia de distintas concentraciones de KCl. A cada temperatura se le restó el porcentaje correspondiente de formas FII + FI', generadas inespecíficamente por la concentración de KCl presente en la reacción. FII: forma circular abierta (□); FI': forma cerrada y relajada (▨).

camptotecina y con RepB), se incluyó un control III (con RepB y DMSO al 8%) con el fin de analizar el efecto del DMSO, componente en el que se disuelve la camptotecina, sobre la actividad de RepB. Tras añadir la camptotecina o el DMSO a la mezcla de DNA, tampón B y 20 mM $MnCl_2$, mantuvimos las muestras 10 min a t.a., antes de añadir la proteína RepB. Se realizó una incubación de 30 min a 45°C y se paró la reacción con 148 $\mu g/ml$ de proteinasa K. Tras analizar los resultados (no mostrados), se observó una mayor actividad de RepB en presencia de DMSO (disolvente usado para la camptotecina). Sin embargo, no se observó inhibición de la actividad de RepB por la camptotecina.

7.8. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG. La proteína CopG es uno de los elementos que controlan la replicación del plásmido pLS1. Su acción se ejerce a nivel transcripcional reprimiendo el promotor P_{err} , que controla la transcripción de los genes *copG* y *repB* (del Solar *et al*, 1989). Los datos derivados de "footprinting" con DNasa I y con radical hidroxilo empleando CopG pura, mostraron que las regiones protegidas por CopG no solapan con las regiones protegidas por RepB, aunque ambas regiones están contiguas (Fig. 27A; del Solar *et al*, 1990; de la Campa *et al*, 1990). Para conocer si CopG tiene algún efecto sobre la actividad *in vitro* de RepB, se realizó un ensayo con DNA de pLS1 (700 ng), RepB (45 ng) y tres concentraciones de CopG (3.6, 7 y 14 ng). En el experimento se incluyeron tres controles: control I (DNA en ausencia de las dos proteínas), control II (sólo en presencia de CopG) y control III (sólo en presencia de RepB). A las muestras tratadas con la proteína CopG se les mantuvo durante 10 min a t.a., antes de iniciar la reacción con la adición de $MnCl_2$ y RepB. Las muestras tratadas con CopG y RepB se prepararon por triplicado y se incubaron a 37, 45 y 60°C durante 30 min. La incubación de los controles I y II se realizó a 37°C y la del control III fue a 45°C. Tras el análisis de los productos de reacción, se observó que la actividad de RepB no se modifica en mayor o menor medida por la presencia de CopG. Sí se observó una débil banda correspondiente a formas lineales y un ligero aumento de formas FII, que podrían atribuirse a la existencia de una posible nucleasa contaminante en la preparación de la proteína CopG (Fig. 27B). En otros ensayos realizados en nuestro laboratorio, no se ha observado influencia de RepB sobre la unión de CopG a su diana. Podemos concluir que, en las condiciones ensayadas, no parece existir

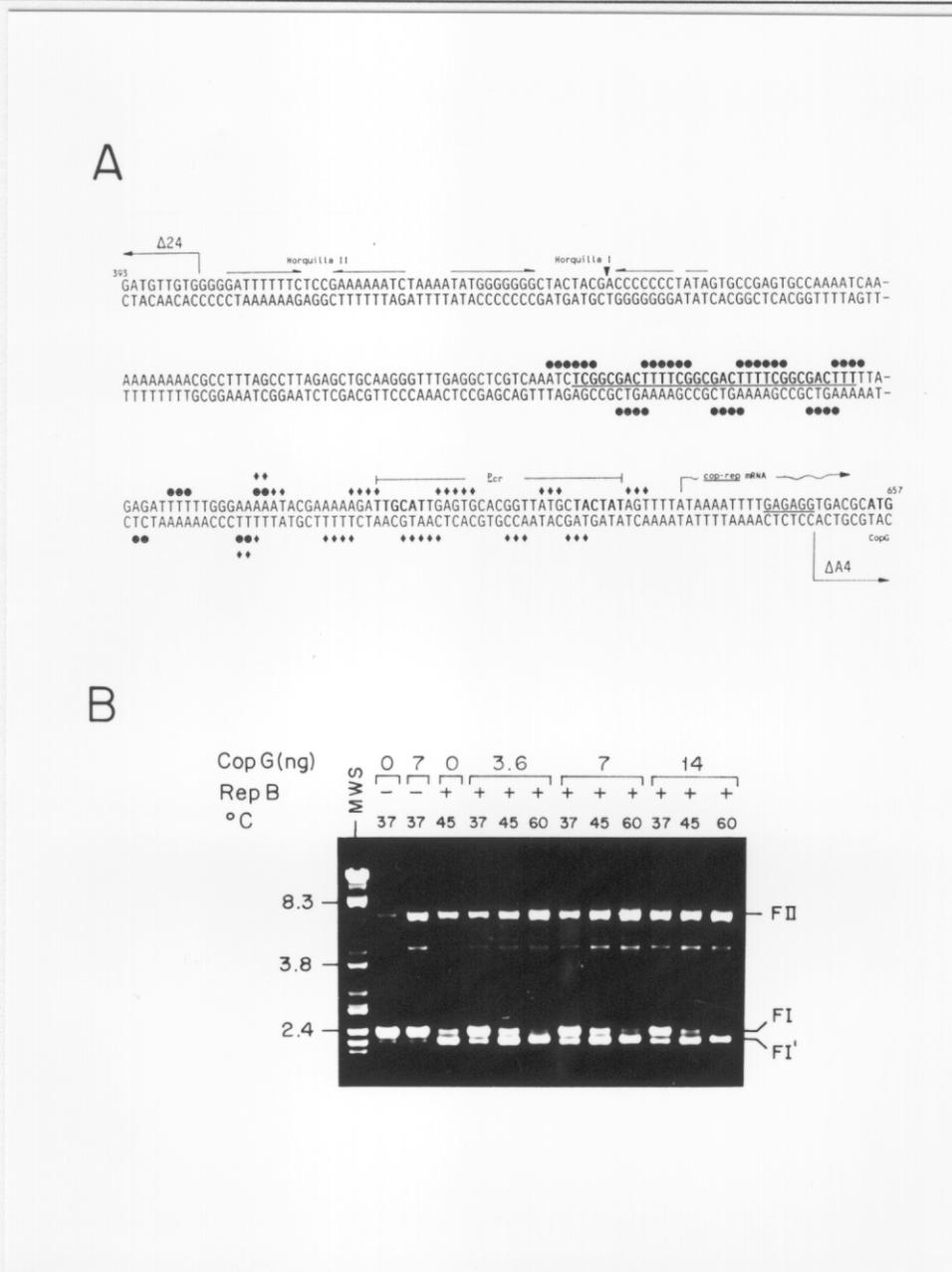


Figura 27. Actividad de RepB en presencia del represor transcripcional CopG. **A.** Secuencia de nucleótidos del origen funcional (*dso*) de pLS1 donde se muestran los bordes a la derecha e izquierda de las deleciones $\Delta 24$ y $\Delta A4$. Los "footprints" generados por RepB (\oplus) y CopG (\blacklozenge), determinado sobre dsDNA, se indican en las dos hebras del DNA. Además, se muestran las Horquillas I y II, que contiene el sitio de corte (\blacktriangledown) de la proteína RepB, las tres repeticiones directas (en negrita y subrayado), el promotor *cop-rep* (P_{cr}), el punto de iniciación del mRNA *cop-rep* (\rightsquigarrow) y el primer codón del gen *copG* (en negrita). **B.** DNA de pLS1 (700 ng) se incubó en presencia de RepB (45 ng) y tres concentraciones de CopG (3.6, 7 y 14 ng). Se incluyeron tres controles: control I (DNA en ausencia de las dos proteínas), control II (sólo en presencia de CopG) y control III (sólo en presencia de RepB). A las muestras tratadas con la proteína CopG se les mantuvo durante 10 min a t.a. antes de iniciar la reacción con la adición de $MnCl_2$ y RepB. Las muestras tratadas con CopG y RepB se prepararon por triplicado y se incubaron a 37, 45 y 60°C durante 30 min. La incubación de los controles I y II se realizó a 37°C y la del control III fue a 45°C. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

influencia de CopG sobre la actividad de RepB, y que la contigüidad de las regiones de unión de ambas proteínas no supone un impedimento estérico para la unión a sus dianas.

7.9. Actividad de RepB en presencia de nicotinamín-mononucleótido (β -NMN). La actividad de RepB sobre DNA plasmídico específico da lugar a formas FII y FI' (tras su actividad de corte y corte/cierre, respectivamente). Como en las muestras no tratadas con RepB se observó una pequeña cantidad de estas formas, había que descartar la posibilidad de la existencia de una DNA ligasa adenilada contaminante en la preparación de RepB, que podría haber llevado a cabo la reacción de cierre (Lehman, 1974; Kornberg y Baker, 1992). Para ello, se incubó DNA de pMV158 (700 ng) con varias cantidades de β -NMN (0.5, 5 y 500 μ M) en presencia o ausencia de RepB (45 ng), durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. La reacción se paró con 125 μ g/ml de proteinasa K. Tras analizar los productos de reacción mediante

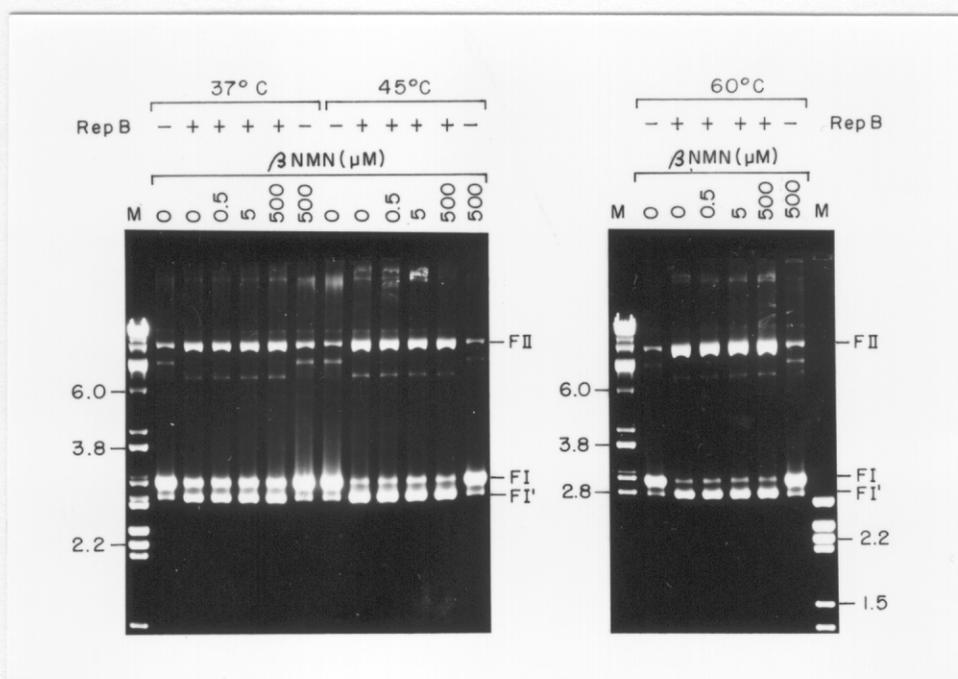


Figura 28. Actividad de RepB en presencia de β -NMN. DNA superenrollado de pMV158 (700 ng) se incubó o no con 45 ng de proteína RepB (relación en moléculas DNA:proteína igual a 9.5:1), en presencia o ausencia de las cantidades indicadas de β -NMN (0.5, 5 y 500 μ M), durante 30 min a las temperaturas de 37, 45 y 60°C. Los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 μ g/ml de EtBr. Las formas de DNA plasmídico son: superenrollada (FI), circular abierta (FII) y circular relajada (FI'). Los signos (+) y (-) indican la presencia o ausencia de proteína en las muestras. M: marcadores de peso molecular.

electroforesis, no se observó ninguna influencia del β -NMN sobre la actividad de RepB (Fig. 28). Por tanto, podemos descartar la existencia de una DNA ligasa adenilada contaminante en la preparación de RepB y se concluye que RepB, por sí sola, es capaz de cortar y resellar el DNA plasmídico de pMV158.

7.10. Actividad de RepB en presencia de detergentes. A la vista de los resultados obtenidos mediante equilibrio de sedimentación, pareció interesante emplear algún detergente capaz de disociar agregados de RepB. Para este ensayo se utilizaron dos detergentes no iónicos: Tween 20 (CMC= 0.059 mM) y octil- β -D-glucopiranosido (CMC= 19-25 mM) a concentraciones 10 y 20 veces por debajo del valor de su concentración micelar crítica (CMC). Se mezcló DNA de pMV158 (350 ng) con RepB (111 ng; proteína de la segunda purificación realizada) en presencia de tampón B, 20 mM $MnCl_2$ y el detergente correspondiente. Se realizó una incubación de 30 min a 60°C y se procedió como de costumbre. El análisis electroforético reveló un aumento de la actividad de RepB en presencia de octil- β -D-glucopiranosido a las dos concentraciones utilizadas y con la mayor concentración de Tween 20 (con la concentración más baja se obtuvo menos actividad que el control sin detergente). Se observó una desaparición prácticamente total de las formas FI y un aumento de las formas FII, mientras que la banda correspondiente a formas FI' se mantenía como en el control. Por tanto, el aumento de actividad observado era producto de la actividad de corte de RepB, mientras que la actividad de cierre resultó inhibida por los detergentes. Se incluyeron dos controles sin proteína en presencia o no de detergente, para comprobar así que el detergente no tenía ningún efecto sobre el DNA y que la actividad observada en las muestras era específica de RepB.

7.11. Cinéticas de la actividad de RepB. La primera cinética de actividad de RepB se realizó con DNA de pMV158 (700 ng) en tampón B, con 20 mM $MnCl_2$ y 45 ng de proteína a 60°C (se eligió esta temperatura de incubación ya que RepB presenta un mayor porcentaje de actividad a 60°C). Los tiempos de incubación a 60°C de las distintas muestras fueron los siguientes: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. La reacción se paró con 125 μ g/ml de proteinasa K. Los resultados mostraron que a los 5 min de incubación a 60°C, la proteína ya había actuado sobre la casi totalidad del DNA. Por ello, se realizaron nuevos ensayos a tiempos de incubación más cortos. Se realizó una

segunda cinética partiendo de una mezcla única de DNA de pMV158, tampón B, $MnCl_2$ y RepB, que se repartió en diez tubos. Los tiempos de incubación a 60°C fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25 y 35 min. Las reacciones se pararon como la vez anterior. A las muestras se les añadió el tampón de carga y se analizaron como de costumbre, realizándose los cálculos densitométricos de los productos de reacción. Con tan sólo 1 min de incubación a 60°C, el porcentaje de formas FII + FI', producto de la actividad de RepB, superaba el 85%; alcanzándose un 95% a los 15 min de incubación (Fig. 29A). Finalmente, se realizó otra cinética a tiempos de incubación aún más cortos: 5, 15, 30, 45, 60 y 120 segundos, y 5, 10 y 30 min. La cantidad de DNA de pMV158 y RepB fue la misma que en ocasiones anteriores. La reacción se inició añadiendo la proteína por separado en cada una de las muestras de 30 μ l. La reacción se paró a 4°C con 4 μ l de una solución STOP (0.2% xilencianol, 0.2% azul de bromofenol, 57% glicerol, 9.5 mM EDTA y 1.08 μ g/ μ l de proteinasa K). El análisis de los productos de reacción mostró un 62% de formas FII + FI' a tan sólo 30 segundos de incubación a 60°C. Posteriormente, se realizaron cinéticas a las temperaturas de 37 y 45°C, con menores cantidades de RepB (9 y 22.5 ng) y con otros derivados de pMV158 (estos resultados se comentarán más adelante).

7.12. Otros parámetros. Tras el óptimo resultado obtenido con RepB a los 5 min de incubación a 60°C, se realizó una prueba con DNA de pMV158 (700 ng) y distintas concentraciones de la proteína: 9, 18, 27, 36 y 45 ng. Los resultados mostraron que con sólo 18 ng de proteína y 5 min de incubación a 60°C, se alcanza un valor próximo al 90% de formas FII + FI' (Fig. 29B).

Como la actividad de RepB se manifiesta a 60°C, y a tiempos de incubación muy cortos, se realizaron una serie de ensayos para conocer la termoestabilidad de la proteína. En primer lugar, se preincubó RepB a 37, 45 y 60°C, durante distintos tiempos (30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos). En el caso de preincubación a 60°C se ensayaron también tiempos mayores de preincubación (10, 15, 20, 25 y 30 min). Con estas muestras de proteína, se realizaron ensayos de actividad de RepB sobre DNA de pMV158 (280 ng), en tampón B, 20 mM $MnCl_2$ y 18 ng de la proteína RepB precalentada (volumen final, 10 μ l). Las reacciones se mantuvieron 5 min a las temperaturas indicadas, y se pararon con 1.5 μ l de la solución STOP. El análisis de los productos de reacción no permitió observar actividad detectable en las muestras

tratadas con RepB preincubada a 45 y 60°C. La muestra preincubada a 37°C mostró una actividad de RepB similar a la del control. No obstante, una incubación de 5 min a esta temperatura manifiesta un porcentaje de actividad muy bajo. Posteriormente, se repitió el ensayo, precalentando la proteína con DNA y tampón B durante 30, 60, 120, 180, 240 y 300 segundos, e iniciando la reacción con el $MnCl_2$. De nuevo, no se observó ninguna actividad de RepB tras su precalentamiento. Una posibilidad para explicar la inactivación de RepB en sólo con 30 segundos de preincubación a 45 y 60°C podría ser que el plegamiento de la proteína a esta temperatura afectara al dominio de unión a DNA.

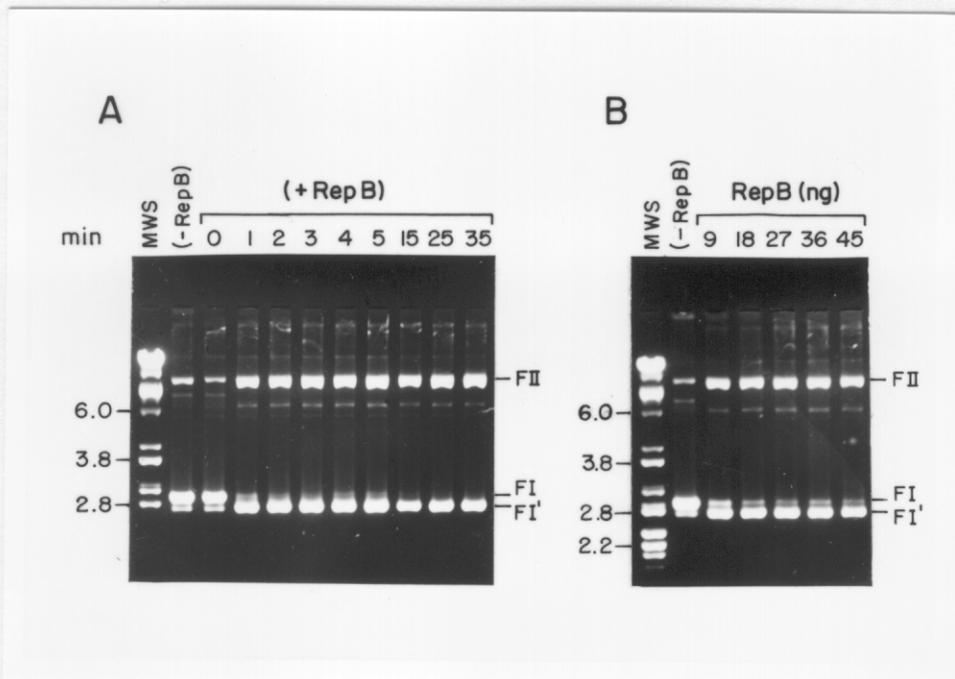


Figura 29. Variación del tiempo de incubación en la actividad de la proteína RepB. **Gel A.** DNA de pMV158 (700 ng) se incubó con la proteína RepB (45 ng) a 60°C, durante los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25 y 35 min. **Gel B.** DNA de pMV158 (700 ng) se incubó durante 5 min a 60°C, con distintas concentraciones de proteína: 9, 18, 27, 36 y 45 ng. En ambos ensayos, los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%, en tampón TBE y 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr. FI: forma superenrollada; FII: forma circular abierta; FI': forma circular relajada; MWS: marcadores de peso molecular.

A continuación, se realizó otra prueba precalentando la proteína a 60°C junto con tampón B y $MnCl_2$ durante 30, 60, 180 y 300 segundos. En esta ocasión, las reacciones se iniciaron con la adición de DNA plasmídico y, como en los casos anteriores, se realizó una incubación de 5 min a 60°C. Los resultados mostraron que la muestra de

RepB, preincubada con MnCl_2 durante 30 segundos, presentaba actividad residual, por lo que los siguientes ensayos se efectuaron a tiempos más cortos (preincubación de 15, 30, 45, 60, 150 y 300 segundos). RepB manifestó cierto porcentaje de actividad en las muestras preincubadas 15 y 30 segundos. Pensamos que, quizás, el MnCl_2 podría estabilizar la proteína, prolongado su vida media. Por ello, se realizó un experimento con tres concentraciones de MnCl_2 : 5, 20 y 50 mM. Las mezclas de reacción (tampón B, MnCl_2 y RepB) se mantuvieron durante 5 min a t.a., tras los cuales se realizó un precalentamiento de 15, 30 y 45 segundos a 60°C . De nuevo en este caso, las reacciones se iniciaron con la adición de DNA y se incubó durante 5 min a 60°C . Tras el análisis de los resultados sólo se observó actividad en las muestras de RepB precalentadas 15, 30 y 45 segundos a 60°C junto con el tampón B y 20 mM MnCl_2 . Resultó sorprendente el comprobar que los controles no precalentados (mantenidos 5 min a t.a.) no funcionaron a ninguna de las concentraciones de MnCl_2 ensayadas. En cualquier caso, RepB parece tener una vida media muy pequeña: con sólo 5 min a t.a. en presencia de DNA y MnCl_2 pierde totalmente su actividad. Curiosamente, si se incuba la proteína 5 min a t.a. (en presencia de MnCl_2 y tampón), se realiza un precalentamiento de 15 o 30 segundos a 60°C y se añade el DNA a la mezcla, RepB conserva cierta actividad. Por otra parte, si se precalienta el DNA con la proteína, y se inicia la reacción con MnCl_2 , RepB no presenta actividad. Además, si a la misma mezcla (previamente mantenida 5 min a t.a.) se le añade el DNA y se incuba directamente (sin precalentamiento), RepB no actúa. El MnCl_2 parece contribuir a la estabilidad de RepB, ya que las únicas muestras precalentadas a 60°C que presentaron actividad fueron aquellas en las que el precalentamiento de la proteína se realizó en presencia de MnCl_2 . Pensamos que la presencia de MnCl_2 podría estabilizar a RepB frente al calor, o bien que podría facilitar la disgregación proteica y aumentar la velocidad de catálisis de la reacción. El MnCl_2 podría modificar la estructura de la proteína, estabilizando su centro activo. Recientemente, se ha postulado que los iones Mg^{2+} podrían estabilizar la forma dimérica de la proteína RepD, modulando la interacción con el origen y por tanto, la eficiencia de replicación (Thomas *et al*, 1995).

Como ha quedado mostrado, el porcentaje de formas FII + FI alcanzó hasta el 95%, tras una incubación de 30 min a 60°C con DNA de pMV158, en una relación

DNA:proteína en moléculas de 1:9.5. Sin embargo, en ninguno de los ensayos realizados con la proteína se consiguió un 100% de formas FI' (producto de la actividad de corte/cierre de RepB). Por ello, se realizaron distintas pruebas añadiendo sucesivas cantidades de proteína o variando la temperatura de incubación. Los ensayos se realizaron del modo siguiente: muestras de DNA de pMV158 (234 ng) se trataron con 15 ng de RepB y se incubaron 30 min a 45°C. Tras este tiempo, se volvió a añadir más proteína (15 ng) y se realizó una segunda incubación de 30 min a 45°C. Observamos que RepB se va inactivando tras los primeros 30 min de incubación a 45°C y que la adición de proteína nueva resulta en una subsiguiente disminución de las formas FI pero no de las formas FII. En otros ensayos, las muestras se incubaron 30 min a 60°C, al cabo de los cuales se realizó una segunda incubación de 30 min a 45°C. De nuevo no se observó disminución de las formas FII. Como control, se incluyó una muestra con RepB en ausencia de MnCl₂ que fue incubada durante 30 min a 45°C; no se observó ninguna actividad de la proteína.

Por último, se realizó un nuevo ensayo incubando, a 60°C, DNA de pMV158 (1400 ng) con RepB (90 ng) en tampón B con 20 mM MnCl₂, en un volumen final de 50 µl. Se tomaron muestras (5 µl) de la reacción cada 5 min (hasta completar los 30 min de incubación), a las que se fueron añadiendo más cantidad de proteína, manteniendo constante la relación DNA/proteína (en masa) e igual a 15.5. Se incluyeron muestras control sin la adición de nueva cantidad de proteína. La reacción se paró a 4°C con 1 µl de la mezcla STOP. Se pudo comprobar que al cabo de 30 min de incubación a 60°C, tras añadir un total de 410 ng de proteína todavía quedan formas FII en la muestra, sin contar por supuesto, los FII inespecíficos presentes en el control sin proteína. Por lo tanto, de esta serie de resultados, concluimos que no se ha conseguido desplazar el equilibrio entre corte (FII) y cierre (FI') hacia la reacción de cierre.

Este apartado de resultados nos ha permitido extraer las siguientes conclusiones: i) las mejores condiciones para el análisis electroforético de los productos de reacción de RepB, se consiguieron mediante geles de agarosa al 1%, en tampón TBE conteniendo 0.5 µg/ml de EtBr; la electroforesis se realizó en cubetas horizontales largas, a voltajes bajos (30-40 V) y en tiempos largos de electroforesis (16-20 h); ii) el mayor porcentaje de actividad de la proteína RepB se obtuvo con una relación en

ABRIR RESULTADOS 8.

