

21.666

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Biológicas

**ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE LA  
CADENA RETRASADA DEL PLÁSMIDO  
pMV158**



\* 5 3 0 9 8 2 3 9 7 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**María Gabriela Kramer Xavier**

Madrid, 1997

**21.666**

# ORÍGENES DE REPLICACIÓN DE LA CADENA RETRASADA DEL PLÁSMIDO pMV158

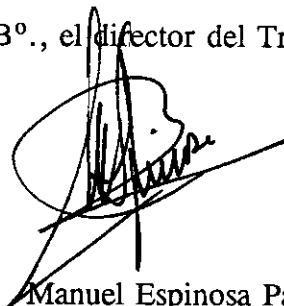
Memoria presentada por la Lda. María Gabriela Kramer Xavier  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Marzo, 1997



María Gabriela Kramer Xavier

Vº. Bº., el director del Trabajo



Manuel Espinosa Padrón  
Profesor de Investigación  
(CIB, CSIC)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I  
Facultad de Ciencias Biológicas

A mis padres: Eugenio y María Angélica,  
y a mi compañero Ernesto.

## AGRADECIMIENTOS

Para conseguir finalizar este trabajo, fue necesaria la contribución y participación de un gran número de personas, gracias a las cuales hoy puedo estar escribiendo estas líneas.

En primer lugar, quisiera expresar mi profundo y sincero agradecimiento al director de esta Tesis, Manuel Espinosa, por su confianza y apoyo brindados durante todos estos años, y por haber compartido conmigo una parte importante de su conocimiento científico.

Agradecer, al Dr. Saleem Khan, de la Universidad de Pittsburgh, por haberme acogido en su laboratorio para aprender y realizar muchos de los ensayos que aparecen en este trabajo.

A Paloma López, por sus consejos y suministro de polimerasas, pero sobretodo, por su buena disposición y tiempo dedicados.

A Gloria del Solar, por sus valiosas aportaciones y por su "actividad promotora" de discusiones científicas y de resolución de múltiples dudas.

A Julián Perera, por aceptar ser tutor de esta Tesis, y a todos los profesores del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de CC Biológicas, por los viejos tiempos..y los buenos cursos recibidos.

A mis compañeros de Laboratorio, presentes y pasados, por sus numerosas contribuciones científicas y amistosas. A Pepe y Antonio, por los buenos ratos. A Asun, porque en gran parte de su trabajo se basa una buena parte del mío. A Douglas, por su contagioso entusiasmo. A Miriam, por "transferirme" un poquito de su maravilloso sentido del orden. A Paloma y Anita, por la ayuda que me prestaron en tantas ocasiones. A Elisabeth, por echarme una mano gigante con la mudanza, que también fue parte de la Tesis. A Nieves y Leda, por las "buenas ondas". A Concha, por su alegría. A Mónica, por dejarme usar parte de su stock de polimerasas. A Djamel y a Maritére. A Adam Zhao, por ayudarme con los "estafilos". A Maite Alda, por ayudarme a buscar mutantes, cuando el tiempo me pisaba los talones. A Pedro, por todas las fotocopias y a Remé, por el suministro de víveres caseros y deliciosos.

A la Dra. Margarita Salas y al Dr. Mario Mencía por obsequiarnos la RNAP que se empleó en este trabajo. Al Dr. Rubens López y a su grupo, por habernos cedido unos cuantos ml de autolisina pura.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional, por haberme concedido la beca que me permitió realizar esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias de Montevideo, y especialmente al Prof. Ricardo Ehrlich, por su apoyo durante la solicitud de la beca.

A Aldo González, por impulsarme continuamente hacia la superación profesional.

A los integrantes del laboratorio de Miguel Vicente, por haber constituido un "hospedador" muy compatible con mi "sistema de expresión" y por haber suplementado muchas de mis necesidades "auxotróficas". Entre ellos, al Manu, por su envidiable sentido del humor y por contarme sus experiencias transcripcionales. A "mi fiel escudela" Yuyú, por los gloriosos 20 abriles y casi una década de vida compartida. A Ana "Boehringer", por la dioxigenina..y la intención. A Pili, Mariajo y Tere, por poder contar con ellas.

A Aurelio Hurtado, Mónica y Vicky, por el excelente trabajo gráfico, y fotográfico.

A mis padres, por su permanente apoyo y esfuerzo invertidos en mi educación. A Graciela, por su generosa hospitalidad. A Ernesto, por conseguir disminuir la entropía de mis circuitos en los momentos más críticos y aumentar la "estabilidad estructural" de mi persona, cuando empezaba a dejar de serlo...

A mis amigos del CIB, a los que ahora están por el CNB o por el CBM, o que ya partieron a lejanas tierras, por haber representado una época inolvidable para mí en España..no los nombro, porque son muchos, pero a todos, Muchas gracias!!

# ÍNDICE

---

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1. Características generales de los plásmidos</b>	<b>3</b>
<b>2. Mecanismos de replicación plasmídica</b>	<b>4</b>
2.1. Replicación tipo theta	5
2.1.1. Replicones dependientes de DNA polimerasa I	6
2.1.2. Replicones independientes de DNA polimerasa I	7
2.2. Replicación por desplazamiento de hebra	8
2.3. Replicación dirigida por proteínas terminales	9
2.4. Replicación tipo círculo rodante	10
2.4.1. Origen de replicación de la cadena líder ( <i>dso</i> )	13
2.4.2. Origen de replicación de la cadena retrasada ( <i>ssso</i> )	14
<b>3. Mecanismos de iniciación de la cadena retrasada</b>	<b>20</b>
3.1. Iniciación por primasa	22
3.2. Iniciación por RNAP	25
3.3. Iniciación por primosoma	27
3.3.1. El primosoma ABC	30
3.4. Síntesis inespecífica de RNA cebadores	31
<b>4. Plásmidos que replican vía círculo rodante</b>	<b>32</b>
4.1. Control de la replicación y estabilidad plasmídica	35
4.2. Rango de huésped	37
4.3. El plásmido pMV158	38
<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>MATERIALES</b>	<b>45</b>
<b>1. Estirpes bacterianas</b>	<b>45</b>
<b>2. Plásmidos y fagémidos</b>	<b>46</b>
<b>3. Bacteriófagos</b>	<b>49</b>

<b>4. Medios de cultivo</b>	<b>49</b>
4.1. Medio de cultivo de <i>S. pneumoniae</i>	49
4.2. Medio de cultivo de <i>B. subtilis</i>	50
4.3. Medio de cultivo de <i>E. coli</i>	50
4.4. Medio de cultivo de <i>S. aureus</i>	51
<b>5. Productos comerciales</b>	<b>51</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>52</b>
<b>1. Crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas</b>	<b>52</b>
<b>2. Transformación de células competentes</b>	<b>53</b>
<b>3. Preparaciones de DNA</b>	<b>54</b>
3.1. Extractos crudos celulares	54
3.2. Preparaciones de plásmidos	54
<b>4. Manipulación enzimática del DNA</b>	<b>55</b>
<b>5. Electroforesis de ácidos nucleicos</b>	<b>55</b>
<b>6. Elución y purificación de fragmentos de DNA</b>	<b>56</b>
<b>7. Secuenciación del DNA</b>	<b>57</b>
<b>8. Determinación del número de copias plasmídico</b>	<b>57</b>
<b>9. Test de estabilidad plasmídica</b>	<b>58</b>
<b>10. Mutagénesis dirigida</b>	<b>58</b>
<b>11. Marcaje radiactivo del DNA</b>	<b>60</b>
11.1. Preparación de sondas radiactivas	60
11.2. Marcaje del extremo 5' de fragmentos ssDNA	60
<b>12. Detección de formas ssDNA plasmídicas <i>in vivo</i></b>	<b>60</b>
<b>13. Obtención de ssDNA circular</b>	<b>62</b>
<b>14. Preparación de extractos libres de células</b>	<b>62</b>
14.1. Extractos de <i>S. aureus</i>	62
14.2. Extractos de <i>S. pneumoniae</i>	63
<b>15. Replicación <i>in vitro</i> a partir de ssDNA</b>	<b>64</b>
<b>16. Obtención de fragmentos ssDNA</b>	<b>65</b>
<b>17. Ensayos de retraso en gel</b>	<b>65</b>
<b>18. Ensayos de transcripción <i>in vitro</i></b>	<b>66</b>

<b>19. Programas informáticos</b>	<b>66</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>67</b>
<b>1. Definición del <i>ssoA</i> de pMV158</b>	<b>67</b>
1.1. Análisis de deleciones en la región del <i>ssoA</i>	69
1.2. Análisis de mutaciones en la región del <i>ssoA</i>	79
<b>2. El mecanismo de iniciación de la cadena retrasada de pLS1</b>	<b>86</b>
<b>3. Replicación <i>in vitro</i> a partir del <i>ssoA</i> de pLS1</b>	<b>89</b>
3.1. El sistema de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
3.1.1. Determinación de las mejores condiciones para la síntesis <i>in vitro</i> de la cadena complementaria de pLS1	92
3.1.2. Efecto de mutaciones en las regiones conservadas del <i>ssoA</i> de pLS1	94
3.1.3. Mecanismo de iniciación de la cadena retrasada de pLS1 en <i>S. aureus</i>	96
3.1.4. Especificidad de inicio de la cadena retrasada a partir del <i>ssoA</i>	97
3.1.5. Iniciación de la cadena complementaria a partir de los derivados mutagenizados del <i>ssoA</i>	104
3.1.6. Eficiencia de replicación <i>in vivo</i> de la cadena retrasada de pLS1 y sus derivados	106
3.2. El sistema de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	108
3.2.1. Preparación de extractos libres de células de <i>S. pneumoniae</i>	108
3.2.2. Determinación de las mejores condiciones para la síntesis <i>in vitro</i> de la cadena retrasada de pLS1 y pE194	111
3.2.3. Efecto de las mutaciones en las regiones conservadas del <i>ssoA</i> de pLS1	113
3.2.4. Iniciación de la cadena complementaria a partir del <i>ssoA</i> de pLS1 y sus derivados	115

<b>4. Interacciones entre <i>ssoA</i> y RNAP</b>	<b>120</b>
4.1. Retardo en gel de fragmentos ssDNA con la secuencia <i>ssoA</i>	120
4.1.1. Efecto de mutaciones en el <i>ssoA</i> en la interacción con RNAP	123
<b>5. Síntesis <i>in vitro</i> de pRNAs a partir del <i>ssoA</i> de pLS1</b>	<b>126</b>
5.1. Efecto de las mutaciones en el <i>ssoA</i> en la síntesis de pRNAs	129
5.2. Efecto de la proteína SSB en la síntesis <i>in vitro</i> de RNA a partir del <i>ssoA</i> de pLS1	130
<b>6. Mutaciones en la DNA polimerasa I de <i>S. pneumoniae</i> afectan la replicación a partir del <i>ssoA</i> de pLS1</b>	<b>131</b>
<b>7. Función del <i>ssoA</i> de pLS1 en <i>B. subtilis</i></b>	<b>136</b>
<b>8. El <i>ssoU</i> de pMV158</b>	<b>140</b>
8.1. Análisis comparativo entre la función del <i>ssoA</i> y <i>ssoU</i> de pMV158 en diferentes bacterias	141
8.2. La RNAP inicia la replicación a partir del <i>ssoU</i>	146
8.3. Iniciación de la replicación a partir del <i>ssoU</i>	148
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>152</b>
<b>1. Función de los <i>sso</i> de pMV158 en el rango de huésped plasmídico</b>	<b>153</b>
<b>2. Función de las regiones conservadas del <i>ssoA</i></b>	<b>167</b>
<b>3. Rol de Spn P<sub>oll</sub> en la replicación de plásmidos derivados de pMV158</b>	<b>178</b>
<b>4. Modelo de iniciación de la cadena retrasada para plásmidos con un origen <i>ssoA</i></b>	<b>182</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>186</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>189</b>

<b>A</b>	absorbancia
<b>Ap</b>	ampicilina
<b>ATP</b>	adenosina 5'-trifosfato
<b><math>\beta</math>ME</b>	$\beta$ -mercaptoetanol
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>cAMP</b>	adenosina-5'-3'-monofosfato (AMP cíclico)
<b>Ci</b>	curios
<b>Cm</b>	cloramfenicol
<b>cols.</b>	colaboradores
<b>cpm</b>	cuentas por minuto
<b>CTP</b>	citidina 5'-trifosfato
<b>c.s.p.</b>	cantidad suficiente para
<b>dATP</b>	desoxiadenosina 5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	desoxicitidina 5'-trifosfato
<b>dGTP</b>	desoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	desoxinucleósidos 5'-trifosfato
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>dsDNA</b>	DNA de doble hebra
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>dTTP</b>	desoxitimidina 5'-trifosfato
<b>EDTA</b>	etilén diamino tetraacético
<b>EGTA</b>	ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetil éter) N-N'-tetraacético
<b>Em o Erm</b>	eritromicina
<b>Em'</b>	resistentes o resistencia a eritromicina
<b>EtBr</b>	bromuro de etidio
<b>Fig.</b>	figura(s)
<b>g</b>	fuerza centrífuga relativa (RCF)
<b>GTP</b>	guanosina 5'-trifosfato
<b>h</b>	horas
<b>HE</b>	holoenzima
<b>HEPES</b>	ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	kilo bases ( $10^3$ bases o pares de bases)
<b>kDa</b>	kilodalton(s)
<b>min</b>	minuto(s)
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NAD</b>	nicotinamida-adenina dinucleótido
<b>Na-DOC</b>	deoxicolato sódico
<b>nt</b>	nucleótidos
<b>PAA</b>	poliacrilamida
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo

---

<b>Pol IK</b>	fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>
<b>PSA</b>	persulfato amónico
<b>RF</b>	forma replicativa
<b>Rif</b>	rifampicina
<b>RNAP</b>	RNA polimerasa
<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>rNTPs</b>	nucleósidos trifosfato
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena sencilla
<b>SSB</b>	proteína de unión a ssDNA de <i>E. coli</i>
<b>Tc</b>	tetraciclina
<b>Tc<sup>r</sup></b>	resistentes o resistencia a tetraciclina
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametileten-diamina
<b>T4 PNK</b>	polinucleótido quinasa del fago T4
<b>Tris</b>	trihidroximetol-amino-metano
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>u</b>	unidades
<b>uv</b>	ultravioleta
<b>UTP</b>	uridina 5'-trifosfato

## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PLÁSMIDOS

Los plásmidos son elementos de DNA bicatenario extracromosómicos, que replican de forma autónoma y controlada dentro de una célula huésped. Se han encontrado fundamentalmente en organismos procarióticos y en algunos eucariotas inferiores. La mayoría de los plásmidos caracterizados hasta la fecha son moléculas circulares de DNA, aunque también se han aislado formas lineales de éstos en algunas especies de bacterias gram(+) y gram(-) (Hinnebush y Tilli, 1993). Los plásmidos no son esenciales para la supervivencia de la célula hospedadora, excepto en determinados ambientes donde genes plasmídicos le confieran alguna ventaja selectiva, como resistencia frente a determinados antibióticos, metales pesados o irradiación. En algunos casos, la producción plasmídica contribuye con los procesos de fijación del nitrógeno atmosférico, formación de vacuolas de gas o degradación de compuestos químicos como tolueno y alcanfor. En otros casos, la síntesis de endonucleasas de restricción y de toxinas específicas del plásmido puede tener efectos negativos en el huésped, como por ejemplo, la inducción de tumores en plantas superiores.

Desde el punto de vista medioambiental, los plásmidos bacterianos contribuyen ampliamente en la diseminación horizontal de genes entre diferentes microorganismos (ya sean de la misma especie o, dada la capacidad replicativa de algunos, entre especies distintas), promoviendo así el mantenimiento de la biodiversidad. Este hecho se basa en que muchos plásmidos poseen la información necesaria para movilizarse conjugativamente desde una cepa donadora a otra receptora. Por otro lado, existen algunos organismos que en determinadas condiciones alcanzan un estado de competencia natural permitiendo la inclusión de estos elementos genéticos, sin que ellos requieran codificar estructuras especiales para mediar el proceso. Como además, muchos plásmidos poseen capacidad para integrarse en otros replicones e incluso en el cromosoma del huésped, al escindirse pueden llevar consigo secuencias que luego serán reconocidas y expresadas en el próximo hospedador, conduciéndole a rearrreglos genéticos drásticos. De esta forma la diseminación plasmídica natural adquiere una trascendencia evolutiva, además de ecológica.

Dado que se trata de elementos dispensables para la célula, los plásmidos constituyen un material manipulable para estudiar mecanismos que en el cromosoma serían más

complejos de practicar, como por ejemplo, interacciones entre proteínas y DNA o RNA, topología y replicación del DNA, control de la expresión génica, etc. Uno de los papeles más importantes que tienen estos replicones, tanto para la Biología Molecular como para la Biotecnología, es el poder ser utilizados como vectores de clonaje de diferentes genes y secuencias especiales, facilitando al investigador muchas tareas experimentales, así como permitiendo a la industria numerosos recursos como herramientas en la síntesis de compuestos biológicos.

La replicación y el mantenimiento de los plásmidos en la población se consigue independientemente del cromosoma bacteriano, aunque bioquímicamente dependen de varias proteínas codificadas por él. Están presentes en un número de copias determinado y controlan su propia replicación mediante la codificación de un sistema que regula la iniciación. En muchos casos, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias, poseen sistemas de estabilización, que le aseguran un reparto equitativo entre las células hijas durante la división celular.

## 2. MECANISMOS DE REPLICACIÓN PLASMÍDICA

La replicación es el mecanismo mediante el cual las moléculas de DNA (o de RNA, en ciertos virus) se dividen para formar moléculas idénticas a las originales. Para los plásmidos, este proceso es de vital importancia, ya que del éxito replicativo dependerá en gran medida su mantenimiento en la célula huésped. Los mecanismos de replicación conocidos basan sus diferencias en el modo de iniciar la replicación y en las distintas estructuras que adoptan los intermediarios replicativos. Existen cuatro mecanismos generales de replicación plasmídica: replicación tipo *theta*, replicación por desplazamiento de hebra, replicación dirigida por proteínas terminales y replicación tipo círculo rodante (Kornberg y Baker, 1992). A este último será al que le dediquemos mayor atención, ya que es el empleado por el plásmido pMV158 objeto de nuestro trabajo, centrándonos sobre todo en la síntesis de la cadena retrasada, puesto que constituye el objetivo a estudiar en esta Tesis.

Una de las reglas básicas de la replicación, es que las DNA polimerasas (responsables

directas de la síntesis del DNA), no pueden iniciar por sí solas el proceso replicativo, necesitando estar acopladas a un extremo 3'-OH de un DNA, un RNA o una proteína, que oficie como cebador de la síntesis. En el caso de ser necesario un RNA cebador o "primer" (pRNA), los enzimas encargados de su elaboración son la RNA polimerasa (RNAP) o la primasa, codificadas por el huésped o por el plásmido.

## 2.1. Replicación tipo *theta* ( $\Theta$ )

La replicación tipo  $\Theta$  es característica de la mayoría de los plásmidos circulares de bacterias gram(-), aunque también ha sido descrita para plásmidos del grupo de incompatibilidad Inc18 de bacterias gram(+) (Bruand y cols., 1991). Es empleada por el cromosoma de las bacterias y por los cromosomas de células eucariotas, así como para la replicación de numerosos bacteriófagos y virus eucarióticos. La iniciación de la replicación en cada uno de estos sistemas tiene lugar en uno o varios sitios específicos, denominados orígenes de replicación (*ori*). En general los plásmidos contienen un solo *ori*, aunque existen casos como R6K que tiene tres (*oris*  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) localizados en un fragmento de 4 kb (Crosa, 1980) o el plásmido F (replicón RepF1A) que posee dos (*oriS* y *oriV*) ubicados muy cerca uno de otro (Kornberg y Baker, 1992). La replicación tipo  $\Theta$  implica la separación de las hebras parentales del DNA en la región del *ori* y la síntesis de un RNA cebador, que será el que proporcione el grupo 3'-OH necesario para que las DNA polimerasas de la célula puedan iniciar el proceso. Dado la naturaleza antiparalela de las hebras de DNA y la polaridad en la dirección de síntesis de las mismas (5'  $\rightarrow$  3'), sólo una de las cadenas de DNA puede ser sintetizada de forma continua a partir del *ori* (cadena líder), mientras que la otra tiene que ser sintetizada de forma discontinua, como fragmentos pequeños de unas 2 kb de longitud denominados "fragmentos de Okasaki", generados a partir de varios "primer" sucesivos (cadena retrasada). Como consecuencia, la síntesis de ambas cadenas de DNA ocurre de forma acoplada entre ellas (Selick y cols., 1987; McHenry, 1988).

La dirección de la replicación puede darse en uno o en ambos sentidos, dependiendo del replicón, pero en todos los casos los intermediarios replicativos exhiben una morfología característica al microscopio electrónico, tipo  $\Theta$ , debido a la separación de las hebras

parentales y al avance de la horquilla de replicación. Una vez completada la síntesis de ambas cadenas, es necesario la acción de las topoisomerasas bacterianas para la resolución de los catenanos resultantes y separación de ambas moléculas de DNA. Los plásmidos que replican por este mecanismo, pueden dividirse en dos grupos según dependan o no de la DNA polimerasa I para la iniciación de la cadena líder.

### 2.1.1. Replicones dependientes de la DNA polimerasa I

Este grupo está representado por el plásmido ColE1 de *Escherichia coli* y depende de la RNAP del huésped para la síntesis del RNA cebador de la cadena líder (o un precursor de éste) y de la DNA polimerasa I para iniciar la síntesis del DNA (Staudenbauer, 1978; Kornberg y Baker, 1992; Marians, 1992). En ColE1, además, se requiere la acción de la RNasa H de la bacteria para el procesamiento de este pRNA (Itoh y Tomizawa, 1980). La desnaturalización inicial en el *ori* tiene lugar como consecuencia de la transcripción de esta molécula de RNA. Una vez iniciado el proceso, la replicación transcurre unidireccionalmente (Tomizawa y cols., 1974) a cargo de la DNA polimerasa III (HE), quedando expuesto, a medida que avanza la horquilla de replicación, el sitio requerido para el ensablaje del primosoma (*ssi*) en la otra hebra del DNA. A partir de aquí tendría lugar la síntesis de la cadena discontinua del plásmido, ya que el primosoma se translocaría en dirección 5' → 3' desenrollando la hélice de DNA y sintetizando los "primer" necesarios (Böldicke y cols., 1981; Masai y cols., 1990). La replicación se detiene a una distancia de 17 pb "corriente arriba" del sitio de iniciación de la cadena líder, debido a la presencia de señales de terminación en el DNA denominadas *terH* (DasGupta y cols., 1987). Entre los plásmidos que utilizan este mecanismo de replicación se encuentran ColE1 y su derivado pBR322. Se ha visto también, que un plásmido relacionado, pMB1, inicia su replicación en una posición idéntica a la descrita para ColE1 (Bolivar y cols., 1977).

Dentro de este grupo existen una serie de replicones que, además de depender de la DNA polimerasa I del huésped, codifican una proteína Rep necesaria para la iniciación de la replicación. Esta proteína se une a la región del *ori* y sintetiza un único "primer" (ppApGpA) que es utilizado por la DNA polimerasa I para iniciar la cadena líder del plásmido (Takechi y cols., 1995). Como representantes de este subgrupo se pueden señalar los plásmidos ColE2 y ColE3 de *E. coli* (Yasueda y cols., 1989) y los plásmidos de la familia

de pAM $\beta$ 1 de bacterias gram(+) (Brantl y cols., 1990), aunque en este último caso no se conoce exactamente la función de la proteína Rep (Bruand y cols, 1993).

### 2.1.2. Replicones independientes de la DNA polimerasa I

Los plásmidos pertenecientes a este grupo son independientes de la acción inicial de la DNA polimerasa I y codifican una proteína iniciadora de la replicación (Rep) que se une a secuencias directamente repetidas del *ori* (iterones) formando un complejo nucleoproteico que facilita la apertura de las hebras del DNA en una región adyacente, rica en secuencias A+T. El *ori* contiene además, dos o más sitios para la unión del complejo DnaB/DnaC y de la proteína DnaA (Bramhill y Kornberg, 1988). Una vez que se inicia la síntesis en una o en las dos hebras del DNA, la replicación continúa hasta el final en un proceso catalizado por la DNA polimerasa III (HE) y otros factores del huésped que integran el replisoma. En el plásmido R1, las interacciones de RepA en el origen de replicación promueven la entrada de la primasa, la cual sintetiza el RNA cebador de la cadena líder, en un sitio localizado 400 pb "corriente abajo" del *ori* (Masai y Arai, 1989). Este sitio se encuentra en un entorno homólogo a la región que actúa como origen de la cadena complementaria en el fago G4 y también se requiere la presencia de SSB para dar inicio a la replicación. Por eso se piensa que, al igual que en G4, solamente la primasa del huésped sea la responsable de la síntesis del "primer" en esta cadena (Kornberg y Baker, 1992; Giraldo y cols., 1993). La terminación de la replicación se produce en regiones específicas del plásmido en donde determinados factores bacterianos pueden unirse y detener la horquilla de replicación (Kuempel y cols., 1989). Uno de los ejemplos mejor estudiados lo constituye el sistema *ter*/Tus del plásmido R6K (Bastia y cols., 1981), en donde la unión de la proteína Ter del huésped al sitio *tus* del plásmido interfiere con la actividad helicasa del replisoma, deteniendo así el avance del complejo replicativo (Manna y cols., 1996).

Además de los elementos mencionados, existen otras proteínas y/o secuencias nucleotídicas que colaboran en la formación del complejo nucleoproteico en el origen y, por consiguiente, participan en la iniciación de la replicación. Por ejemplo, el factor IHF (factor de integración del huésped) induce curvaturas en el DNA y es necesario para la replicación de los plásmidos pSC101 y R6K. En pSC101, esta curvatura facilita la interacción de moléculas de DnaA unidas a sitios separados por 200 pb (Stenzel y cols., 1991). En el caso

de R6K, la unión de IHF parece alterar una secuencia fuera del *ori*, donde la proteína de replicación ( $\pi$ ) se une, potenciando así la interacción de  $\pi$  a los iterones del *ori* (Kelley y cols., 1992). En el plásmido P1 las proteínas "heat shock" estimulan la unión de RepA a sus iterones (Wickner y cols., 1991; DasGupta y cols., 1993) resultando en la formación del complejo de apertura del DNA. La secuencia *crr* se requiere para la iniciación de la replicación en el plásmido P4 (Flensburg y Calendar, 1987). Dado que esta secuencia se encuentra a 3.5 kb del *ori* y constituye un sitio de unión de la proteína de replicación ( $Gp\alpha$ ), se ha propuesto que la unión de esta proteína tanto al *crr* como al *ori* promueve la formación de una estructura tipo lazo que conecta ambas regiones activando así la replicación (Ziegelin y cols., 1993).

Los representantes más estudiados de este grupo son los plásmidos R1, R100, R6K, RK2, F, P1 y pSC101 de *E.coli*. La replicación del cromosoma bacteriano también tiene lugar independientemente de la acción inicial de la DNA polimerasa I y las proteínas que intervienen en el proceso son las mismas que utilizan estos plásmidos (a excepción de las codificadas por ellos mismos). Además, la organización general del *ori* en estos replicones se asemeja mucho a la situación encontrada en el origen de replicación del cromosoma de *E.coli* (*oriC*). Todo esto hace suponer que el mecanismo de replicación es bastante similar en ambos casos.

En los dos grupos de plásmidos, la síntesis de la cadena retrasada parece iniciarse a partir de las secuencias *ssi*. Éstas se han encontrado en los plásmidos ColE1, ColE2, F, R100, R1, pBR322, pACYC177 y CloDF13 (Masai y cols., 1990a; Zipursky y Mariani, 1980; van der Ende, 1983), pero no existen aún evidencias claras de su actuación *in vivo* como señales de iniciación para todos estos replicones. En el plásmido R6K la síntesis de la cadena retrasada se inicia a partir de una secuencia diferente, en donde tiene lugar la unión de la proteína DnaA (ver apartado 3.3.1).

## 2.2. Replicación por desplazamiento de hebra

Este tipo de mecanismo replicativo ha sido descrito para el plásmido del grupo IncQ

de *Pseudomonas aeruginosa*, RSF1010 (Scherzinger y cols., 1991). Este plásmido posee un origen de replicación (*oriV*) y codifica tres proteínas (RepA, RepB y RepC) que le permiten una independencia casi total de la maquinaria enzimática del huésped para su replicación. La región del *oriV* incluye tres iterones de 20 pb cada uno y una secuencia de 174 pb que contiene: i) una región rica en residuos G+C, ii) un segmento de 31 pb rico en secuencias A+T, y iii) dos pequeñas estructuras palindrómicas que contienen dos sitios de iniciación, *oriR* y *oriL*, ubicados en cadenas opuestas del DNA. La proteína RepC se une a los iterones del *oriV* y promueve la entrada de la proteína RepA, cuya actividad helicasa 5' → 3' consigue la separación de las hebras del DNA en esta región. De esta forma quedan expuestas las secuencias *oriR* y *oriL* que pueden ser reconocidas por la primasa RepB. Esta proteína sintetiza el RNA cebador que es utilizado por la DNA polimerasa III (HE) de la bacteria para dar lugar al proceso replicativo del plásmido (Haring y Scherzinger, 1989). La replicación se inicia a partir de uno de estos orígenes, de una manera continua y unidireccional. La hebra que no es replicada es desplazada formando un lazo en forma de "D" obteniéndose como productos finales, una molécula de DNA bicatenario (dsDNA) circular superenrollado y una molécula de DNA monocatenario (ssDNA) desplazada que será convertida a dsDNA a partir del *ori* de dicha cadena.

### 2.3. Replicación dirigida por proteínas terminales

Este tipo de replicación se ha descrito para plásmidos lineales. Estos plásmidos se han encontrado en bacterias gram(+) y gram(-), así como en levaduras. La estructura de los plásmidos lineales puede ser de dos tipos: i) los que poseen una formación de horquilla en ambos extremos del genoma y ii) los que tienen una proteína unida covalentemente a sus extremos 5'. Los primeros replican vía la formación de intermediarios concatémicos y los segundos lo hacen siguiendo un mecanismo similar al descrito para el fago  $\phi$ 29 de *Bacillus subtilis* (Salas, 1991), en donde la proteína terminal ejerce la función de cebador de la replicación en ambas hebras del DNA. La replicación se inicia al interaccionar una proteína terminal libre con la proteína terminal unida a los extremos 5' del DNA. En este caso, el extremo 3'-OH que será usado por la DNA polimerasa del fago, es proporcionado por un residuo Ser, Tyr o Thr de esta segunda proteína.

Méndez y cols. (1992) han propuesto además, otro mecanismo en el cual, el primer nucleótido incorporado correspondería al segundo del DNA molde. En este caso, 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 durante la elongación de la cadena. Este mecanismo, denominado "sliding-back", se ha visto también, en otros fagos con proteínas terminales, como Cp-1 de *S. pneumoniae* (Martín y cols., 1996) y GA-1 de *B. subtilis* (Illana y cols., 1996).

Algunos plásmidos lineales con proteínas terminales unidas a sus extremos 5' (como el plásmido pSLA2 de *Streptomyces rochei*) 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 molde para la síntesis de la cadena retrasada, cuyo "primer" se lo proporcionaría la proteína terminal unida (Chang y Cohen, 1994).

## 2.4. Replicación tipo círculo rodante (RC)

Este tipo de replicación es característico de plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias de bacterias gram(+), así como de bacteriófagos de cadena sencilla de *E. coli* y de bacteriófagos bicatenarios temperados de la familia de P2 (Gruss y Ehrlich, 1989; Baas y Jansz, 1988; Bertani y Six, 1988). Además, ya se han encontrado varios ejemplos de plásmidos que replican vía círculo rodante en bacterias gram(-) (Gielow y cols., 1991; Gigliani y cols., 1993; Kleanthous y cols., 1991; Yasukawa y cols., 1991), en la espiroqueta *Treponema dendricola* (MacDougall y cols., 1992), en las cianobacterias *Nostoc*, *Microcystis aeruginosa* y *Plectonema* (Perkins y Barnum, 1992) y en la arqueobacteria *Pyrococcus abyssi* (Erauso y cols., 1996). Este tipo de replicación se ha descrito también, en germinivirus de plantas superiores (Stenger y cols., 1991; Saunders y cols., 1991). El modelo de replicación RC en plásmidos, se basa en el sistema descrito para los colifagos de cadena sencilla (Baas y Jansz, 1988), en donde se detectó por primera vez esta modalidad replicativa (Gilbert y

Dressler, 1968). Aunque los principios del mecanismo RC son iguales para todos ellos, existen algunas diferencias entre los distintos replicones. Por ejemplo, pueden diferir en la naturaleza de las proteínas iniciadoras de la replicación de la cadena líder y retrasada, en los complejos bioquímicos de iniciación y terminación de la replicación, en las estructuras y secuencias genómicas que actúan como señales para los diferentes procesos, etc.

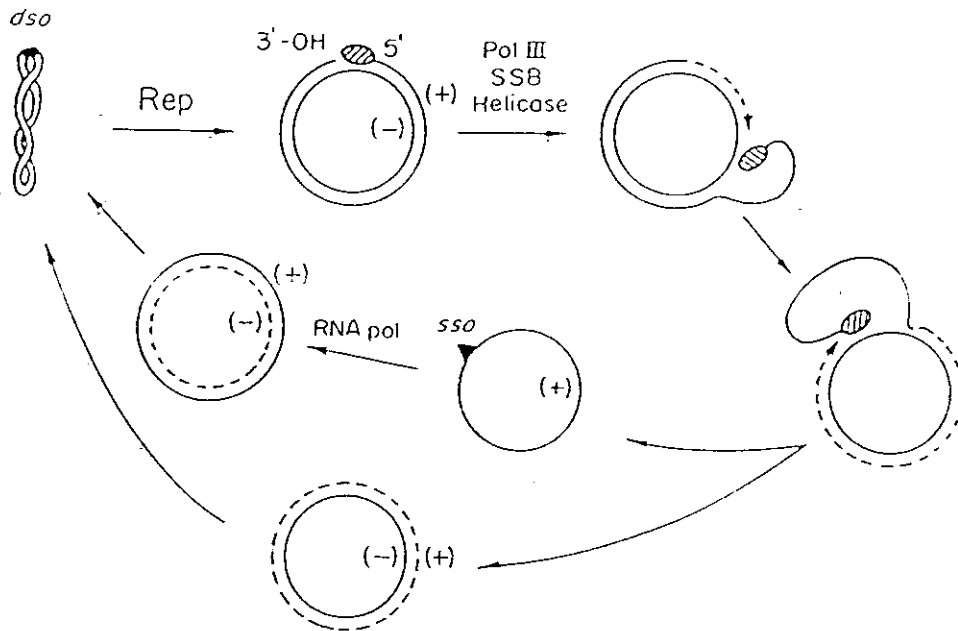
La replicación de estos plásmidos se realiza de un modo unidireccional y asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y retrasada están desacopladas (Fig. 1). Esta característica permite dividir su estudio en dos etapas claramente diferenciadas. El desacoplamiento entre la síntesis de ambas cadenas de DNA requiere que en estos plásmidos existan dos orígenes de replicación diferentes, que garanticen el inicio de cada una de ellas: i) el origen de replicación de la cadena líder o de doble hebra (*dso*) y ii) el origen de replicación de la cadena retrasada o de hebra sencilla (*ss0*), desde el cual tiene lugar la síntesis de la cadena complementaria del plásmido. Aunque esta segunda etapa se haya denominado "síntesis o replicación de la cadena retrasada", es preciso aclarar que no se trata de un proceso análogo al descrito en el mecanismo tipo *theta*, en donde la síntesis de esta cadena se realiza de forma discontinua. En el caso de la replicación RC, tanto la cadena líder como la cadena retrasada son sintetizadas de manera continua sobre el DNA molde, a partir de sus respectivos orígenes de replicación.

**a) Replicación de la cadena líder.** La iniciación de la replicación la lleva a cabo una proteína codificada por el plásmido (Rep), que se une al origen de cadena doble (*dso*) e introduce un corte específico de sitio en una de las hebras del DNA [cadena(+)]. En algunos casos, Rep permanece unida covalentemente al extremo 5' de la cadena de corte mediante unión fosfotirosina (Thomas y cols., 1988; Langeveld y cols., 1978), mientras que en otros, la unión al DNA es de tipo transitorio y no covalente (Meyer y Geider, 1979; Moscoso y cols., 1995b). Las proteínas Rep actúan en *trans*, poseen actividad endonucleasa específica y polinucleotidiltransferasa (corte y cierre). Son esenciales para la replicación del plásmido y su síntesis está bien regulada ya que, por lo general, constituye la etapa limitante del proceso replicativo. El ataque mediado por esta proteína genera un grupo 3'-OH que es utilizado como cebador por la DNA polimerasa III (HE) del huésped para sintetizar la hebra líder (Majumder y Novick, 1988). En el plásmido pT181 se ha visto la participación de una

helicasa bacteriana en este proceso (Iordanescu y Basheer, 1991). La cadena(+) va siendo desplazada a medida que se sintetiza la cadena líder, hasta alcanzar la región inicial del *dso*. Como resultado, este DNA monocatenario va adquiriendo una forma típica al microscopio electrónico ( $\sigma$ ), por lo que a este tipo de replicación también se le denominó "replicación tipo  $\sigma$ ". A continuación, la proteína Rep produce un segundo corte en la nueva hebra líder y la posterior ligación de la cadena parental desplazada. Como resultado final de esta primera etapa en la replicación RC, se obtiene una molécula de DNA bicatenario completa y un intermediario monocatenario circular (de Riele y cols., 1986). En el caso de los plásmidos pT181 y pUB110, la cadena recién sintetizada se extiende unos 12 nucleótidos más allá del *dso* reconstruido (Rasooly y Novick, 1993; Müller y cols., 1995). Para la terminación de la replicación en pT181, Rasooly y Novick (1993) postularon una reacción de transferencia de hebra por una de las subunidades del homodímero de RepC mediante introducción de un corte en el nuevo *dso* y unión a los 12 nt extra. En este caso, además de los productos mencionados, también se generaría una molécula heterodimérica de RepC, inactiva en replicación y constituida por dos subunidades, una de las cuales, RepC\*, llevaría unido covalentemente el oligonucleótido. Estos productos se han visto también en la proteína RepU de pUB110 (Müller y cols., 1995). Para pC194, Noirot-Gross y cols. (1994), basándose en el análisis de mutantes en los residuos conservados de la proteína RepA, plantean un mecanismo de terminación distinto al de pT181, donde no se descarta una posible inactivación de la proteína, similar a la que se produce en RepC.

***b) Replicación de la cadena retrasada.*** Para completar la primera ronda de replicación, es decir, generación de dos moléculas bicatenarias idénticas a partir de una, el ssDNA producto de la primera etapa, debe ser convertido en una molécula plasmídica bicatenaria. La iniciación de la cadena complementaria normalmente tiene lugar en una región no codificante del DNA, físicamente separada del *dso*, que se caracteriza por su alto potencial para formar estructuras secundarias. Esta señal, denominada origen (-) o *sso*, es reconocida por los factores del huésped que mediarán la síntesis del RNA cebador. A excepción de pMV158 que contiene dos *sso* diferentes (*ssoA* y *ssoU*, ver más adelante), estos plásmidos poseen una única señal específica de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA (del Solar y cols., 1987a; Gruss y Ehrlich, 1989; van der Lelie y cols., 1989). En varios estudios, muchos de ellos actuales (incluidos los de esta Tesis), realizados *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado la dependencia total o

parcial, de la RNAP en el inicio de la síntesis de la cadena retrasada de todos los plásmidos analizados (Boe y cols., 1989; Seery y Devine, 1993; Kramer y cols., 1995; Dempsey y cols., 1995; Seegers y cols., 1995). Se postula que la molécula monocatenaria estaría cubierta de SSB, excepto en la región del *ssb*, pudiendo ser reconocido por la RNAP. Este enzima sintetizaría un "primer" que sería elongado por la DNA polimerasa III (HE) hasta alcanzar el extremo 5' del cebador. La DNA polimerasa I, mediante su actividad exonucleasa 5' → 3', escindiría este pRNA y rellenaría la región resultante dejando extremos próximos para ser ligados por la DNA ligasa de la bacteria (Geider y Kornberg, 1974; Díaz y cols., 1994).



**Figura 1. Modelo de replicación tipo círculo rodante.** Las líneas de trazo continuo representan las dos hebras parentales (+) y (-) del DNA. Las líneas de trazo discontinuo representan las hebras de nueva síntesis. La proteína Rep y *ssb* se simbolizan con ( ) y (▲), respectivamente. El mecanismo de replicación tipo círculo rodante se detalla en el texto.

#### 2.4.1. Origen de replicación de la cadena líder (*dso*)

El *dso* u *ori*(+) se encuentra situado "corriente arriba" o dentro de la región codificante de la proteína Rep. Contiene las secuencias reconocidas por ésta para la iniciación y terminación de la síntesis de la hebra líder. El *dso* puede dividirse física y funcionalmente

en dos regiones: *bind*, en donde se une Rep y *nic*, que incluye el sitio de corte específico (del Solar y cols., 1993b; Moscoso y cols., 1995a). Estas regiones pueden estar contiguas como en el caso de pT181 o separadas por decenas de bases como en pMV158. La región *bind* se compone de una secuencia inversamente repetida (pT181) o de dos o tres secuencias directamente repetidas (iterones) de 5 a 21 pb cada una (pKMK1 y pADB201, respectivamente). A excepción de pUB110 (Alonso y cols., 1988), la región *nic* puede formar una o dos estructuras tipo tallo-lazo que son fundamentales para la funcionalidad del origen, ya que el sitio donde Rep induce el corte está localizado en uno de los lazos monocatenarios de estas horquillas. Estas estructuras se han mapeado por sensibilidad a la nucleasa S1, *in vivo* e *in vitro*, en los plásmidos pMV158 y pT181 (del Solar y cols., 1987b; Puyet y cols., 1988; Noirot y cols., 1990). Su formación requiere que el plásmido esté en forma superenrollada, permitiendo así la extrusión de la horquilla y con ella, la secuencia nucleotídica donde tendrá lugar el inicio de la replicación. La región *nic* es muy homóloga o prácticamente idéntica entre los miembros de la misma familia de plásmidos, mientras que la región *bind* es bastante diferente. Del mismo modo, las proteínas Rep presentan un grado de identidad muy elevado, aunque también contienen regiones de considerable divergencia. Pese a la alta homología en el *dso* y en Rep, no se ha visto que exista complementación cruzada *in vivo* entre los componentes del complejo de iniciación de los plásmidos de una misma familia, a menos que se sobreproduzca Rep (Projan y Novick, 1988). Esta observación plantea la posibilidad que las regiones variables, tanto de la proteína Rep como las del origen de replicación, sean las que contengan los determinantes de especificidad para el reconocimiento entre ambos elementos (Projan y Novick, 1988).

#### 2.4.2. Origen de replicación la cadena retrasada (*sso*)

Los orígenes de hebra sencilla se encuentran en zonas no codificantes del plásmido y actúan en el proceso de conversión a dsDNA del ssDNA generado en la primera etapa de la replicación. Se han descrito tres grupos principales de *sso* basados en la homología de su secuencia y están representados por los encontrados en los plásmidos pT181, pUB110 y pBAA1: *ssoA* ó *palA* (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a; Novick, 1989), *ssoU* ó *palU* (Boe y cols., 1989; van der Lelie y cols., 1989), y *ssoT* ó *palT* (Bron y cols., 1987; Chang y cols., 1987; Devine y cols., 1989; Meijer y cols., 1995c). Un cuarto tipo de *sso*, con una fisiología particular, parece estar representado por el *ssoW* del plásmido pWVO1 de

*Lactococcus lactis* (Leenhouts y cols., 1991). Todos estos orígenes de replicación pueden distinguirse por su secuencia, por el rango de huésped en que son funcionales y por el efecto que causa su delección en el número de copias y estabilidad segregacional del plásmido. Entre los cuatro grupos hay una homología de secuencia baja, pero en cada caso la secuencia funcional mínima es relativamente grande (130 a 280 pb) y contiene estructuras palindrómicas imperfectas que posibilitan la formación de una o más estructuras tipo tallo-lazo en cada una de las hebras del DNA. Todos tienen actividad dependiente de orientación, se encuentran "corriente arriba" del *dso* y dependen, total o parcialmente de la RNAP, para iniciar la replicación. Si a un plásmido se le deleciona su *sso* eficiente, acumula grandes cantidades de intermediarios ssDNA en este huésped, pero es todavía viable. Dependiendo del huésped y del plásmido, la delección del *sso* puede acompañarse también de un descenso en su número de copias y de inestabilidad segregacional (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a; Viret y Alonso, 1988; del Solar y cols., 1993a; Meijer y cols., 1995a; 1995b). Algunos plásmidos con replicación RC y su correspondiente *sso* se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Plásmidos con replicación RC y su correspondiente *sso*.

<i>sso</i> <sup>s</sup>	Plásmido <sup>r</sup>	Hospedador original
<i>ssoA</i>	pC194 <sup>e</sup> , pS194, pC221 <sup>e</sup> , pE194 <sup>e</sup> , pOX6, pC223, pUB112, pT181 <sup>e</sup> , pIM13, pSN2 <sup>e</sup> , pTCS1, pE12,	<i>Staphylococcus aureus</i>
	pIJ101	<i>Streptomyces lividans</i>
	pMV158 <sup>e</sup>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>ssoU</i>	pUB110 <sup>e</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	pMV158 <sup>e</sup>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	pTB913 <sup>e</sup>	<i>Bacillus termofilico</i>
<i>ssoT</i>	pBAA1 <sup>e</sup> , pLS11, pUH1, pTA1060 <sup>e</sup> , pTA1015 <sup>e</sup> , pTA1020, pTA1040 <sup>e</sup> , pTA1030, pTA1050,	<i>Bacillus subtilis</i>
	pG12, pTX14-3	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>ssoW</i>	pWV01 <sup>e</sup> , pSH71, pAI125, pFX2	<i>Lactococcus lactis</i>

(s) Los plásmidos pertenecientes a cada subgrupo de *sso* se comentan en el texto. (r) Los autores que aislaron y caracterizaron estos replicones se corresponden con los mencionados en la Tabla 2. (e) Plásmidos a los que se les ha determinado experimentalmente la función del *sso*. Los demás han sido deducidos por homología de secuencia o hibridación con sondas con un *sso* determinado.

*ssaA*: Los *ssa* del tipo *ssaA* funcionan eficazmente sólo en su hospedador original o en bacterias muy relacionadas (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a; Gruss y Ehrlich, 1989). El *ssaA* está comprendido en una región de 150 a 200 pb donde puede definirse una secuencia palindrómica imperfecta con potencial para formar una estructura tipo tallo-lazo, en el ssDNA, con un 70% de sus bases apareadas y energía de formación entre -60 y -80 kcal/mol (Gruss y cols., 1987). En la base de esta horquilla, hacia el extremo 5', se encuentra una secuencia de 15 nt (5'-TTTATGCCGAGAAAA-3') muy conservada en la mayoría de los plásmidos que presentan este tipo de origen (Gruss y cols., 1987; Novick, 1989). Esta secuencia (RS<sub>B</sub>) se había visto implicada en la formación de cointegrados plasmídicos por recombinación homóloga (Novick y cols., 1984a).

```

pC194 2042 tcTTTATTCCAATTtctgctttattgacgttgagcctcggaac-cc-ttaacaatccccaaacttgtcgaatggtcggcTTAATAGCTC
pOX6 166 gcTTTATTCCAATT---gctttattgacgttgagcctcggaac-cc-ttaacaatccccaaacttgtcgaatggtcggcTTAATAGCTC
pS194 2982 gcTTTATTCCAATT---gctttatttacattgagcctctgtac-cc-ttaacaacccccaaacttgtcgaatggtcgggCTAATA-CTC
pC221 793 gcTTTATTCCAATT-cctctatct-gccgatgattct--gcgctcc-ttaataatcctaaagct-gtccatcggtcgaaTTGATAGCTG
pE194 794 caTTTATTCCAATTtctctt--ttt-gcgtgtgatgagctgag-tccattaaaaatcctagagctttgcaaccgaaag--TTAATAGCTG
pLS1 4233 ttTTTATTCCA---tggtctatct-gacaacaagtaccagtgactgcccgtcctttgtccg--tgccgctcggaa-----

pC194 ACGCTAT-gccga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaaggggtctctctcaacgcac-aataaaTTTCTCGGCATAAAatgcg 2206
pOX6 ACGCTAT-gccga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaaggggtctctctcaacgcac-aataaaTTTCTCGGCATAAAatgctg 004
pS194 ACGCTAT-gc-ga-cattcgtctgcaa-gttta-gttaaggggtactctctcaa--tataaataaaTTTCTCGGCATAAAaagc 2825
pC221 ACGCTAT-ctgac-cgctggcgcttttagtctaa-ttaaggg-ctctcatcga--caaatagaTTTCTCGGCATAAAatgc 636
pE194 TCGCTAC-tactttcgcttacgctctaagtatatttaagga-ctgtcacacg--caaaaag-TTTCTCGGCATAAAag 637
pLS1 ACGCTAAagcctttcggtcggcagctcctagcgtactctgt-cactgcttattgtcaaatagc-TTTACGGCATAAAatcagt 4083

pUB112 586 gaaTTtTTtTAATTtcttattggtcggaacctacaa--tttcacatggtg-gtgagttggtacttctTGGGATT
pT181 512 gcTTTATTCCAATTtcttattggtcggaacctacagggctttagtggtg-ttgagttggtacttctTGGGATT
pIM13 995 gc-TTATTCCAATTtctt-attggttggaaccaacagcgcttagtggtg-ttgagttggtacttctTGGGATT
pSN2 87 gcTTTATTCCAATTtccattttgagcagaaactttactcat-atgatttggtg-gttgtaagt---TGGAATT
pTCS1 1185 atTTTAAaataATTgct-ttttgacttcacgatacgccttaagatttggtg-gttgtaagt---TGGAATT

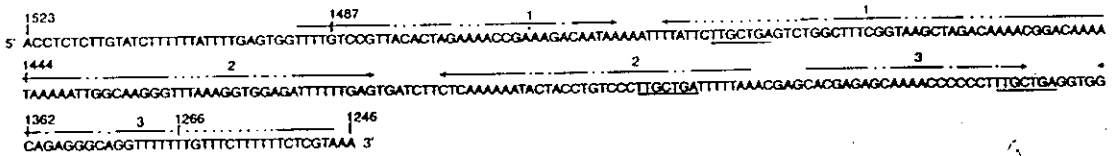
pUB112 AATCCCAat-caagccca-accactcgtaataaattaactaacacacttattattccaac-caataaggaatTaaaaaTgcg 435
pT181 AATCCCAatcaagtcga-accactcgtaaacagtttagctaacacatagcccatccaac-caataagTTTCTCGGCATAAAatgc 672
pIM13 AATCCCAatgaaaccccca-accactcgccaaagcgttggttaaacacacacgccattccaac-caata-gTTTTCTCGGCATAAAg 1151
pSN2 AATCCCAactaaaaccggcaccaaa-tcgccactgaagtggc-atcatattcgcttcttctcaaaaatgTTTTCTCGGCATAAAatgc 1219
pTCS1 AATCCCAactaaaaccggcaccaaa-tcgccactaaagtgg-tatcattttcgc-ttgctgtcAAAA-TTTCTCatttCAAatg 68

```

Figura 2. Comparación de varias secuencias *ssaA*. Se han alineado 10 secuencias del *ssaA* de diferentes plásmidos de *Staphylococcus aureus*. Se incluye además el *ssaA* del plásmido pLS1 (un derivado de pMV158) de *Streptococcus agalactiae*. Sólo se presenta la secuencia (5'→3') de la cadena complementaria a la reconocida por el huésped como origen de replicación plasmídico. Los números indican las coordenadas en la secuencia del plásmido. Los corchetes encierran la secuencia del RS<sub>B</sub>. Los nucleótidos conservados en cada subgrupo de plásmidos se presentan en letras mayúsculas (Figura tomada de Novick, 1989).

El segmento ssDNA que contiene el  $RS_B$  no es internamente complementario, presentando entre 30 y 40% de sus bases desapareadas. Existen además otras dos secuencias conservadas entre el *ssOA* de unos y otros plásmidos, que permiten subdividirlos en dos grupos (Fig. 2). El primero incluye el *ssOA* de pMV158, pE194, pC194, pC221, pOX6 y pS194. En estos plásmidos, además del  $RS_B$ , se encuentra una secuencia consenso (5'-TAGCGT-3') ubicada en la región desapareada del lazo de la horquilla (del Solar y cols., 1987a; Novick, 1989). Un segundo grupo de plásmidos, integrado por pUB112, pT181, pIM13, pSN2 y pTCS1 contiene en su *ssOA* otra secuencia, de 14 nt (5'-TGGGATTAATCCCA-3') localizada alrededor del punto de simetría palindrómico (Novick, 1989). Entre estos dos grupos de plásmidos, no existe relación secuencial alguna aparte del  $RS_B$  y la secuencia de bases complementarias a éste hacia el extremo 3' del tallo.

*ssOU*: Los *ssO* del tipo *ssOU* son completamente funcionales en huéspedes no relacionados como *S. aureus* (Boe y cols., 1989), *B. subtilis* (Bron y cols., 1988; Viret y Alonso, 1988; Boe y cols., 1989; van der Lelie y cols., 1989), *L. lactis* (Meijer y cols., 1995b) y *S. pneumoniae* (Kramer y cols., 1995; este trabajo). Mientras los *ssOs* del tipo *ssOA* forman un grupo bastante heterogéneo, los representantes del grupo *ssOU* muestran un alto nivel de homología en su secuencia (van der Lelie y cols., 1989; Priebe y Lacks, 1989). A pesar de que ambos tipos de *ssO* son reconocidos por un mismo factor del huésped, la RNAP, no existe un grado de homología significativo entre ellos. El *ssOU* se definió en un fragmento de 270 nt para el plásmido pUB110 de *S. aureus*, que contiene tres secuencias inversamente repetidas con capacidad de formar tres estructuras tipo tallo-lazo y una secuencia (5'-TTGCTGA-3') repetida tres veces (McKenzie y cols., 1986; Viret y Alonso, 1988; Boe y cols., 1989) (Fig. 3). Toda la región del *ssOU* se ha visto implicada en la unión del plásmido a la membrana de *B. subtilis* durante su replicación (Tanaka y Sueoka, 1983). En el plásmido pMV158 de *Streptococcus agalactiae* se encontró una región 99% homóloga al *ssOU* de pUB110, localizada "corriente arriba" del gen *mobM*, que actualmente se sabe que funciona como origen de replicación de la cadena complementaria del plásmido (Meijer y cols., 1995a; 1995b; Kramer y cols., 1995). También se ha definido la presencia de un *ssO* del tipo *ssOU* en el plásmido pTB913 procedente de una especie termofílica de *Bacillus* (van der Lelie y cols., 1989).



**Figura 3. Secuencia nucleotídica del *ssoU* de pUB110.** Se representa la secuencia funcional mínima del *ssoU* en la cadena (+) del plásmido (coordenadas 1523 a 1246). Las posiciones 1487 y 1266 enmarcan la secuencia más larga que no es funcional (medido como incremento de ssDNA *in vivo*). Las flechas representan las repeticiones inversas imperfectas en donde cada palíndromo se señala con un mismo número (1-3). El heptanucleótido subrayado se encuentra repetido tres veces en esta secuencia (Tomado de Boe y cols., 1989).

*ssoT*: Este tipo de *sso* se ha descrito para plásmidos de distintas especies de *Bacillus*, en donde se distinguen dos subgrupos muy relacionados, *ssoT1* y *ssoT2*, representados por los plásmidos pTA1040 y pBAA1/pTA1015 (Seery y Devine, 1993; Meijer y cols., 1995c). Ambos subgrupos tienen una homología del 77% entre sus secuencias y la posibilidad de formar estructuras secundarias similares en el ssDNA. El *sso* más estudiado es el de pBAA1 (*ssoT2*) de *B. subtilis*. Está contenido en un fragmento de unos 170 nt, que presenta tres secuencias palindrómicas con potencial para formar tres estructuras tipo tallo-lazo (Fig. 4). Mediante análisis de deleciones, inserciones y sustitución de nucleótidos en la secuencia original del origen, se establecieron las necesidades estructurales y/o de secuencia para su funcionalidad. Éstas incluyen: i) elementos de la horquilla I que están muy conservados entre los plásmidos con este tipo de *sso* (motivo I), y posiblemente un segundo motivo conservado (motivo II) ubicado en el lazo de la misma; ii) la estructura y la posición relativa (pero no la secuencia) de la horquilla III, y iii) una secuencia muy conservada (motivo III), ubicada entre las horquillas II y III. Es necesario que estos tres elementos participen en conjunto, ya que ninguno por sí solo es capaz de conseguir la actuación óptima del *sso* (Seery y Devine, 1993). El motivo I es homólogo a la secuencia *pasBH* de pBR322 mientras que nueve nucleótidos del decámero del motivo III tiene homología con secuencias *ssi* de un amplio rango de plásmidos de *E. coli*. Los plásmidos pG12 de *B. thuringiensis* y pUH1 de una

estirpe de *B. subtilis* industrial presentan una clara homología de secuencia, sobre todo en los tres motivos conservados, lo que sugiere que estos plásmidos contienen un *ssu* del tipo *ssuT2* y que estos motivos tienen bastante importancia en la funcionalidad del mismo (Fig. 4). El plásmido pTX14-3 de *B. thuringiensis* también presenta cierta similitud con los *ssu* del grupo *ssuT* (Madsen y cols., 1993). Al igual que en los casos anteriores (*ssuA* y *ssuU*), es necesario la presencia de la RNAP para dar inicio a la replicación a partir del *ssu* de pABB1. Se ha visto que este origen es eficiente en *B. subtilis* (su huésped original) y en *S. aureus* (Seery y Devine, 1993). Al subgrupo de plásmidos que contienen un *ssu* del tipo *ssuT2* pertenecen también pLS11, pTA1015, pTA1020 y pTA1060 de *B. subtilis*. Los miembros del subgrupo que poseen un *ssuT1* están representados por los plásmidos pTA1030, pTA1040 y pTA1060 (Meijer y cols., 1995c).

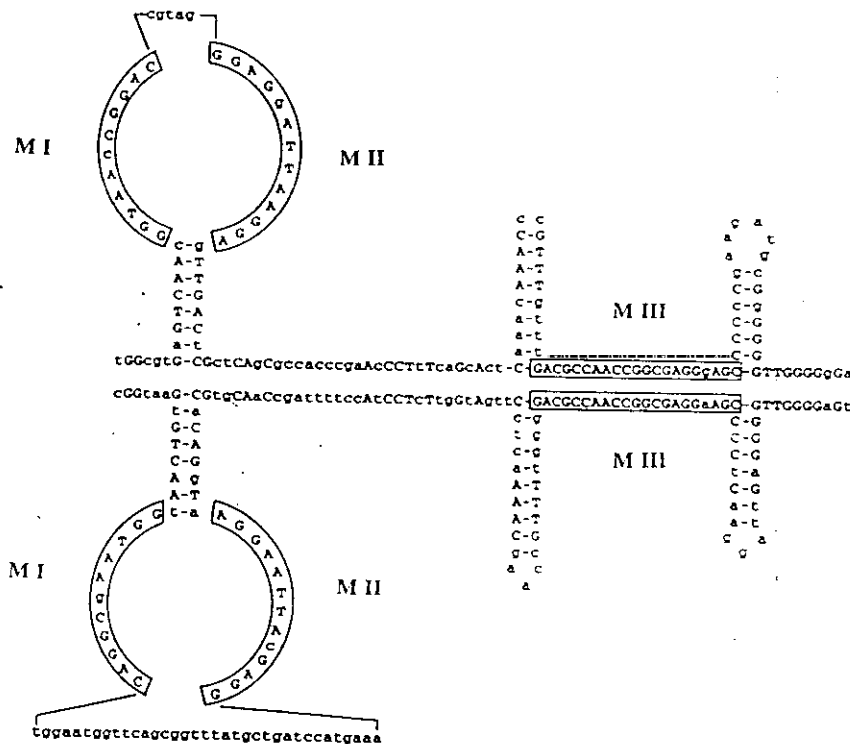


Figura 4. Comparación entre los *ssuT* de pBAA1 y pG12. Se presenta la secuencia y la estructura predicha por ordenador del fragmento que contiene el *ssu* en los plásmidos pBAA1 (arriba) y pG12 (abajo). Cada secuencia puede formar tres estructuras tipo tallo-lazo. Los recuadros encierran los tres motivos conservados (M I, M II y M III). Estos motivos se encuentran presentes en todos los *ssu* del tipo *ssuT*. (Figura tomada de Seery y Devine, 1994).

*ssow*: Hasta la fecha, el único *ssow* del tipo *ssow* que se ha analizado en detalle, es el descrito para el plásmido pWV01 de *L. lactis*. Al igual que el *ssoa*, este origen de replicación es poco funcional en huéspedes como *B. subtilis* y *E. coli* (Leenhouts y cols., 1991). Por homología de secuencias, se ha visto que los plásmidos pSH71 y pDI125 de lactobacilos también tendrían un *ssow* similar (de Vos, 1987; Xu y cols., 1991). El *ssow* de pWV01 está comprendido en un fragmento de 250 nt que contiene dos secuencias inversamente repetidas (IR I y IR II) con capacidad de formar dos horquillas en el ssDNA. Se necesita la presencia de ambas IRs para conseguir la funcionalidad total del origen. Sin embargo, IR I por sí sola es capaz de estabilizar un derivado inestable del plásmido, restablecer su número de copias a un nivel casi original y actuar como señal de conversión (poco eficiente) del ssDNA, siguiendo una ruta independiente de la RNAP (Seegers y cols., 1995). Esta secuencia es homóloga a la región *pas* de  $\phi$ X174, implicada en el ensamblaje del primosoma para la síntesis de la cadena retrasada del fago. IR II no tiene actividad por sí mismo, pero se requiere para el funcionamiento óptimo del origen. En el caso que ambas secuencias se encuentren presentes es necesario la acción de la RNAP para dar inicio a la replicación de esta cadena. Esto sugiere la existencia de dos rutas diferentes, en donde la más eficaz depende de IR I, IR II y RNAP y la segunda sólo depende de la presencia de IR I (Seegers y cols., 1995).

Además de estos cuatro tipos principales de *ssow*, se han descrito una serie de orígenes de conversión del ssDNA en plásmidos de diversa procedencia, que no presentan homología con ninguno de los grupos anteriores. Nos referimos al *ssow* de p8014-2 de *Lactobacillus plantarum* (Leer y cols., 1992), a los *ssow* de pNostoc, pMA1, pRF1 de cianobacterias, al *ssow* de pTD1 de *Treponema dendricola* (Seery y cols., 1993) y al *ssow* de pKYM aislado de *Shigella sonnei*, una especie muy relacionada con *E. coli* y que presenta cierta homología de secuencia con el *ssow* de colifagos de cadena sencilla (Yasukawa y cols., 1991; Seery y cols., 1993).

### 3. MECANISMOS DE INICIACIÓN DE LA CADENA RETRASADA

El proceso de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA se estudió detalladamente y por primera vez

en los colifagos de cadena sencilla. El mecanismo de replicación que siguen estos fagos es vía círculo rodante, en el que se distinguen las mismas etapas que para la replicación de plásmidos, anteriormente descritas. Al tratarse de fagos monocatenarios es preciso que, una vez que infectan la célula, adquieran su forma replicativa (RF) bicatenaria para poder incrementar su número intracelular y generar nuevas moléculas ssDNA que se exportarán al exterior celular. Para ello, y al igual que los plásmidos con replicación RC, utilizan proteínas de la maquinaria celular. En la Figura 5 se esquematizan los mecanismos principales de iniciación de la cadena retrasada.

Los colifagos de cadena sencilla se dividieron en dos clases basadas en la morfología de sus representantes: isométricos (o icosaédricos) y filamentosos. Ambas clases contienen un genoma ssDNA circular y son similares en cuanto al tamaño, estructura y organización genómica, sin embargo el sistema de infección que emplea cada uno es muy diferente. Mientras que los fagos isométricos siguen un ciclo infectivo convencional de adsorción, reproducción y liberación de partículas hijas después de la lisis del huésped, los fagos filamentosos no matan a sus células hospedadoras. En este caso la progenie vírica se forma y libera de manera continua a través de la membrana celular, modificando muy poco el crecimiento normal del hospedador. Los fagos isométricos se han clasificado en tres grupos según su rango de huésped, especificidad sérica y requerimientos de la célula hospedadora para su replicación (Baas, 1985):

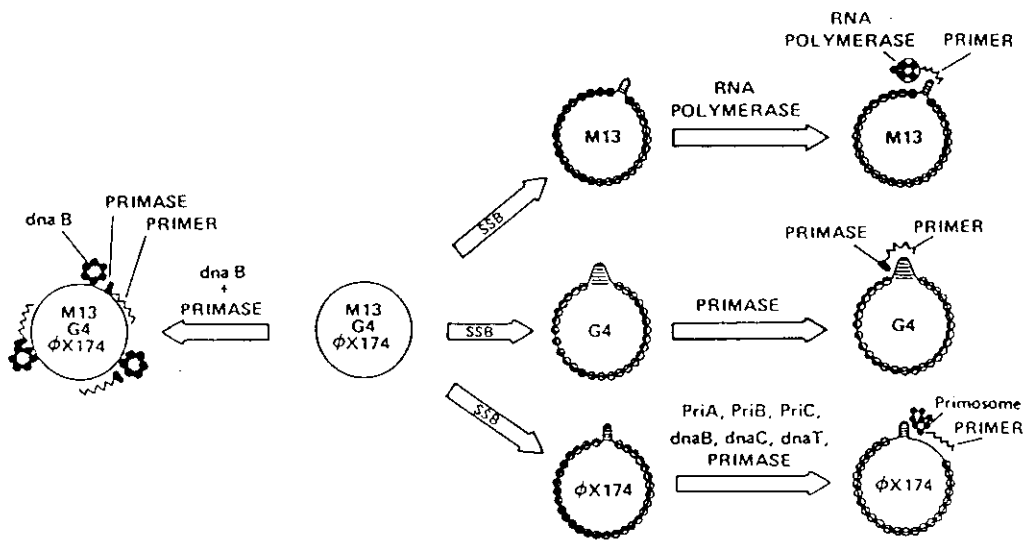
a) øX174	b) G4	c) St-1
S13	G13	øK
G6	G14	α3
	U3	

Todos los fagos isométricos codifican para la misma serie de 11 proteínas, pero se diferencian bastante en cuanto a la secuencia nucleotídica y longitud de su genoma. Los fagos filamentosos se clasifican en tres grupos que difieren según el factor sexual de sus huéspedes (Baas, 1985):

- a) grupo Ff (fd, fl y M13): Sólo infectan células de *E. coli* que contengan el factor F, ya que se adsorben a través de los pili de tipo F.

- b) If1: Infeccionan células de *E.coli* que contengan plásmidos del grupo de incompatibilidad I.
- c) Ike: Infeccionan células de *E.coli* que contengan plásmidos del grupo de incompatibilidad N.

A diferencia de los fagos icosaédricos, el tamaño, así como la secuencia nucleotídica en los fagos filamentosos pertenecientes al mismo grupo, es prácticamente idéntico.



**Figura 5. Sistemas principales de iniciación de la cadena complementaria.** Hacia la derecha (en presencia de SSB), se representan los tres mecanismos específicos de síntesis del RNA cebador para la replicación de la cadena retrasada de los fagos M13, G4 y φX174. A la izquierda (en ausencia de SSB), se ilustra el mecanismo inespecífico de síntesis de pRNAs propuesto por Arai y Kornberg (1979). Los orígenes de replicación de cadena sencilla de cada fago se representan con . Los cuatro mecanismos de síntesis se detallan en el texto. (Figura tomada de Kornberg y Baker, 1992).

### 3.1. Iniciación por primasa

En los fagos isométricos G4, α3, øK y St-1, la conversión de la hebra de DNA viral monocatenaria a bicatenaria depende de SSB, DNA polimerasa III (HE) y DnaG (primasa) de *E. coli*. Este último enzima sintetiza el RNA cebador, dando lugar al inicio de la síntesis de la cadena complementaria del fago (Zechel y cols., 1975). Existe un único sitio en el



su secuencia favorece la formación de una estructura inusualmente estable (Hirao y cols., 1990). La horquilla III es de mayor tamaño, también estable (-36,8 kcal) con una región interna desapareada. Está separada de la horquilla I por 33 nt. La horquilla II es bastante débil (-8,8 kcal) y estaría presente en la región espaciadora de 33 nt. Algunos autores consideran inexistente esta última estructura (Sims y cols., 1979). En los fagos  $\phi$ K,  $\alpha$ 3 y St-1 pueden encontrarse horquillas equivalentes a la I y III del *ss0* de G4. Se realizaron experimentos de protección del DNA a la degradación por nucleasas en presencia de SSB y primasa, los cuales evidenciaron tres grupos de nucleótidos protegidos, bien separados, dentro de la región del origen (Sims y Benz, 1980). Estas regiones se localizan en el tallo y base de la horquilla I y en las regiones que flanquean a la horquilla III. Se analizó la importancia relativa de cada una de las estructuras tallo-lazo en los fagos G4,  $\phi$ K y  $\alpha$ 3 mediante la inserción y delección de nucleótidos que alterasen el tamaño, forma o espaciado entre las horquillas, así como la importancia de la secuencia del DNA en cada una de las tres estructuras y regiones adyacentes, mediante sustitución de bases. También se analizó la capacidad de estos fagos con el *ss0* mutado, de sintetizar el pRNA *in vitro*. Los datos obtenidos permitieron concluir todos los aspectos necesarios para un buen funcionamiento de este origen de replicación: i) En primer lugar, se vio que la secuencia conservada 5'-CTG-3' ubicada 5 nt "corriente arriba" de la horquilla I, es fundamental para la síntesis del pRNA, ya que cualquier alteración de su secuencia abolía completamente la función del origen. ii) Es necesario que la distancia de 6 nucleótidos se mantenga entre la secuencia 5'-CTG-3' y la base de la horquilla I. Si se aumenta o disminuye esta distancia, el reconocimiento del *ss0* de G4 disminuye notablemente (Hiasa y cols., 1989). Estos resultados, así como la síntesis *in vitro* de un pRNA de 6 nt en presencia de dNTPs, sugiere que la horquilla I juega un papel esencial en la transición RNA-DNA (Hiasa y cols., 1989). iii) Se ha visto una dependencia absoluta de la talla y dimensión de las horquillas I y III, mientras que la II puede hacerse prescindible en el caso del fago G4. No obstante, el espaciado de 33 nt entre ambas y algunos componentes de la secuencia de éste también son importantes (Sakai y Godson, 1985). iv) La secuencia nucleotídica en la base de la horquilla III es fundamental. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos de protección del DNA con primasa, sugiriendo que esta región sería directamente reconocida por la proteína (Sims y Benz, 1980).

Existen datos que contradicen casi totalmente los resultados descritos anteriormente. Swart y Griep (1993), en un minucioso trabajo, demostraron que no son necesarias las estructuras tipo tallo-lazo en ninguno de los casos ni el recubrimiento con SSB del DNA para la buena funcionalidad del origen. Por el contrario, y continuando con el modelo planteado por los autores previamente señalados, Sun y Godson (1993) enfatizan en la necesidad de SSB para el reconocimiento específico del *ss* de G4 por la primasa, detallándose la estequiometría del proceso: dos tetrámeros de SSB se unen a una molécula de DNA de 100 nt que contenga la estructura básica del origen. Para fragmentos ssDNA de mayor tamaño, la unión de SSB se haría de un tetrámero cada 30 a 65 nt. Coincidiendo con observaciones anteriores (Zechel y cols., 1975; Kornberg y Baker, 1992), se vio que la primasa sólo es capaz de sintetizar el pRNA cuando el DNA está saturado de SSB. Así pues, SSB tendría una función fundamental en la organización estructural del origen, permitiendo que se expongan las regiones importantes del DNA para el reconocimiento por la primasa. Los experimentos de protección del DNA con SSB realizados, pusieron de manifiesto la acción de estas proteínas en la disposición de la horquilla I, ubicándola de tal forma que quede accesible a la acción de las nucleasas y al ataque químico (Sun y Godson, 1993).

### 3.2. Iniciación por RNAP

En los fagos filamentosos, el pRNA es sintetizado por la RNAP de la bacteria (Geider y Kornberg, 1974). Los fagos filamentosos mejor estudiados pertenecen al grupo Ff (fd, f1, M13). Entre éstos y el genoma de IKe (también filamentosos pero perteneciente a otro grupo), existe una homología total del 55% que se manifiesta particularmente intensa en la región del *ss*. Estos fagos, al igual que los estudiados en el apartado anterior, poseen un único sitio para el inicio de la síntesis de la cadena retrasada. Esta región, de aproximadamente 130 nt, se localiza entre los genes II y IV y consta de dos secuencias inversamente repetidas que pueden aparearse formando dos horquillas muy estables de 55 y 59 nt (horquillas B y C), separadas entre sí por una secuencia de 13 nt (Tabak y cols., 1974; Higashitani y cols., 1993) (Fig. 7). La existencia de regiones bicatenarias en este fragmento se confirmó mediante experimentos de migración electroforética en geles nativos de poliacrilamida, tratamiento con nucleasa S1, y por microscopía electrónica (Schaller y cols., 1976).

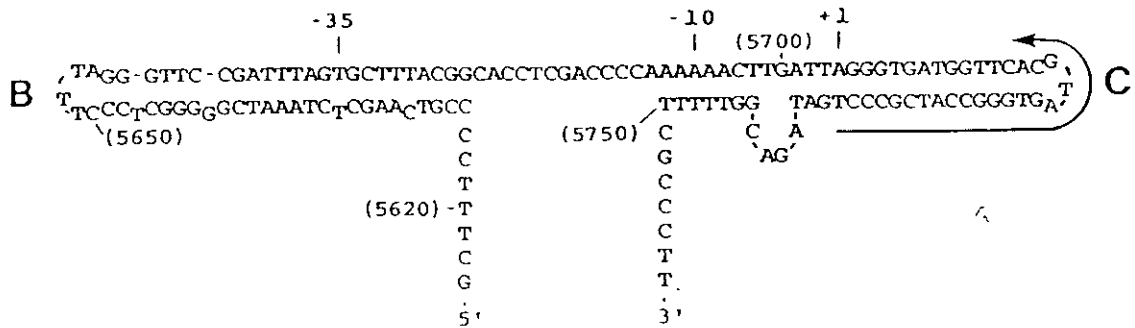


Figura 7. Origen de replicación de la cadena complementaria del fago f1. Se presenta la secuencia nucleotídica y la estructura secundaria (horquillas B y C) propuesta para el *ssO* de f1. La flecha representa al pRNA. Los números entre paréntesis indican las coordenadas en la secuencia del fago. Se indican las cajas -10 y -35 del putativo promotor del pRNA, así como la posición del nucleótido +1 de éste. (Figura tomada de Higashitani y cols., 1993).

La capacidad de la RNAP para actuar de forma específica en el *ssO* se la confiere la subunidad  $\sigma^{70}$  del holoenzima (Kaguni y Kornberg, 1982). También en este caso es necesario que el genoma monocatenario del fago esté completamente recubierto de SSB para que esta especificidad de inicio se mantenga. En los ensayos de síntesis *in vitro* de RNA realizados con RNAP core (sin  $\sigma^{70}$ ) y utilizando como sustrato el ssDNA de M13 y de  $\phi$ X174, se observó la generación de pRNAs de tamaños variables e inespecíficos en ambos genomas, independientemente de haber sido o no tratados con SSB. Cuando SSB está ausente de la preparación, tanto el holoenzima RNAP (con  $\sigma^{70}$ ) como RNAP core, son capaces de sintetizar distintas moléculas de pRNA con un rendimiento bajo pero similar para ambos sustratos (Kaguni y Kornberg, 1982). Estos resultados llevaron al planteamiento de un mecanismo que actuaría para el inicio de la síntesis de la cadena complementaria en todos los fagos filamentosos: i) SSB se une específicamente al ssDNA, recubriendo todo el genoma del fago excepto las regiones bicatenarias estables del *ssO*. ii) RNAP (HE) reconocería la estructura libre de SSB y sintetizaría un pRNA de tamaño y secuencia específica. iii) SSB se uniría a la región recién desapareada de la horquilla permitiendo una interacción estable del RNA a

su molde DNA. iv) Dado que la RNAP no puede desplazar el SSB unido al templado, se disociaría al colisionar con éste. v) A continuación, la DNA polimerasa III (HE) utilizando el extremo 3'-OH del pRNA como cebador, sintetizaría la cadena complementaria del DNA vírico, en una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP (Wickner y Kornberg, 1973). vi) La síntesis se completaría con la sustitución del pRNA por deoxiribonucleótidos y ligación de los extremos 3' y 5' consiguientes, llevado a cabo por la DNA polimerasa I y por la ligasa del huésped, respectivamente (Kornberg y Baker, 1992).

Mediante experimentos de protección del DNA a la degradación por nucleasas en presencia de SSB y RNAP, se confirmó la necesidad de las dos estructuras tallo-lazo del origen para la unión del enzima (Schaller y cols., 1976). El exámen de la secuencia "corriente abajo" del sitio de inicio del pRNA en los fagos del grupo Ff, no revela la existencia de regiones -35 y -10 claras, características de promotores reconocidos por  $\sigma^{70}$ , aunque pueden encontrarse secuencias parecidas a las consenso en estas posiciones (Fig. 7). Los estudios posteriores demostraron que estas regiones son capaces de actuar como promotores débiles, *in vivo* (Higashitani y cols., 1993). Se ha analizado la secuencia de los RNA cebadores mayoritarios de los fagos f1, fd e IKe (Geider y cols., 1978; Higashitani y cols., 1993). Éstos constan de 20 nucleótidos y mapean entre las posiciones 5736 a 5717 para los dos primeros fagos (Fig. 7), y entre los nucleótidos 6441 y 6422 para IKe. Dada la gran similitud de estos *ssO*, la secuencia de los RNA cebadores es prácticamente la misma para todos ellos.

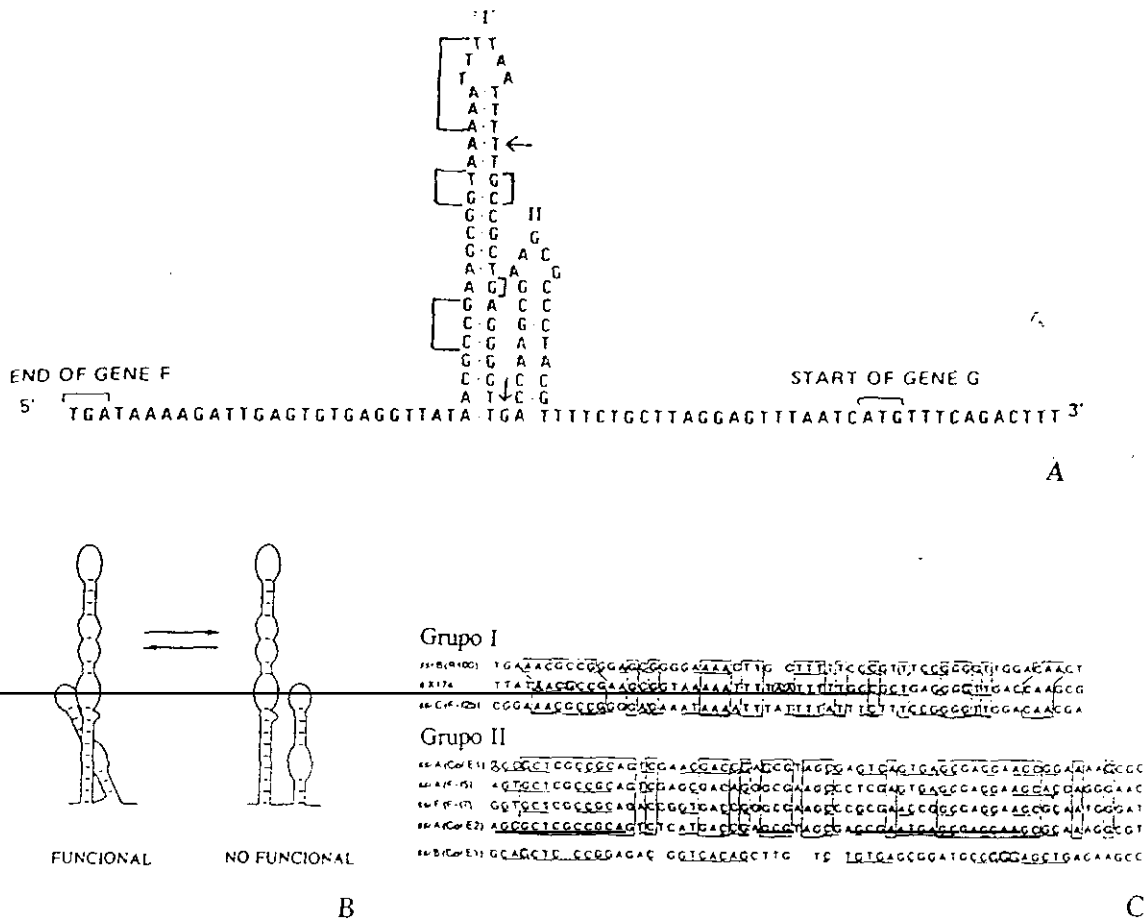
### 3.3. Iniciación por primosoma

El primosoma es un complejo multiproteico integrado por siete proteínas bacterianas, con capacidad de translocarse a lo largo de su sustrato ssDNA y cuya función principal es generar moléculas de RNA, que serán empleadas como cebadores durante la replicación de la cadena retrasada. El sistema donde por primera vez y más detalladamente se ha estudiado este mecanismo, es el colifago de cadena sencilla  $\phi$ X174. También se ha descrito la participación de todas las proteínas del primosoma en la síntesis de los fragmentos de Okasaki durante la replicación discontinua de la cadena retrasada del cromosoma de *E. coli*,

así como durante la replicación de numerosos plásmidos de ésta (McMacken y cols., 1977; van der Ende y cols., 1983; Masai y cols., 1990a). El ensamblaje del primosoma se realiza en un sitio específico del ssDNA cubierto de SSB, denominado *pas* y transcurre en varias etapas. La primera, es la formación del pre-primosoma o complejo inicial, en donde el factor Y (PriA o proteína n') se une de forma específica al sitio *pas* del ssDNA. Se supone que las proteínas n (PriB) y n'' (PriC), también integrantes del complejo, están asociadas a este factor y facilitan su interacción con el DNA (Baas, 1985). El paso siguiente es la integración de las proteínas DnaB, DnaC y DnaT (proteína i) para formar el pre-primosoma completo, en una reacción dependiente de la hidrólisis de ATP. Este complejo puede moverse de forma procesiva en ambas direcciones del ssDNA (Lee y Marians, 1989). Como respuesta a alguna señal aún no identificada, la primasa (DnaG) se asocia al pre-primosoma, formando el complejo multiproteico del primosoma, que se encarga de la síntesis de moléculas de RNA cebadoras en varias posiciones del ssDNA. La primasa se asocia y disocia del complejo a intervalos relativamente uniformes del templado, que dependen de la concentración del enzima en el medio de reacción (McMacken y cols., 1977). En un sistema acoplado a la síntesis de DNA, las moléculas de RNA generadas oscilan entre 1 y 9 nucleótidos y los sitios preferentes de iniciación corresponden a la secuencia pppA-Pu en los cebadores (Ogawa y cols., 1983). Esta observación coincide con la secuencia inicial pppA-G del único RNA descrito para el fago G4 (ver apartado 3.1). En el fago øX174, Arai y Kornberg (1981), observaron que el primosoma se movía en dirección 5' → 3' sobre el sustrato ssDNA, en dirección opuesta a la de síntesis de los RNAs. Más tarde se vio que la dirección del movimiento tanto del primosoma como la del pre-primosoma estaba determinada por la concentración y por el tipo de nucleósido trifosfato presente en la reacción: mientras que la actividad 5' → 3' se manifiesta en presencia de mezclas de rNTP a concentraciones tan bajas como 10 µM cada uno, la actividad 3' → 5' sólo se observa cuando hay ATP en cantidades mayores a 100 µM (Lee y Marians, 1989). Dado que el factor Y y la DnaB poseen actividad helicasa 3' → 5' y 5' → 3' respectivamente, se ha sugerido que las fuerzas que guían al primosoma en una u otra dirección vienen dadas por cada una de estas proteínas. Sin embargo, el primosoma debe moverse principalmente en un sólo sentido, por lo que debe existir un factor encargado de tomar esta decisión. El candidato más probable de cumplir esta función se piensa que sea la proteína n (Lee y Marians, 1989). Durante la replicación de la cadena retrasada del cromosoma de *E. coli*, la actividad del primosoma se ve facilitada por

la acción helicasa 5' → 3' de la proteína DnaB, que va desenrollando las hebras del DNA por delante de la horquilla de replicación. Para el fago øX174, se ha propuesto que la función de la proteína DnaB sería propulsar la estructura del pre-primosoma en dirección 5' → 3' e ir generando la estructura necesaria en el DNA capaz de ser reconocida por la primasa (Arai y Kornberg, 1981).

El sitio de ensamblaje del pre-primosoma al ssDNA (*pas*) está constituido por regiones simétricas que pueden plegarse adoptando distintas conformaciones alternativas. Estudios detallados de mutantes puntuales en la secuencia *pas*BH de pBR322 permitieron definir una estructura terciaria funcional formada por dos horquillas que interactúan entre sí (Greenbaum y Marians, 1985) (Fig. 8b). Las regiones *pas*, tienen dos propiedades que permiten localizarlas en cualquier DNA: i) cuando se clonan en fagos monocatenarios sirven como orígenes de conversión ss → dsDNA, en un sistema dependiente de las proteínas del primosoma (Zipurski y Marians, 1981) y ii) promueven la acción ATPásica dependiente del DNA del factor Y de *E. coli* (Wickner y Hurwitz, 1975). Basándose en estas propiedades se han identificado regiones *pas* en varios plásmidos de *E. coli*, así como en su cromosoma (Zipursky y Marians, 1981; Nomura y cols., 1982; van der Ende y cols., 1983; Masai y cols., 1990a). Las secuencias nucleotídicas de estas regiones permitieron definir dos grupos con alta homología entre sí (Masai y cols., 1990a). El primer grupo está representado por la secuencia *pas* de øX174 y el segundo por la secuencia *pas* de la cadena de DNA con replicación discontinua del plásmido ColE1. En cada grupo se destaca la conservación de una serie de nucleótidos en la estructura del tallo principal (Fig. 8c). A pesar de no existir una homología de secuencia significativa entre ambos grupos (excepto por el pentanucleótido 5'-CGCCG-3'), todos promueven la función ATPásica del factor Y y son capaces de iniciar el proceso de síntesis de la cadena complementaria. Ésto plantea la posibilidad de que el factor Y reconozca más de una secuencia en el DNA y que éstas deben situarse en un entorno bien estructurado para su reconocimiento. Los análisis realizados de protección del DNA a la digestión por nucleasas en presencia del factor Y permitieron identificar los nucleótidos implicados en la unión de esta proteína a la horquilla mayor del *ssø* de øX174 (Greenbaum y Marians, 1984) (Fig. 8a).



**Figura 8. Elementos reconocidos por el primosoma.** Se presentan diferentes secuencias (y estructuras) del DNA reconocidas por el primosoma de *E. coli* (secuencias *pas* o *ssi*). a). Origen de replicación de la cadena complementaria del fago  $\phi$ X174. El plegamiento de su secuencia en dos estructuras tipo tallo-lazo (horquillas I y II) se realizó mediante predicción por ordenador. Los corchetes y las flechas indican los nucleótidos protegidos del ataque por la DNasa pancreática en presencia del factor Y (Greenbaum y Marians, 1984). b). Estructuras funcional e inactiva de la región *pasBH* de pBR322 para el reconocimiento del primosoma. Este funcionamiento podría ser extensible a todas las secuencias *pas* (*ssi*) involucradas en el ensamblaje del primosoma (Greenbaum y Marians, 1985). c). Comparación de los *ssi* de diferentes plásmidos (R100, F, ColE1, ColE2) y del fago  $\phi$ X174 y su división en grupos (I y II) según la homología de sus secuencias. Los nucleótidos comunes en cada grupo están recuadrados. Las flechas invertidas, indican las secuencias palindrómicas capaces de formar estructuras tipo tallo-lazo. Los residuos encerrados en círculos están protegidos frente a la metilación en presencia del factor Y (Masai y cols., 1990a).

**3.3.1. El primosoma ABC.** Este complejo iniciador se diferencia del anterior principalmente en la naturaleza de las proteínas que lo integran, ya que el funcionamiento es muy similar en ambos casos. El primosoma ABC se compone de las proteínas DnaA, DnaB y DnaC y se ha descrito en la iniciación de los fragmentos de la cadena discontinua del plásmido R6K (Masai y cols., 1990b). El sitio *pas* en este plásmido también se encuentra

en una región estructurada del DNA y se requiere SSB para que la interacción del complejo sea específica. En el tallo de esta horquilla se encuentra una secuencia reconocida por la proteína DnaA (5'-TTTTCCACA-3') y es aquí donde tiene lugar el ensamblaje del primer componente del primosoma. Estudios de protección del DNA frente a la digestión por nucleasas en presencia de DnaA pusieron de manifiesto la protección total de la estructura de la horquilla (Greenbaum y Marians, 1984). El complejo DnaB/DnaC favorece la interacción de DnaA al sitio *pas* y es DnaB la proteína encargada de promover la traslocación del primosoma a lo largo de la cadena retrasada del DNA plasmídico. Los pRNAs producidos *in vitro* tienen un tamaño aproximado de 30 nt y son sintetizados a intervalos de 1 kb sobre el templado.

### 3.4. Síntesis inespecífica de RNA cebadores

Cada uno de los tres mecanismos de iniciación de la síntesis de la cadena retrasada comentados, sólo son capaces de reconocer una señal muy específica en el DNA, donde poder ensamblarse y comenzar la síntesis del o los RNA cebadores. Para que este reconocimiento tenga lugar en un solo sitio, el DNA molde debe estar recubierto de SSB, quedando libre solamente la región estructurada del *ssø*. Existen numerosas pruebas que avalan la utilización mayoritaria de estos sistemas específicos en la célula viva. Sin embargo, el hecho de que tanto fagos monocatenarios como plásmidos con sus vías principales de síntesis alteradas (por deleción o inhibición) continúen replicando, pone de manifiesto la existencia de mecanismos alternativos y probablemente inespecíficos, de inicio de la hebra complementaria. Arai y Kornberg (1979) describieron un sistema general, muy simple, de síntesis de pRNAs en ssDNAs descubiertos de SSB, donde no se requiere ninguna estructura o secuencia específica, siendo funcional incluso si se utiliza cadenas poli(dT) como sustrato (Fig. 5). Este sistema es inespecífico, ya que no es necesario una secuencia de reconocimiento en el DNA y, en ausencia de DNA polimerasa III (HE), se producen múltiples cebadores (de tamaños comprendidos entre 10 y 50 nucleótidos) a partir de diferentes posiciones del templado. Sin embargo, estos productos no parecen ser sintetizados al azar, ya que el patrón observado para cada ssDNA es bastante diferente, sugiriendo la existencia de sitios preferenciales de inicio en cada caso. Las proteínas implicadas en este

proceso son DnaB y primasa que, en presencia de ATP, se asocian al DNA produciendo los cebadores que serán elongados por la DNA polimerasa III (HE). En M13 y G4, en donde los sistemas específicos (RNAP y primasa) generan solamente un único tipo de pRNA a partir de un templado cubierto de SSB, la diferencia respecto a este otro sistema de síntesis es bien acusada. Por el contrario, para øX174, en donde la síntesis específica implica la elaboración de múltiples cebadores en varias posiciones del DNA, la diferencia no es tan marcada, ya que el tamaño, cantidad y la distribución de éstos es similar en ambos sistemas (Arai y Kornberg, 1979). En cualquiera de los tres casos, la adición de SSB inhibe por completo la síntesis inespecífica. En øX174 las diferencias más importantes entre uno y otro mecanismo se refieren a la actuación de DnaB. En el primosoma, una molécula de DnaB asociada a un ssDNA circular actúa de forma procesiva mediando la síntesis de todos los cebadores de ésta. Tampoco se disocia de su sustrato durante la elongación del DNA por la DNA polimerasa III (HE) ni durante el relleno y cierre de la hebra complementaria totalmente sintetizada. Por el contrario, en la síntesis inespecífica, DnaB sólo es capaz de mediar la síntesis de una única molécula de pRNA antes de disociarse del DNA y no permanece unida durante la elongación, relleno y cierre de la cadena. Otra diferencia la supone el requerimiento de las proteínas Y, n, n'', DnaT y DnaC del primosoma, mientras que la síntesis inespecífica prescinde totalmente de ellas.

#### **4. PLÁSMIDOS QUE REPLICAN VÍA CÍRCULO RODANTE**

La característica más destacable que permite distinguir un plásmido que replica vía círculo rodante, es la generación de intermediarios de DNA monocatenario durante su proceso replicativo (te Riele y cols., 1986). Otra característica común, es la organización funcional y estructural de su genoma. Se ha propuesto que estos replicones están constituidos por módulos de genes intercambiables entre los diferentes plásmidos (Projan y Novick, 1988). El orden relativo de estos módulos es variado en cada caso, mientras que la dirección en que se transcriben sus genes principales suele ser la misma en todos los plásmidos y coincidente con la de síntesis de la cadena líder. Uno de estos módulos está siempre presente, ya que contiene las funciones esenciales para la iniciación y control de la replicación de plásmido (LIC) (del Solar y cols., 1993b). Además de éste, se han definido otros tres

módulos principales que pueden estar o no presentes: i) DET, que incluye uno o más determinantes de resistencia a antibióticos, ii) MOB/PRE, que contiene un gen involucrado en la movilización conjugativa y recombinación del plásmido y iii) SSO, que posee el sitio de iniciación de la cadena complementaria y se encuentra en todos estos replicones. Basándose en la homología de la secuencia del DNA en la región LIC, se definieron cinco familias de plásmidos que replican vía RC (Tabla 2).

Tabla 2. Familias de plásmidos con replicación RC

Plásmido	Tamaño (kb)	Huésped original	Referencias
pT181	4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Iordanescu, 1976a
pT127	4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pC221	4.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1976
pC223	4.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1976
pS194	4.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Iordanescu, 1976b
pUB112	4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1976
pCW7	4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pHD2	2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	McDowell y Mann, 1991
pC194	2.9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Horinouchi y Weisblum, 1982b
pUB110	4.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	McKenzie y cols., 1986
pOX6	3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pWGB32	2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Grinius y cols., 1992
pSK89	2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Littlejohn y cols., 1991
pTA1015	5.8	<i>Bacillus subtilis</i>	Meijer y cols., 1995c
pTA1020	6.8	<i>Bacillus subtilis</i>	Uozomi y cols., 1980
pTA1030	7.3	<i>Bacillus subtilis</i>	Uozomi y cols., 1980
pTA1040	7.8	<i>Bacillus subtilis</i>	Meijer y cols., 1995c
pTA1050	8.2	<i>Bacillus subtilis</i>	Uozomi y cols., 1980
pTA1060	8.7	<i>Bacillus subtilis</i>	Meijer y cols., 1995c
pBAA1	6.8	<i>Bacillus subtilis</i>	Devine y cols., 1989
pFTB14	8.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Murai y cols., 1987
pBC16	4.6	<i>Bacillus cereus</i>	Gruss y cols., 1987
pBC1	1.6	<i>Bacillus coagulans</i>	de Rossi y cols., 1992
pLPI	2.1	<i>Lactobacillus plantaricum</i>	Bouia y cols., 1989

pIJ101	8.8	<i>Streptomyces lividans</i>	Kendell y Cohen, 1988
pSN22	11.0	<i>Streptomyces nigrifaciens</i>	Kataoka y cols., 1994
pC30iL	2.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Skaugen, 1989
pTD1	2.6	<i>Treponema denticola</i>	MacDougall y cols., 1992
pKYM	2.1	<i>Shigella sonnei</i>	Yasukawa y cols., 1991
pLAB1000	3.3	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Josson y cols., 1990
pVA380-1	4.2	<i>Streptococcus ferus</i>	LeBlanc y cols., 1992
pRF1	4.2	<i>Plectonema</i> PCC6402	Perkins y Barnum, 1992
p8014-2	1.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Leer y cols., 1992
p353-2	2.4	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Leer y cols., 1992
pTB913	4.5	<i>Bacillus termofílico</i>	van der Lelie y cols., 1989
pST1	2.1	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Janzen y cols., 1992
pMA1	-	<i>Microcystis aeruginosa</i>	no publicado
pNostoc	-	<i>Nostoc</i> sp.	no publicado
<hr/>			
pMV158	5.5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Burdett, 1980
pE194	3.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	Horinouchi y Weisblum, 1982a
pCI411	2.9	<i>Leuconostoc lactis</i>	Coffey y cols., 1994
pWV01	2.2	<i>Lactococcus lactis</i>	Leenhouts y cols., 1991
pFX2	2.5	<i>Lactococcus lactis</i>	Xu y cols., 1989
pLB4	3.5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bates y Gilbert, 1989
pA1	2.8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Vujcic y Topisirovic, 1993
pLC2	2.5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Klein y cols., 1993
pADB201	1.7	<i>Mycoplasma pylori</i>	Bergemann y cols., 1989
pKMK1	1.9	<i>Mycoplasma pylori</i>	King y Dybvig, 1992
pHPK255	1.5	<i>Heliobacter pylori</i>	Kleanthous y cols., 1991
<hr/>			
pSN2	1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Khan y Novick., 1982
pE12	2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pE5	2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Projan y cols., 1987
pT48	2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pTCS1	1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Novick, 1989
pNE131	2.1	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Gruss y Ehrlich, 1989
pIM13	2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	Monod y cols., 1986

Los plásmidos en letras oscuras representan a cada familia.

(-) No se conoce el tamaño

## 4.1. Control de la replicación y estabilidad plasmídica

A diferencia de los fagos, los plásmidos poseen la capacidad de regular la frecuencia de iniciación de la replicación, mediante sistemas de control negativo capaces de corregir fluctuaciones en el número de copias (Nordström y cols., 1984; Novick, 1987). En la replicación RC, la proteína Rep es el único enzima del plásmido necesario para dar comienzo al proceso replicativo, por eso se trata del factor principal en la determinación de su número de copias. Dado que una excesiva carga plasmídica puede ser letal para la célula (y en algunos casos, también para el plásmido), la regulación de esta proteína es estricta para así poder coexistir en armonía con la bacteria que lo alberga durante muchas generaciones. Por otro lado, un grave descenso en el número de copias plasmídico podría conducir a su desaparición de la población bacteriana. La regulación tiene lugar a dos niveles principales según el replicón que se trate (Novick, 1989; del Solar y Espinosa, 1992). En pT181 la síntesis de RepC está regulada por dos RNAs antisentido (ctRNA) sintetizados a partir de un promotor constitutivo, en dirección opuesta al RNA mensajero (mRNA) de *repC* (Novick y cols., 1984b). Estos ctRNAs son complementarios a la región líder del mRNA de *repC* y se asocian a él produciendo la terminación prematura de su síntesis (atenuación) (Kumar y Novick, 1985). Se han propuesto mecanismos similares de control para los plásmidos pUB110 y pC194 (Alonso y Tailor, 1987; Maciag y cols., 1988). La expresión de Rep en pMV158 y pE194 está regulada a nivel pre y postranscripcional mediante la acción combinada de una proteína represora y un ctRNA (del Solar y Espinosa, 1992; Kwak y Weisblum, 1994; del Solar y cols., 1995). En estos plásmidos, Rep se cotranscribe junto con otra proteína de pequeño tamaño (Cop) que actúa regulando negativamente la transcripción del operón *cop-rep*. A nivel postranscripcional, el control lo ejerce un ctRNA que se une a la región del mRNA *cop-rep* que incluye el sitio de unión a los ribosomas del gen *rep*, impidiendo así la traducción del mismo.

Un sistema de regulación complementario, aunque sin representar un mecanismo de control auténtico, lo supone la inactivación de las proteínas Rep una vez completada la ronda de replicación que catalizan. Ésto sucede en pT181 y pUB110, mientras que, por ejemplo, en el fago  $\phi$ X174, donde lo importante es generar el máximo número de replicas posible

antes de lisar la célula huésped, se sabe que la proteína que inicia la replicación no se inactiva y es capaz de comenzar una nueva ronda de replicación sin siquiera liberarse del DNA (van Mansfeld y cols., 1986). Un nivel superior de control podría estar representado por pUB110 donde la proteína RepU se autorregula y es, además, inactivada después de una ronda de replicación (Müller y cols., 1995).

Existen además, factores del huésped que pueden regular la replicación plasmídica a diferentes niveles. Por ejemplo, se ha visto que estos plásmidos requieren un grado de superenrollamiento determinado para dar comienzo a la síntesis de la cadena líder, luego, todo factor que determine la topología plasmídica estará influyendo en el correcto nivel replicativo del plásmido. La replicación de pUB110 en *B. subtilis* parece estar determinada por la unión del plásmido a la membrana de la célula huésped. Se han descrito cuatro sitios de su genoma implicados en esta interacción (Tanaka y Sueoka, 1983; McKenzie y cols., 1986). Así pues, la disponibilidad de los sitios de unión en la membrana bacteriana podría estar condicionando el número de copias del plásmido en cada célula. La eficiencia de conversión de ss  $\rightarrow$  dsDNA, que es llevada a cabo por elementos de la maquinaria enzimática del huésped, también determina en muchos casos el número de copias plasmídico (medido como dsDNA) y/o su estabilidad segregacional en la población bacteriana (del Solar y cols., 1987a; Viret y Alonso, 1988; Boe y cols., 1989; Gruss y Ehrlich, 1989).

Dado que en los plásmidos con replicación RC no se han encontrado mecanismos activos de partición que garanticen su reparto equitativo durante la división celular, se asume que su distribución se realiza al azar. Luego, la probabilidad de que estos replicones se mantengan de forma estable en una población bacteriana tras sucesivas generaciones, aumenta con su número de copias. La estabilidad segregacional estaría entonces, exclusivamente ligada y determinada por la eficiencia replicativa del plásmido. Sin embargo, existen casos en donde esta proporcionalidad directa, entre estabilidad y número de copias, no está tan clara. Por ejemplo, se ha visto que algunos replicones con un número de copias elevado son muy inestables en las mismas condiciones en que otros, con un número de copias similar, se mantienen durante muchas generaciones en la misma población (del Solar y cols., 1993a). Asimismo, se ha propuesto para pUB110, que algunos sitios de unión a la membrana del huésped podrían estar implicados en el mantenimiento estable del plásmido (Tanaka y

Sueoka, 1983).

## 4.2. Rango de huésped

Muchos de los plásmidos con replicación RC son capaces de replicar en más de una especie bacteriana y en algunos casos pueden establecerse en ausencia de presión selectiva. Un ejemplo ilustrativo de ello lo constituye el plásmido pMV158 y su derivado pLS1, originales de *S. agalactiae*, los cuales consiguieron establecerse en un buen número de bacterias gram(+) e incluso son capaces de replicar en la bacteria gram(-) *E. coli* (del Solar y cols., 1987a). Para que un plásmido pueda colonizar un nuevo huésped, es necesario que exista una buena comunicación entre una serie de factores específicos de ambos organismos. El principal requisito es la expresión de los genes plasmídicos involucrados en su replicación y control, así como la conversión a dsDNA de al menos una fracción de los intermediarios monocatenarios de replicación. Cualquier situación que interfiera negativamente en alguno de estos procesos limitará el rango de huésped del plásmido. Así pues, los factores que intervienen en la síntesis adecuada de la proteína Rep, en la generación de la densidad de superenrollamiento suficiente para que el *dso* adopte su estructura funcional, y en el reconocimiento de la señal para la conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA, son esenciales en esta comunicación célula-plásmido. Una estrategia utilizada por estos replicones, que les beneficia a la hora de ingresar en un nuevo huésped, es la independencia de factores bacterianos para iniciar su replicación (del Solar y cols., 1996). Éstos utilizan su propia proteína de iniciación evitando de esta forma la dependencia de la primasa, DnaA, DnaB, DnaC y/u otros factores del huésped que intervienen en la formación del complejo de iniciación en los plásmidos con replicación tipo  $\Theta$  (los que en su gran mayoría sólo pueden replicar en su huésped original o en bacterias muy relacionadas). Por otro lado, las proteínas del huésped utilizadas para la elongación y terminación de la síntesis de ambas cadenas (DNA polimerasas, helicasa, SSB, etc) están muy conservadas entre las diferentes especies bacterianas.

Sólo un número limitado de plásmidos de bacterias gram(+) son capaces de replicar también en *E. coli*, aunque no de forma óptima. Nos referimos a pMV158/pLS1 y pWVO1/pFX2, donde la proteína Rep se expresa en su forma activa, pero la señal *ssO* o *ssW* de estos replicones es débilmente reconocida en dicho hospedador. Esta observación

indica que la eficiencia en la conversión ss → dsDNA es un factor importante, que podría estar limitando el establecimiento de los demás plásmidos de bacterias gram(+) en este nuevo huésped. Por ejemplo, el plásmido pC194 de *S. aureus* no puede por sí solo replicar en *E. coli*. Sin embargo, Goze y Ehrlich (1980) demostraron que un híbrido entre pC194 y pBR322 (que contuviera una señal *ssi*), es capaz de replicar en esta bacteria en condiciones en donde la iniciación a partir del *ori* de pBR322 está inhibida. Otro caso lo supone el plásmido pTX14-3 de *B. thuringiensis*, que no pudo ser establecido en *E. coli* a pesar de que su proteína Rep es expresada en esta bacteria a partir de su propio promotor (Andrup y cols., 1994).

Otra característica de los plásmidos con replicación RC que puede estar determinando su rango de huésped, es la presencia del gen *mob/pre*. El producto de este gen está involucrado en la movilización conjugativa y en la formación de cointegrados plasmídicos. La movilización conjugativa permite la transferencia horizontal de plásmidos entre cepas relacionadas e incluso entre diferentes especies (Koehler y Thorne, 1987). Se ha visto que esta proteína participa también en la formación de cointegrados mediante recombinación homóloga en los sitios  $RS_A$  y/o  $RS_B$  de algunos de estos replicones (Novick, 1989). La resolución de estas formas plasmídicas en sitios diferentes al de recombinación podría dar lugar a plásmidos híbridos con propiedades mejores para la adaptación a nuevos huéspedes (Gruss y Ehrlich, 1989). Este intercambio genético también podría verse favorecido por la presencia del ssDNA, ya que posee una alta capacidad recombinogénica (Michel y Ehrlich, 1986; Jannièrre y cols., 1993). La estructura modular de estos plásmidos podría facilitar, así como ser una consecuencia de estos procesos de intercambio.

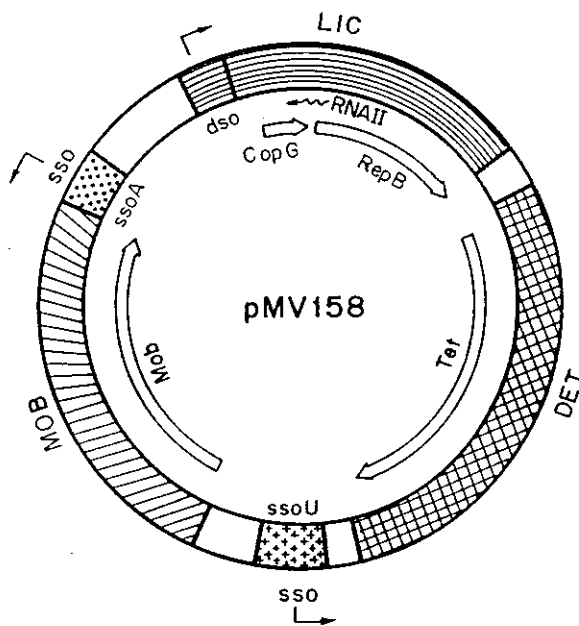
### 4.3. El plásmido pMV158

El plásmido que estudiaremos, pMV158 (5536 pb), fue aislado de una estirpe patógena de *Streptococcus agalactiae* (Burdett, 1980). Dado su capacidad para replicar en un amplio espectro de huéspedes bacterianos, fue posteriormente transferido a un buen número de bacterias gram(+) y gram(-). Esta característica le ha valido la denominación de "plásmido promiscuo" y el interés de su estudio como vector de clonaje en diferentes

bacterias. Aunque pMV158 no es autotransmisible, codifica para una proteína de movilización (MobM) que, en presencia de los factores sexuales que le aporte otro plásmido que sea conjugativo, le permite ser movilizado a otras bacterias (Priebe y Lacks, 1989). De esta forma pudo movilizarse conjugativamente a *S. faecalis* (Burdett, 1980) y a *S. pneumoniae* (Smith y cols., 1980). Mediante transformación, pudieron transferirse plásmidos con el replicón de pMV158 a *S. sanguis* (Burdett, 1980), *S. pneumoniae* (Saunders y Guild, 1980), *S. oralis*, *S. mutans*, *B. subtilis* (Espinosa y cols., 1982) y *E. coli* (Lacks y cols., 1986). Estos plásmidos también han podido establecerse en huéspedes tan diversos como *B. stearothermophilus*, *L. lactis*, *S. thermophilus*, *Brevibacterium*, *Listeria* y *Clostridium*. Durante el desarrollo de un sistema para el clonaje de genes de pneumococos se realizó la construcción de pLS1, mediante delección *in vitro* del fragmento EcoRI B (1128 pb) de pMV158 (Stassi y cols., 1981). Este derivado plasmídico no puede ser transferido mediante movilización conjugativa, ya que en el fragmento EcoRI B se encuentra parte del gen *mobM*, pero mantiene la capacidad de transformar el mismo rango bacteriano que su plásmido parental (Espinosa y cols., 1982; Lacks y cols., 1986; del Solar y cols., 1987a). Estos plásmidos se han secuenciado completamente (Lacks y cols., 1986; van der Lelie y cols., 1989; Priebe y Lacks, 1989) y representan a una familia de plásmidos que replican vía RC, con once miembros caracterizados hasta la fecha (Tabla 2). Algunas de las características que definen a esta familia son: i) *dso* localizado "corriente arriba" del gen *rep*; ii) presencia de secuencias directamente repetidas (iterones) en el *dso*; iii) existencia de dos elementos de control del número de copias: un ctRNA y una proteína represora de la transcripción (Cop) y iv) transcripción de los genes *cop* y *rep* a partir de un único promotor.

El plásmido pMV158 contiene cuatro módulos funcionales en donde los genes de mayor tamaño se transcriben en la misma dirección en que ocurre la replicación (Fig. 9) (Burdett, 1986; Priebe y Lacks, 1989; del Solar y cols., 1987b; 1990). El plásmido codifica además, dos transcritos pequeños (RNA I y RNA II), que se sintetizan en dirección opuesta a la de los otros elementos del genoma. El módulo DET está representado por un gen de expresión constitutiva del tipo *tetL*, que confiere resistencia a Tc y cuyo mecanismo de acción se basa en el bombeo del antibiótico fuera de la célula huésped (Burdett, 1986). El módulo de control e iniciación de la cadena líder (LIC) presenta el *dso* y los genes *repB*, *copG* y *rna II*, que codifican para la proteína iniciadora de la replicación (RepB), un represor

transcripcional (CopG) y un ctRNA (RNA II) involucrado en el control del número de copias plasmídico. La región MOB incluye el gen que capacita la movilización conjugativa del plásmido. Esta proteína es la encargada de realizar el corte específico en la hebra del DNA que se transfiere a la nueva célula huésped (Priebe y Lacks, 1989; Guzmán y Espinosa, 1997). Por último, el SSO está dividido en dos regiones dentro genoma y cada una de ellas contiene una señal diferente de conversión de la cadena retrasada: *ssmA* y *ssuU*, ubicadas "corriente arriba" de los genes *repB* y *mobM*, respectivamente.

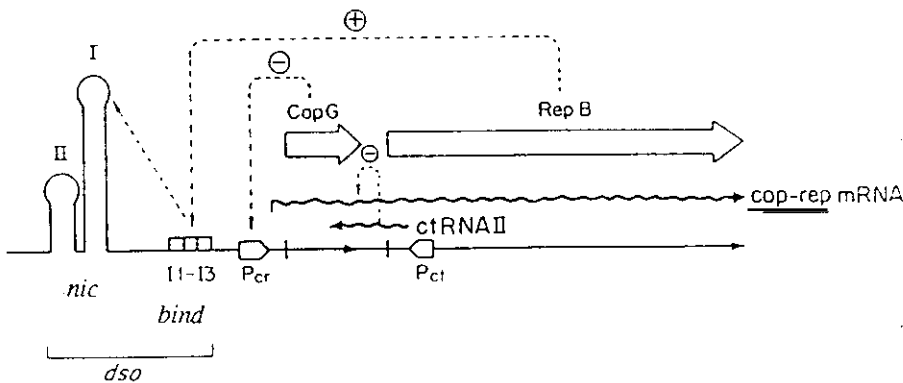


**Figura 9. Representación modular de pMV158.** División del plásmido pMV158 en módulos funcionales (ver texto). Las flechas quebradas indican la dirección de la replicación a partir de cada uno de los orígenes (*dso*, *ssmA*, *ssuU*). Las flechas anchas representan las proteínas codificadas por el plásmido. Como elementos de RNA, sólo se presenta el ctRNA involucrado en el control del número de copias: RNA II (flecha ondulada).

Las proteínas CopG (5.1 kDa) y RepB (24.2 kDa) se transcriben a partir del mismo promotor ( $P_{cr}$ ). El inicio de la replicación del plásmido está regulado por el producto del gen *repB* y los niveles de RepB están controlados pre y postranscripcionalmente por CopG y RNA II. El proceso de regulación del número de copias del plásmido se esquematiza en la Figura 10. CopG se une a su región operadora en una zona del mRNA *cop-rep*, que solapa con la secuencia -35 de  $P_{cr}$ , impidiendo así la transcripción del operón completo (del Solar y cols., 1990). El RNA II (50 nt) se acopla al sitio de unión de los ribosomas del gen *repB*

en el mRNA<sub>cop-rep</sub> e inhibe la traducción de la proteína RepB (del Solar y Espinosa, 1992; del Solar y cols., 1995). Los dos elementos de control no actúan por separado, sino que forman parte de un mismo circuito inhibitorio, sin existir una jerarquía funcional entre ambos componentes del sistema (del Solar y cols., 1995).

El inicio de la replicación tiene lugar en una secuencia de DNA monocatenario del *dso* ubicada en el lazo de la horquilla I de la región *nic*, que se genera como consecuencia del superenrollamiento del plásmido. Esta secuencia (5'-TACTACGA-3') se encuentra presente en casi todos los miembros de la familia de pLS1. La proteína RepB actúa a distancia, ya que su sitio de unión al DNA (tres iterones de 11 pb c/u, que componen la región *bind*) se encuentra a 84 pb del sitio de corte (Puyet y cols., 1988; de la Campa y cols., 1990). La existencia de una curvatura intrínseca del DNA en la región del *dso* plantea la posibilidad de una estructura terciaria funcional en el origen que acerque la zona de unión y de corte de la proteína (Pérez-Martín y cols., 1989; de la Campa y cols., 1990).



**Figura 10. El replicón de pMV158 y control de la replicación.** Se presenta un esquema de la región de inicio de la replicación (*dso*) y control de la síntesis de RepB. Las proteínas (CopG y RepB) se indican con flechas anchas; los RNAs (*cop-rep* mRNA y *ctRNA II*) con flechas onduladas; los promotores (*Pcr* y *Pct*) con cajas en punta de flecha y los tres iterones de la región *bind* del *dso* (I1-I2-I3), con cajas blancas. La región *nic* está representada por las horquillas I y II. Mediante líneas discontinuas se muestran las interacciones proteína-DNA y RNA-RNA que tienen lugar para el control de la síntesis de RepB.

## **OBJETIVOS**

---

El objetivo principal de esta Tesis ha sido estudiar las secuencias del DNA plasmídico y los enzimas del huésped que intervienen en el proceso de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA del plásmido de amplio espectro de huésped, pMV158. En primer lugar, nos interesaba definir de forma experimental las regiones del mismo que actuaban como origen de replicación de la cadena retrasada y analizar su función en distintos huéspedes bacterianos. Asimismo, nos interesaba conocer el efecto de estos orígenes en la determinación del número de copias y estabilidad segregacional del plásmido. Dado que es necesario que exista una buena comunicación célula-plásmido para que éste pueda establecerse en un número determinado de hospedadores, era de interés estudiar aspectos comunes del mecanismo mediante el cual tenía lugar el inicio de la replicación de la hebra complementaria de pMV158 en varias bacterias. La determinación de los enzimas implicados en un proceso común de replicación, podría dar información acerca de las relaciones entre los distintos organismos, así como explicar, al menos en parte, el carácter "promiscuo" de este replicón. Uno de los objetivos propuestos, relacionado a los anteriores, ha sido el estudio mediante mutagénesis dirigida de las regiones conservadas del *ssrA* de pMV158, con el fin de establecer su función en la comunicación con elementos de la maquinaria enzimática del huésped. Por último, nos interesaba proponer un modelo que incluyera las secuencias del DNA plasmídico importantes para que ocurran tales interacciones y que explicara la dinámica de iniciación de la cadena retrasada a partir del *ssrA* de pMV158.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## MATERIALES

### 1. ESTIRPES BACTERIANAS

Las características genotípicas, así como la procedencia de todas las estirpes utilizadas se recogen en la Tabla 3. Las estirpes que se usaron como huésped de los plásmidos con el replicón de pMV158 o de pE194 en cada caso, fueron *S. pneumoniae* 708, *B. subtilis* MB11 y *S. aureus* RN4220. Para la construcción de fagémidos recombinantes basados en pALTER-1 y para la obtención de ssDNA procedente de los mismos, se usó la estirpe *E. coli* JM109. A no ser que se indique otra cosa, los extractos libres de células se prepararon a partir de las estirpes *S. pneumoniae* 708 y *S. aureus* RN4220.

Tabla 3. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>S. pneumoniae</i> 708	<i>end1 exo2 trt1 hex4 malM594</i>	Lacks y Greenberg, 1977
<i>S. pneumoniae</i> MP547	<i>end1 exo2 trt1 hex4 malM594 polA</i> Ω (1052pb_cat)	Díaz y cols., 1992b
<i>S. pneumoniae</i> MP560	<i>end1 noz19 exo3 polA</i> Δ (184-805pb) Ω (81pb_cat) Ω (184pb_pET-3b'[591-511pb]) <i>malM</i> (418pb_ø[ <i>polA'</i> _1054pb_- <i>ermB</i> ])	Díaz y cols., 1992b
<i>B. subtilis</i> MB11	<i>lys3 metB10 hisH2</i>	Colección del laboratorio
<i>E. coli</i> BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE</i> Δ ( <i>lac-proAB</i> ) ( <i>mutS</i> _Tn10) (F' <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>laqFZ</i> Δ M15)	Kramer y cols., 1984
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 RecA1 gyrA96 thi hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>relA1 supE44 λ</i> Δ ( <i>lac-proAB</i> ) (F' <i>traD36</i> <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>laqFZ</i> Δ M15)	Yanisch-Perron y cols., 1985
<i>S. aureus</i> RN4220	parcialmente <i>arg</i> <sup>+</sup> , restricción	Khan, S.

## 2. PLÁSMIDOS Y FAGÉMIDOS

A excepción de los plásmidos pSK270 y pE194cop6, los cuales proceden de pE194, los demás plásmidos utilizados son derivados de pMV158 y por lo tanto llevan su replicón básico. Los fagémidos recombinantes construidos derivan del vector de clonaje pALTER-1 y están identificados en cada caso como pA-. Las características más relevantes a este trabajo de todos estos replicones se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos y fagémidos empleados en este trabajo

Plásmido o Fagémido	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pMV158	5536	Tc <sup>r</sup>	Plásmido natural de <i>S. agalactiae</i> ; <i>ssoA</i> + <i>ssoU</i>	Burdett, 1980
pLS1	4408	Tc <sup>r</sup>	$\Delta$ EcoRI B de pMV158; $\Delta$ <i>ssoU</i> ; <i>ssoA</i>	Stassi y cols., 1981
pLS5	4076	Tc <sup>r</sup>	Deleción <i>in vivo</i> de pLS1, $\Delta$ (34-365pb)	Lacks y cols., 1986
pLS4	3138	Tc <sup>r</sup>	$\Delta$ HindIII-NcoI pequeño de pLS5; $\Delta$ <i>ssoA</i>	del Solar y cols., 1987a
pLS1 $\Delta$ HA	3665	Tc <sup>r</sup>	$\Delta$ HindIII-AflIII de pLS1	Este trabajo
pLS1 $\Delta$ NA	4209	Tc <sup>r</sup>	$\Delta$ AflIII-NcoI pequeño de pLS1; $\Delta$ <i>ssoA</i>	Este trabajo
pLS1 $\Delta$ 24	4007	Tc <sup>r</sup>	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <i>BanI</i>	Acebo, P.
pLS1 $\Delta$ 13	4267	Tc <sup>r</sup>	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <i>AflIII</i> ; $\Delta$ RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pLS1 $\Delta$ 14	4202	Tc <sup>r</sup>	Deleción por BAL31 de pLS1 linearizado en <i>AflIII</i> ; $\Delta$ RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pLS1CM	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssoA</i> ; cambio leve en la región CS-6	Este trabajo
pLS1G1	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssoA</i> ; CS-6 totalmente desapareado	Este trabajo
pLS1G3	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssoA</i> ; sustitución de la secuencia CS-6	Este trabajo

pLS1G4	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssmA</i> ; cambio completo de la región CS-6	Este trabajo
pLS1G5	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssmA</i> ; RS <sub>B</sub> totalmente desapareado	Este trabajo
pLS1G6	4411	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssmA</i> ; RS <sub>B</sub> completamente apareado	Este trabajo
pLS1G7	4408	Tc <sup>r</sup>	Mutación en el <i>ssmA</i> ; sustitución de la secuencia RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pLS1G3G7	4408	Tc <sup>r</sup>	Doble mutación en el <i>ssmA</i> ; cambio en las secuencias CS-6 y RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pLS4EC	4266	Tc <sup>r</sup>	Fragmento <i>EcoRI</i> B de pMV158 (conteniendo el <i>ssuU</i> ) clonado en pLS4; orientación C	Este trabajo
pLS4EI	4266	Tc <sup>r</sup>	Fragmento <i>EcoRI</i> B de pMV158 (conteniendo el <i>ssuU</i> ) clonado en pLS4; orientación I	Este trabajo
pSK270	3769	Em <sup>r</sup>	Sitio de multiclonado de pUC19 clonado en <i>ClaI</i> de pE194	Khan, S.
pE194cop6	3728	Em <sup>r</sup>	Mutante de alto número copias de pE194	Horinouchi y Weisblum, 1982a
pALTER-1	5680	Tc <sup>r</sup>	Fagémido con el <i>ori</i> de f1	Promega
pA-pLS1 <i>ssmA</i>	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1 clonado en pALTER-1; <i>ssmA</i> silvestre	Este trabajo
pA-pLS1 <i>ssmA</i>	6880	Tc <sup>r</sup>	<i>EcoRI-PstI</i> pequeño de pLS1 clonado en pALTER-1; <i>ssmA</i> en orientación I	Este trabajo
pA-CM	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1CM clonado en pALTER-1; mutación en CS-6	Este trabajo
pA-G1	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G1 clonado en pALTER-1; mutación en CS-6	Este trabajo
pA-G3	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G3 clonado en pALTER-1; mutación en CS-6	Este trabajo

pA-G4	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G4 clonado en pALTER-1; mutación en CS-6	Este trabajo
pA-G5	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G5 clonado en pALTER-1; mutación en RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-G6	6809	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G6 clonado en pALTER-1; mutación en RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-G7	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G7 clonado en pALTER-1; mutación en RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-G3G7	6806	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1G3G7 clonado en pALTER-1; mutación en CS-6 y RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-Δ13	6665	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1Δ13 clonado en pALTER-1; Δ RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-Δ14	6600	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1Δ14 clonado en pALTER-1; Δ RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-ΔNA	6607	Tc <sup>r</sup>	<i>HindIII-PstI</i> pequeño de pLS1ΔNA clonado en pALTER-1; Δ RS <sub>B</sub>	Este trabajo
pA-pMV158ssoU	6808	Tc <sup>r</sup>	Fragmento <i>EcoRI</i> B de pMV158 (conteniendo el <i>ssoU</i> ) clonado en <i>EcoRI</i> de pALTER-1	Este trabajo

**Orientación C:** El *sso* está clonado en la misma orientación respecto al *dso* que la que tenía en el plásmido de donde proviene. El *sso* se encuentra en el ssDNA generado.

**Orientación I:** El *sso* está clonado en la orientación contraria respecto al *dso* que la que tenía en el plásmido de donde proviene. La secuencia complementaria al *sso* se encuentra en el ssDNA generado.

### 3. BACTERIÓFAGOS

Para aislar ssDNA a partir de pALTER-1 y de los recombinantes derivados de éste, se usó como "helper" al bacteriófago R408 (Promega), con el que se infectaron cultivos de *E. coli* JM109 que contenían los fagémidos de interés. Para los ensayos de replicación *in vitro* se emplearon los fagos M13mp19 (Sambrook y cols., 1989) y M13-pE194ssoA (7792 pb), un derivado de éste que contiene el fragmento *Taq-HpaII* de pE194 conteniendo el *ssoA* (Dempsey y cols., 1995).

### 4. MEDIOS DE CULTIVO

#### 4.1. Medio de cultivo de *S. pneumoniae*

Las estirpes de *S. pneumoniae* utilizadas fueron crecidas en medio líquido AGCH (Lacks, 1966) suplementado con sacarosa 0.3% y extracto de levadura 0.2%. Para el crecimiento en medio sólido se añadió además, Bacto-Agar al 1% para la capa basal y al 0.75% para la sobrecapa. Cuando fue necesario, se agregó Tc 1 µg/ml. Para el crecimiento del mutante MP560 se añadió 1.5 µg/ml de Cm. La composición del medio AGCH se detalla a continuación.

**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
Ácido nicotínico	0.3 mg
Piridoxina-HCl	0.3 mg
Tiamina-HCl	0.3 mg
Riboflavina	0.14 mg
Biotina	0.6 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.5 g
NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1.25 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.4 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.6 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.5 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 mg
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.2 mg
Albúmina bovina (fracción V)	3000 u
Agua destilada y desionizada c.s.p.	1 l
pH 7.5	

**4.2. Medio de cultivo de *B. subtilis***

Para el crecimiento en medio líquido de *B. subtilis* se utilizó el medio TY (Maniatis y cols., 1982): 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl. Éste se suplementó con Bacto-Agar al 1.5% para su utilización como medio de cultivo sólido. Se añadió en ambos casos Tc 10 µg/ml.

**4.3. Medios de cultivo de *E. coli***

Las estirpes de *E. coli* fueron crecidas normalmente en medio TY líquido o sólido (Maniatis y cols., 1982): 1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl. La concentración de los antibióticos usados fue: 15 µg/ml de Tc y 125 µg/ml de Ap. Durante la infección de los cultivos con el bacteriófago R408, para la obtención de ssDNA, aquellos

se crecieron en el medio TYP (Promega): 1.6% bacto-triptona, 1.6% extracto de levadura, 0.5% NaCl, 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 n° 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. Para seleccionar las células con el factor F, los cultivos de *E. coli* JM109 se crecieron en 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  $MgSO_4$  y 0.2% glucosa. En este caso, se suplementó con tiamina 1 mM.

#### 4.4. Medios de cultivo de *S. aureus*

Los cultivos de *S. aureus* se crecieron normalmente en medio líquido Brain-Heart (Difco). Para la puesta en competencia y recuperación de las células tras la electroporación, se usó el medio CY (1% hidrolizado ácido de caseína, 1% extracto de levadura y 0.5% glucosa) complementado con 60 mM glicerofosfato (GP). Para el crecimiento en placa se empleó el medio sólido GL (0.3% hidrolizado enzimático de caseína, 0.3% extracto de levadura, 0.6% NaCl, 0.33% lactato sódico, 0.1% glicerol, ajustados a pH 7.8 y 0.75% Bacto-Agar). Cuando fue necesario se suplementó con Tc 10  $\mu g/ml$  o Em 5  $\mu g/ml$ .

### 5. PRODUCTOS COMERCIALES

Los enzimas de restricción, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la ligasa del fago T4, la fosfatasa alcalina de intestino de ternera, la polinucleótidoquinasa del fago T4 (T4 PNK), la RNasina (enzima inhibidor de RNasas) y la nucleasa BAL31 fueron suministrados por las firmas comerciales: New England Biolabs, Boehringer-Mannheim y Amersham. Pharmacia LKB y Promega suministraron la DNA polimerasa del fago T7 y la DNA polimerasa del fago T4, respectivamente. La *Taq* DNA polimerasa fue comprada a Boehringer Mannheim. Otras proteínas utilizadas, suministradas por Sigma, fueron: proteinasa K, RNasa A, lisozima, lisostafina y seroalbúmina bovina (BSA). La proteína SSB (3.2 mg/ml) fue de United States Biochemical Corporation.

Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Probus, Merck y Difco. De Sigma se adquirieron: Cm, Tc, Em, DTT, tRNA de *E. coli*, DNA de timo de ternera y X-Gal. Boehringer-Mannheim suministró: Ap, IPTG, poli(dIdC), el kit de PCR y los rNTPs y dNTPs no radiactivos. Pharmacia, el Sephadex G-50 y el kit de secuenciación de la DNA polimerasa del fago T7. La agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED y SDS fueron suministrados por Bio-Rad. Para la mutagénesis se utilizó el kit de mutagénesis dirigida de Promega, para aislar fragmentos de DNA de geles de agarosa se usaron los kits "GeneClean" y "MERmaid" de BIO 101 Inc. y para la determinación de la concentración de proteínas, el método BCA de Pierce. El  $\beta$ ME fue de la casa Eastman-Kodak, el PSA de BRL, la heparina de Laboratorios LEO S.A, el Na-DOC de Difco, el EDTA, cloroformo, fenol, etanol, formamida, Tris, DMSO y TCA de Merck. Los filtros de nitrocelulosa BA85 para la transferencia de DNA fueron suministrados por Schleicher & Schuell y los filtros de diálisis por Millipore. Los nucleótidos radiactivos se compraron a Amersham Internacional. El material fotográfico utilizado fue, películas T-55 de Polaroid y películas X-Omat S para autorradiografías de Kodak. Las pantallas amplificadoras empleadas fueron Cronex Lightningplus de la casa Dupont.

## MÉTODOS

### 1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

La temperatura de incubación fue de 37 °C para todas las estirpes utilizadas. Para *S. pneumoniae* se emplearon condiciones microaerófilas de crecimiento, tanto en medio líquido como en placas. En el primer caso se utilizaron baños termostatzados sin agitación y en el segundo, se cubrió la capa basal del medio de cultivo conteniendo las células de pneumococos con una ligera capa de medio más laxa. El crecimiento de las estirpes de *B. subtilis* y *E. coli* en medio líquido, se realizó en baños con agitación vigorosa. En estos tres casos, el crecimiento se siguió por turbidimetría, midiendo la absorbancia de los cultivos a longitudes de onda de 650, 550, 600 nm, respectivamente. Para ello, se empleó un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20. El crecimiento de *S. aureus* también se realizó con agitación vigorosa, pero se monitorizó por nefelometría con un filtro de color verde o por turbidimetría a 600 nm. El cultivo de estos últimos organismos en medio sólido se hizo en superficie sobre placas de petri con TY-agar o GL-agar. Todas las

estipes fueron conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes de ser congelados, se agregó un 10% de glicerol a los cultivos de *S. pneumoniae*, *E. coli* y *S. aureus* y se mantuvieron 10 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A las células de *B. subtilis* se les añadió DMSO al 5% y se congelaron rápidamente en una mezcla de nieve carbónica y etanol.

## 2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la preparación de células competentes de *S. pneumoniae* se empleó el método descrito por Lacks (1966). Para la transformación, el cultivo competente debe diluirse 20 veces en AGCH suplementado con 0.2% de sacarosa y 0.001% de  $\text{CaCl}_2$  e incubarse 20 min a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añade el DNA (0.25  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico es suficiente para conseguir la saturación de 1 ml de estas células) y se incuba 40 min más. Para que el marcador de selección se exprese, se mantiene el cultivo durante 90 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de proceder a la siembra en placa para seleccionar los transformantes. Para la puesta en competencia y transformación de células de *B. subtilis* MB11 se siguió el método descrito por Young y Wilson (1972). Las células competentes se descongelaron rápidamente (a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se diluyeron 100 veces en el medio correspondiente antes de agregar el DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ). Seguidamente, se incubaron durante 90 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con fuerte aereación, para permitir la expresión fenotípica de los marcadores de selección. Para preparar células competentes de *E. coli* se siguieron los métodos de Hanahan (Hanahan, 1983) y Kushner (Kushner, 1978). Sólo en el primer caso las células competentes se pudieron almacenar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En varias oportunidades, las células de *E. coli* fueron transformadas por electroporación siguiendo el método descrito por Dower (Dower y cols., 1988) y utilizando el "Gene Pulser" acoplado al "Pulse controller" de Bio-Rad. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 25  $\mu\text{F}$ , 2.5 kV y 200  $\Omega$ . Las células de *S. aureus* se electro-transformaron de la misma forma, utilizando cantidades de DNA entre 10 y 500 ng/ensayo. Las células competentes de estafilococos se prepararon de la siguiente manera. Se inocularon 200 ml de medio GY-GP con 2 ml de un cultivo crecido toda la noche. Cuando el nuevo cultivo alcanzó una  $A_{600} = 0.6$ , se centrifugó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min a 4000 xg. Las células se resuspendieron en tampón A (7 mM Hepes pH 7.4, 272 mM sacarosa). Tras otra centrifugación, las células se resuspendieron en 2.4 ml del mismo tampón y se dividieron en alícuotas de 0.16 ml, las cuales se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizadas. Una vez electroporadas, las células se diluyeron en 1 ml de medio GY-GP y se extendieron en placas 50 - 200  $\mu\text{l}$  en GL-agar

conteniendo el antibiótico para la selección de transformantes.

### 3. PREPARACIONES DE DNA

#### 3.1. Extractos crudos celulares

Se realizaron extractos crudos de las diferentes estirpes bacterianas para analizar su contenido plasmídico. Dado que en estas preparaciones no hay etapas de purificación del DNA del plásmido, aparece además el contenido cromosómico de las bacterias. Para *S. pneumoniae*, se empleó el método de Stassi y cols. (1981). Se centrifugaron 1.5 ml de un cultivo crecido a  $DO_{650} = 0.4$  y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de lisis (25% sacarosa, 0.15 M citrato trisódico, 0.01% SDS, 0.1% Na-DOC, 25  $\mu$ g/ml RNasa A). Se incubó 10 min a 30 °C y se añadió SDS hasta una concentración final de 1%. Los lisados celulares se agitaron vigorosamente durante 3 min y se sometieron a cuatro ciclos de congelación a -70 °C (nieve carbónica/etanol) y descongelación a 37 °C, con el fin de disminuir su viscosidad por rotura del DNA cromosómico. Se añadió proteinasa K a una concentración final de 200  $\mu$ g/ml y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, se agregaron 50  $\mu$ l del colorante de carga CEC 3x (0.02% azul de bromofenol, 50% glicerol, 2.5 mM EDTA) para visualizar las muestras durante la corrida electroforética y facilitar la carga del gel. Para *B. subtilis* las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de lisis (5 mg/ml lisozima, 25% sacarosa, 0.1M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l RNasa A) y se continuó igual que en el caso anterior. Para *S. aureus*, la solución de lisis empleada contiene: 20 mM Tris-HCl pH 7.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20% sacarosa y 50  $\mu$ g/ml (100 u/ml) de lisostafina. En este caso, los cultivos se recogieron a una  $DO_{600} = 0.6$ .

#### 3.2. Preparaciones de plásmidos

La preparación de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Birnboim y Doly (1979), basado en la desnaturalización alcalina y posterior precipitación del DNA cromosómico. En el caso de *S. pneumoniae* se siguió el mismo método incluyendo las modificaciones descritas en Stassi y cols. (1981). En varias ocasiones, se empleó para *E. coli* el método de lisis alcalina descrito por le Gouill y cols. (1994), dado que se trata de un sistema más sencillo y rápido. Para la preparación a

gran escala de DNA plasmídico de ambos huéspedes, se utilizó el método descrito por Currier y Nester (1976), basado en la separación mediante dos gradientes sucesivos de CsCl del DNA de interés. Para calcular la concentración del DNA se midió la absorbancia de las muestras a 258 nm, teniendo en cuenta que un valor de absorbancia igual a 1 corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de dsDNA.

#### 4. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA

El tratamiento del DNA con enzimas de restricción se realizó en las condiciones aconsejadas por la casa comercial suministradora. Las condiciones de digestión con la nucleasa BAL31 (cantidad de enzima y tiempo de digestión) se calcularon en función del número de pares de bases de cada extremo del DNA que interesaba digerir. Para 4  $\mu\text{g}$  de DNA se empleó una unidad enzimática en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  conteniendo el tampón especificado por la casa proveedora. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (entre 1 y 15 min) a las que se les agregó EGTA a una concentración de 40 mM para parar la reacción. El DNA digerido se fenolizó y precipitó y se recircularizó mediante la acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (PolIK) y de la DNA ligasa del fago T4. Ambos procedimientos se siguieron teniendo en cuenta las indicaciones de la casa suministradora del enzima y las descritas por Sambrook y cols. (1989).

#### 5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales a una concentración variable entre 0.7 y 1.2%, dependiendo del parámetro a analizar (separación de las distintas formas plasmídicas o separación de fragmentos de DNA). Sólo se empleó una concentración mayor (2.5%) para separar fragmentos de pequeño tamaño (ver más adelante). La agarosa se disolvió, por calentamiento, en tampón de electroforesis TAE (40 mM Tris base pH 8.0, 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 agregó tampón de carga BXGE (0.025% BFB, 0.025% xilencianol, 6% glicerol, 1 mM EDTA) o CEC 1x. La electroforesis se realizó a voltaje constante. Las dimensiones de los geles, así como la duración de la electroforesis y las condiciones de voltaje variaron según las características del DNA a analizar. Los geles se tiñeron en el mismo tampón utilizado para la electroforesis

conteniendo bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 min y el DNA se observó mediante luz ultravioleta (uv) en un transiluminador de onda larga (360 nm) o de onda corta (254 nm). En algunos casos, el EtBr se incluyó en el tampón y en el gel de agarosa, obteniéndose así la tinción del DNA durante la electroforesis.

En los experimentos de retardo en gel, la electroforesis de los fragmentos pequeños de DNA monocatenario se realizó en geles verticales de poliacrilamida (PAA; 40% acrilamida : 1% bisacrilamida) al 3.5% en tampón TAE, polimerizado con 0.05% TEMED y 0.1 persulfato amónico (PSA). Se utilizaron cubetas "Mini-protean" de Bio-Rad y las dimensiones de los geles fueron: 8.4 cm de ancho, 7.2 cm de largo y 0.75 mm de espesor. Para secuenciación, así como para determinar el extremo 5' de la cadena complementaria plasmídica y para identificar los productos de las reacciones de transcripción *in vitro*, se usaron geles de PAA (38% acrilamida : 2% bisacrilamida) con 8 M urea. En los primeros dos experimentos el gel se hizo al 6 u 8%. En el último caso, se hizo al 15%. El tampón utilizado fue TBE. 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, 1mM EDTA) y se desnaturalizaron por calor durante 3 min a 90 °C, enfriándolas rápidamente a 4 °C antes de ser cargadas en el gel. En estos casos se llevó a cabo una pre-electroforesis a 1700 V durante 1 h. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 1800 o 2000 V.

## 6. ELUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Para la construcción de plásmidos recombinantes, se extrajeron los fragmentos de DNA correspondientes de geles de agarosa utilizando el método "GeneClean", siguiendo las instrucciones de sus fabricantes. Para purificar los fragmentos ssDNA procedentes de las reacciones de PCR se empleó el sistema "MERmaid". Para ello, se sometieron los productos de dichas reacciones a electroforesis en geles preparativos de agarosa (suministrada con el kit) al 2.5% y se procedió según las instrucciones de la casa comercial. La concentración de estos fragmentos se calculó midiendo la absorbancia de las muestras 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

La mayoría de las construcciones y todas las mutaciones realizadas en el *ssOA* del plásmido pMV158 se analizaron secuenciando la zona afectada del DNA. Para ello se siguió el método de Sanger (Sanger y cols., 1977), utilizando el kit comercial de Pharmacia LKB con la DNA polimerasa del fago T7 y [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP. Se usaron aproximadamente 2  $\mu$ g de DNA molde en cada caso y una relación cebador:molde de 10:1. El oligonucleótido empleado fue 5'-GGTATCATCCACTCAAG-3'. El mismo oligo se utilizó para secuenciar los productos ssDNA procedentes de las reacciones de PCR. Estos últimos se analizaron mediante secuenciación automática.

## 8. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICO

El número de copias de los plásmidos utilizados en este trabajo se determinó siguiendo el método descrito por Projan y cols. (1983), con las modificaciones realizadas por del Solar y Espinosa (1992). Se prepararon extractos celulares a partir de los cultivos cuyo contenido plasmídico se quería analizar. El DNA presente en cada muestra se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7 o 0.8% en tampón TAE a 2.5 V/cm durante 14 h. Los geles teñidos con 0.5  $\mu$ g/ml de EtBr se iluminaron con luz uv de onda corta (254 nm) y se tomaron varias fotografías con distintos tiempos de exposición, utilizando películas T-55 de Polaroid. La cuantificación densitométrica de las bandas de DNA se realizó sobre los negativos de las fotos 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). El número de copias de cada plásmido se calculó en relación al de pLS1, cuyo valor en cada huésped se había determinado por marcaje de DNA total *in vivo* (del Solar, 1991). Dado que el grupo planar del EtBr se intercala en mayor grado en las formas lineares y circulares abiertas (oc) del plásmido, que en formas circulares covalentemente cerradas (ccc), fue necesario aplicar un factor de corrección en el cálculo del número de moléculas de plásmido por equivalente cromosómico (N). Este factor de corrección fue estimado por Projan y cols. (1983) en 1.36. De esta manera, el valor de N se calculó a partir de la siguiente ecuación:

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

donde:  $Dp_1$  y  $Dp_2$  son los valores determinados por densitometría para las bandas correspondientes a las formas oc y ccc del plásmido;  $Mc$  es el tamaño del DNA cromosómico, estimado en  $3 \times 10^6$  pb para las especies bacterianas en estudio (Lacks y cols., 1986);  $Dc$  es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente al DNA cromosómico y  $Mp$  es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

## 9. TEST DE ESTABILIDAD PLASMÍDICA

Para el estudio de la estabilidad segregacional de los plásmidos pMV158 y derivados de éste, en distintos huéspedes, se procedió según el método descrito por del Solar y cols. (1987a). Se prepararon cultivos de las estirpes que contenían los plásmidos en estudio, en medio líquido selectivo, y se crecieron hasta una DO de 0.4. Éstos fueron considerados la generación de partida ( $g = 0$ ). A continuación, los cultivos fueron diluidos sucesivamente en una proporción 1:1023 en medio líquido sin antibiótico, y se crecieron hasta alcanzar nuevamente una DO de 0.4. El número de generaciones transcurridas entre una dilución y la anterior es de 10. Se tomaron muestras de cada uno de estos cultivos y se plaquearon en medio sólido con y sin presión de selección. Mediante recuento de colonias se determinó el porcentaje de células con plásmido cada 10 generaciones de crecimiento de la bacteria huésped. La tasa experimental de pérdida del plásmido por célula y generación ( $Lex$ ) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

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

siendo  $P_0$ , la frecuencia inicial de células con plásmido y  $P$ , la frecuencia de células con plásmido tras crecer el cultivo durante  $n$  generaciones sin presión de selección.

## 10. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la sustitución de nucleótidos en la secuencia del *ssmA* de pMV158 se empleó el sistema de mutagénesis dirigida *in vitro* de Promega. Con el kit se suministró el fagémido pALTER-1 que contiene el *ori* del fago f1, un sitio de multiclonado y dos genes de resistencia a antibióticos, *tet* (para Tc) y *bla* (para Ap). El segundo de estos genes ha sido inactivado mediante la modificación puntual de su secuencia. Este sistema se basa en primer lugar, en conseguir aislar ssDNA procedente de un fagémido recombinante derivado de

pALTER-1 que contenga insertado el fragmento de DNA que se desea modificar. En nuestro caso, se clonó el fragmento *EcoRI* - *PstI* conteniendo la región *ssoA* de pMV158, en el sitio de multiclonado del vector incluido en el gen *lacZ*. El producto de este gen es capaz de degradar el compuesto X-Gal confiriéndole como consecuencia de la reacción una coloración azul característica a la bacteria huésped, en un medio que contenga IPTG. Los fagémidos recombinantes que llevasen el inserto de pLS1 verían alterada la expresión del gen *lacZ* y por lo tanto el clon bacteriano aparecerá de color blanco en la misma preparación. Como además pALTER-1 posee un determinante de resistencia a Tc, la selección de los recombinantes se realizó en placas que también contenían este antibiótico. Los oligos con cada una de las mutaciones (Tabla 6) se anillaron por separado al ssDNA molde junto con un oligo que restaura la  $Ap^r$  en la hebra mutante durante la reacción de mutagénesis. Esta hebra se sintetizó usando la DNA polimerasa y la DNA ligasa del fago T4. A continuación, se realizaron dos rondas sucesivas de transformación: primero, se utilizó una estirpe de *E. coli* deficiente en el sistema de reparación de apareamientos erróneos de bases (BMH71-18*mutS*), la cual suprime *in vivo* la reparación del error mutagénico introducido en el gen *bla* y en el fragmento de DNA plasmídico. Después se realizó una segunda ronda de transformación en la estirpe JM109, para asegurar la segregación de los recombinantes que posean la mutación deseada. La selección de los mismos se realizó en medios de cultivo con  $Ap$  125  $\mu\text{g/ml}$ . Sólo pueden crecer las colonias que contienen el fagémido recombinante con el gen *bla* reparado y por lo tanto, en los casos donde haya tenido lugar la hibridación del oligo reparador con el ssDNA. Dado que se usa una cantidad en moléculas cinco veces mayor del oligo mutagénico que del oligo reparador para la reacción de anillamiento, la probabilidad de que se haya anillado el primero cuando también lo ha hecho el segundo, es muy alta. Por lo tanto, la probabilidad de que los fagémidos  $Ap^r$  contengan la mutación deseada será también muy alta. En todos los casos, la presencia de dichas mutaciones se han verificado mediante secuenciación del DNA.

El procedimiento para aislar ssDNA del recombinante se explicará más adelante. Para las reacciones de anillamiento se emplearon 0.2 pmoles de ssDNA, 1 pmol del oligo reparador del gen *bla* y 5 pmoles del oligo mutagénico. Ambos oligos fueron fosforilados previamente para aumentar la eficiencia de ligación durante la síntesis *in vitro* de la cadena complementaria. El DNA de cada recombinante se extrajo de los clones seleccionados

siguiendo el método de Birnboim y Doly (1979).

## 11. MARCAJE RADIOACTIVO DEL DNA

### 11.1. Preparación de sondas radiactivas

Para la preparación de sondas de pLS1 y pE194 marcadas radiactivamente, se procedió según el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983), basado en el marcaje al azar del DNA mediante la extensión de cebadores hexanucleotídicos. Para ello, se desnaturalizó 1  $\mu$ g de DNA plasmídico por calentamiento (10 min, 95 °C) y se enfrió rápidamente. La reacción se llevó a cabo en 20  $\mu$ l, en presencia de 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTE (ditioeritritol), 0.2 mg/ml BSA, 20  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (actividad específica de 5000 Ci/mmol), mezcla de los restantes dNTPs fríos a 75  $\mu$ M, 2.2  $\mu$ g de hexanucleótidos cebadores 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  $\mu$ g de DNA de timo de ternera. El isótopo radiactivo no incorporado al DNA se eliminó pasando la muestra por una columna de 1 ml de Sephadex G-50 equilibrada en TE (10:1). Antes de usarlas, las sondas se hirvieron durante 5 min, seguidas de un enfriamiento rápido en hielo.

### 11.2. Marcaje del extremo 5' de ssDNA

Los fragmentos ssDNA utilizados en los experimentos de migración retardada en geles de PAA como consecuencia de la unión de la RNAP, se marcaron en su extremo 5' siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y cols. (1989). Para ello, se mezclaron 6 unidades de T4 PNK, 1 pmol de ssDNA de 313 nt y 20  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP (actividad específica de 5000 Ci/mmol) en el tampón suministrado con el enzima, incubándose 30 min a 37 °C. Para la eliminación del nucleótido radiactivo no incorporado, la mezcla se trató con fenol:cloroformo (1:1, v/v) y el DNA se precipitó con 3 M acetato amónico y 3 volúmenes de etanol absoluto, seguido por un lavado con etanol al 80%. Para aumentar los niveles de precipitación del DNA en estas condiciones, dado que se había partido de una cantidad muy baja del mismo, se empleó poli(dIdC) como "carrier" en dicho proceso.

## 12. DETECCIÓN DE FORMAS ssDNA PLASMÍDICAS ACUMULADAS *IN VIVO*

Para la detección de las formas ssDNA de plásmidos contenidos en las estirpes *S.*

*pneumoniae* 708, *B. subtilis* MB11 y *S. aureus* RN4220 se procedió según el método descrito por te Riele y cols. (1986). En primer lugar se realizaron extractos crudos de células que contenían los plásmidos a estudiar. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 0.7% empleándose el tampón TBE con 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de EtBr. Se midió la distancia desde los pocillos del gel de las distintas bandas del DNA plasmídico tras ser fotografiado e irradiado con luz uv (254 nm). A continuación se transfirió el DNA a un filtro de nitrocelulosa siguiendo básicamente el método descrito por Southern (1975). Dependiendo de la finalidad del experimento, el DNA de los geles fue o no desnaturalizado previamente a su transferencia. El tratamiento desnaturalizante incluye la hidrólisis parcial del DNA con HCl 0.12 M e incubaciones sucesivas del gel en las soluciones Soak I (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) y Soak II (3M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2). Esta última solución tiene efecto neutralizante y fue la única empleada para el tratamiento de geles en condiciones no desnaturalizantes. En el primer caso, se transferirá tanto el DNA bicatenario como monocatenario, mientras que en el segundo caso sólo se transferirá el ssDNA presente en el gel. La transferencia del DNA de cada gel a filtros de nitrocelulosa se realizó por capilaridad utilizando la solución SSC 10 veces concentrada (1.5 M NaCl, 0.15 M citrato trisódico). Al cabo de 14 h, el filtro fue secado a 37 °C y el DNA se fijó al mismo durante 2 h a 80 °C. Antes de ser hibridados con la sonda radiactiva correspondiente, los filtros se prehibridaron en un tampón conteniendo 50% formamida, 5 mM EDTA, 0.9 M NaCl, 48 mM fosfato sódico pH 6.8, 0.1% SDS, 100  $\mu\text{g/ml}$  DNA de timo de ternera desnaturalizado y solución Denhart's 1x (preparada según Maniatis y cols., 1982) durante 2 h. Para la hibridación se agregó a este tampón, la sonda previamente desnaturalizada por calentamiento y se incubó 14 h a 37 °C. Tras el lavado y secado de los filtros, se expusieron a películas autorradiográficas. La radiactividad presente en las bandas de ss y dsDNA de cada plásmido se cuantificó directamente de los filtros hibridados utilizando el equipo PhosphorImager asociado al programa de análisis ImageQuant (Molecular Dynamics). A partir de los valores obtenidos, se calculó la relación ss/dsDNA en cada caso, teniendo en cuenta que el valor de radiactividad incorporada a las bandas dsDNA es el doble que la registrada para el ssDNA (por tratarse de dos hebras de DNA por copia plasmídica). Este factor de corrección se incluyó en todas los cálculos realizados.

Cuando interesó cuantificar la cantidad de ssDNA acumulada al agregar rifampicina

y/o eritromicina, se emplearon cultivos de *S pneumoniae* 708 conteniendo el plásmido en estudio, crecidos a una DO de 0.4. Los antibióticos se añadieron a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$  y el procedimiento de detección de formas ssDNA y cuantificación respecto a las formas dsDNA se realizó de la misma forma anterior.

### 13. OBTENCIÓN DE ssDNA CIRCULAR

Para aislar el ssDNA generado por los fagémidos recombinantes derivados de pALTER-1 construidos en este trabajo, que se emplearon en los experimentos de mutagénesis dirigida y de replicación *in vitro*, se procedió según las indicaciones dadas en el kit de mutagénesis empleado. Un cultivo de *E. coli* JM109 conteniendo el recombinante de interés, crecido en medio TYP suplementado con Tc (15  $\mu\text{g/ml}$ ), se infectó con el fago R408, usando una multiplicidad de infección (m.o.i, número de partículas del fago/célula) de 10. Este fago suministra las proteínas necesarias para que pueda generarse el ssDNA a partir del *ori* de fl presente en el fagémido, y para su encapsidación. Las partículas del fago y del recombinante salen a través de las células, quedándose en el sobrenadante después que éstas hayan sido centrifugadas. Dado que R408 sólo puede infectar células que contengan el factor F', se seleccionaron inicialmente los clones bacterianos que, además, no hubiesen perdido dicho factor durante las etapas anteriores de crecimiento. Para ello, se sembraron placas con un inóculo de estas bacterias en medio mínimo M9 suplementado con tiamina 1 mM y Tc. Como la estirpe JM109 es auxotrófica para prolina, se seleccionaron los clones que al contener el factor F', poseen la información genética para la síntesis de la misma. El DNA fágico junto con el DNA del fagémido recombinante se obtuvo siguiendo las indicaciones de Maniatis y cols. (1982). La precipitación de las partículas encapsidadas se realizó añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de una solución que lleva 20% PEG y 2.5 M NaCl a 1.2 ml cada sobrenadante. Las proteínas de la cápside se eliminaron tras sucesivas extracciones con fenol y fenol:cloroformo. El DNA resultante se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato potásico 3M pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. A continuación se lavó con etanol al 70%.

### 14. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS

#### 14.1 Extractos de *S. aureus*

Los extractos acelulares de estafilococos para los ensayos de replicación *in vitro* a

partir de ssDNA se realizaron con la estirpe *S. aureus* RN4220, siguiendo el método descrito por Birch y Khan (1992). Un litro de medio Brain-Heart se inoculó con 2 ml de un cultivo de esta bacteria crecido durante la noche. El nuevo cultivo se creció a 37 °C con agitación (250 rpm) hasta que se alcanzó una turbidimetría de 350 con el sistema de medida utilizado por los autores (aproximadamente una  $DO_{600} = 0.6$ ). Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm, durante 10 min, a 4 °C en el rotor GS3 (Beckman), se lavaron con tampón TEG (25 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA) y se resuspendieron en 4 ml del mismo tampón. La suspensión se trasvasó a tubos de policarbonato del rotor SW41, los cuales se congelaron inmediatamente en nieve carbónica y se mantuvieron así durante 10 min, descongelándose a continuación, a 15 °C. Se añadió KCl a una concentración final de 150 mM y se repitió una segunda ronda de congelación/descongelación. La lisis celular se llevó a cabo agregando 0.2 mg/ml (400u/ml) de lisostafina disuelta a 1mg/ml en TEG y dejando actuar al enzima durante 45 min en hielo. Se repitió una tercera ronda de congelación y descongelación a 15 °C y se centrifugó en rotor basculante SW41 previamente enfriado a 4 °C, durante 30 min a 33,000 rpm, para eliminar los restos celulares. Se midió el volumen del sobrenadante y se transfirió a un vaso de Bohemia de 25 ml. A partir de este momento se trabajó en una cámara climatizada a 4 °C. Para precipitar el DNA cromosómico de la preparación, se agregó, gota a gota, 0.1 volúmenes de una solución de sulfato de estreptomicina preparada al 30% en agua destilada, mientras se agitaba con un pequeño imán sometido a una fuente magnética. La agitación se continuó 30 min más. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm en un rotor SS-34 enfriado a 4 °C. Se decantó el sobrenadante en otro vaso de Bohemia de 25 ml y se añadió muy lentamente 0.472 g/ml de sulfato amónico, agitando de la misma forma anterior. De esta manera se consigue precipitar aproximadamente un 70% de las proteínas presentes en la preparación. Se centrifugó 15 min en las condiciones anteriores y el precipitado de proteínas se resuspendió en 1 ml de tampón TDE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 mM DTT y 10% etilén glicol). La resuspensión se dializó en una bolsa de diálisis durante 2 h en TEG. La concentración de proteínas del extracto se determinó mediante el empleo del reactivo BCA (Pierce). La concentración de proteínas fue de 60 mg/ml.

#### 14.2. Extractos de *S. pneumoniae*

Las estirpes empleadas en este caso, fueron, *S. pneumoniae* 708, *S. pneumoniae*

MP547 y *S. pneumoniae* MP560. Se creció en medio AGCH suplementado con sacarosa y extracto de levadura (ver Materiales) un cultivo de cada bacteria hasta una  $DO_{650} = 0.4$  (el medio de cultivo de la estirpe MP560 contenía, además,  $1.5 \mu\text{g/ml}$  de Cm). Se inoculó con 5 ml de cada cultivo, 1 litro del mismo medio y a la DO anterior se detuvo el crecimiento por enfriamiento en hielo. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , se lavaron con un tampón que contenía 50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  pH 6.9, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA y 0.1 mM PMSF y se resuspendieron en 4 ml de la misma solución. Se transfirió la resuspensión a tubos de policarbonato y tras una primera ronda de congelación en nieve carbónica/etanol y descongelación a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , se añadió KCl hasta una concentración final de 150 mM. Después de una segunda ronda de congelación y descongelación, las células se lisaron agregando  $10 \mu\text{g/ml}$  (unas 100 u/ml) de autolisina pura (purificada en el laboratorio del Dr. R. López) e incubando la mezcla 7 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El procedimiento posterior fue idéntico al descrito por Birch y Khan (1992) y desarrollado en el apartado anterior. La concentración de proteínas obtenida fue de 55 mg/ml.

## 15. REPLICACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE ssDNA

Los ensayos de replicación *in vitro* a partir de DNA monocatenario se realizaron siguiendo el método descrito por Birch y Khan (1992). Se emplearon básicamente las mismas condiciones, tanto para el sistema de *S. aureus* como para el sistema de *S. pneumoniae*, difiriendo solamente en la naturaleza del extracto usado y en que en el primer caso se marcó el DNA con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$  y en el segundo, con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ . Las reacciones se realizaron en un volumen total de  $30 \mu\text{l}$  conteniendo 150 ng de ssDNA,  $3 \mu\text{l}$  de solución RM 10x [0.4 M Tris-HCl, 120 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 1 M KCl, 20 mM ATP, 5 mM de cada rNTP (GTP, UTP, CTP), 0.5 mM cAMP, 0.5 mM NAD, 0.5 mM de dCTP, dGTP y dATP ó dCTP],  $20 \mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$  ó  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dATP}$  ( $10 \mu\text{Ci}$ ) y la cantidad de extracto ensayada. Las reacciones se incubaron a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  y se pararon con  $30 \mu\text{l}$  de solución de parada (50 mM EDTA, 2% SDS,  $25 \mu\text{g/ml}$  proteinasa K) y posterior incubación a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min. El volumen de cada ensayo se elevó a  $200 \mu\text{l}$  con TE 10:1 y se agregó  $10 \mu\text{g}$  de tRNA como "carrier" para la precipitación del DNA. La desproteinización de las muestras, se realizó mediante dos fenolizaciones sucesivas con  $200 \mu\text{l}$  de fenol:cloroformo. El DNA se precipitó con  $80 \mu\text{l}$  de 7.5 M acetato amónico y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, lavándose posteriormente con etanol al 70%. Las muestras se secaron al vacío durante 5 min y se resuspendieron en el

tampón correspondiente según se fuera a tratar enzimáticamente o a cargar en un gel de agarosa o de secuencia. Cuando se cuantificó la radiactividad incorporada al DNA, se procedió según el método de precipitación diferencial con ácido tricloroacético (TCA) descrito por Sambrook y cols. (1989).

## 16. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS ssDNA

Para los ensayos de retraso en gel y de transcripción *in vitro* se emplearon fragmentos ssDNA con la secuencia plasmídica que se deseaba estudiar. Estos fragmentos se obtuvieron por amplificación asimétrica mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la hebra de DNA conteniendo dicha secuencia. Para ello, se utilizó el kit de PCR de Boehringer Mannheim y se procedió según sus instrucciones y manteniendo una relación de 50:0.5 pmoles de los oligos, según la hebra de DNA que se desease amplificar. Los oligos empleados fueron:

- 1) 5'-TCAGCAAATGACAAGATGCTAGG-3'
- 2) 5'-TCATCCACTCAAGACTTTTGACGC-3'

La temperatura de fusión de los oligos, así como el diseño de los mismos de tal modo que no hibridaran con otras zonas del DNA molde, se calculó con el programa OLIGO (versión 3.4). Como molde se utilizaron aproximadamente 10 ng de un fragmento de 1.2 kb del plásmido con la secuencia de interés. Se realizaron 30 ciclos de 60 seg a 94 °C, 60 seg a 48 °C y 90 seg a 72°C, seguidos por dos ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 48 °C y 5 min a 72 °C. Los productos de cada reacción se sometieron a electroforesis en un gel preparativo de agarosa 2.5% y la banda de ssDNA se purificó por el método "MERmaid" (Bio 101, USA). La concentración de cada muestra se midió espectrofotométricamente.

## 17. ENSAYOS DE RETRASO EN GEL

Los ensayos de unión de la RNAP de *B. subtilis* a fragmentos ssDNA de 313 nt obtenidos por el métodos anterior se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ l que contenían 0.03 pmoles (30 000 cpm) del fragmento ssDNA marcado en su extremo 5', 1  $\mu$ g poli(dIdC), 1  $\mu$ g BSA, cantidades variables (9 - 64 ng) de RNAP (preincubada en 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 7 mM  $\beta$ ME, 50% glicerol, con la subunidad  $\sigma^A$  en cantidades saturantes) y el tampón de reacción B (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 90 mM sulfato amónico, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 4% sacarosa, 1 mM DTT). La RNAP utilizada fue purificada en

el laboratorio de la Dra. M. Salas según se indica por Mencía (1996). Cada ensayo se incubó a 4 °C durante 10 min y antes de ser cargado en un gel de PAA (40:1) 3.5%, se le añadió 2  $\mu$ l de glicerol al 30% sin colorantes. La electroforesis se llevó a cabo a 100V en una cámara climatizada a 4 °C. Los geles húmedos se adsorbieron a papeles de filtro y se cubrieron con film de plástico para su exposición autorradiográfica.

## 18. ENSAYOS DE TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Los ensayos de síntesis *in vitro* de pRNAs a partir de fragmentos ssDNA se realizaron utilizando la RNAP de *B. subtilis*. Cada reacción se llevó a cabo en 50  $\mu$ l totales. Primero, se agregaron 0.1 pmoles del fragmento ssDNA de 313 nt con la secuencia en estudio resuspendidos en 1  $\mu$ l y 20  $\mu$ l de tampón B. La mezcla se calentó durante 3 min a 90 °C y se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 pmol de RNAP (1  $\mu$ l) y se mantuvo 5 min en hielo antes de agregar 28  $\mu$ l de tampón B complementado con 0.36 mM de ATP, CTP y TTP, 5  $\mu$ g de heparina, 5 unidades de RNasina y 0.14 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (5  $\mu$ Ci). Cuando se utilizó SSB de *E. coli*, se añadieron 28.5 pmoles de la misma y se incubó con el ssDNA molde durante 20 min a 30 °C. Las reacciones se incubaron 10 min a 37 °C y se pararon con EDTA a una concentración final de 10 mM. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 0.1 volúmenes de acetato potásico 3 M pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol, empleando tRNA como "carrier". Las muestras se secaron al vacío durante 3 min, se resuspendieron en 6  $\mu$ l de tampón de carga, se calentaron a 90 °C durante 3 min y se sometieron a electroforesis en un gel de 15% PAA-8 M urea.

## 19. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Se utilizaron los programas DNASTAR para las comparaciones de secuencias de DNA. Las predicciones de plegamiento de DNA se realizaron con los programas PCFOLD y MOLECULE, desarrollados por M. Zucker y por J.R. Thompson, respectivamente. Para todas las cuantificaciones realizadas a partir de imágenes se usó el programa ImageQuant (Molecular Dynamics) y para elección de oligos para PCR se empleó el programa OLIGO (versión 3.4).

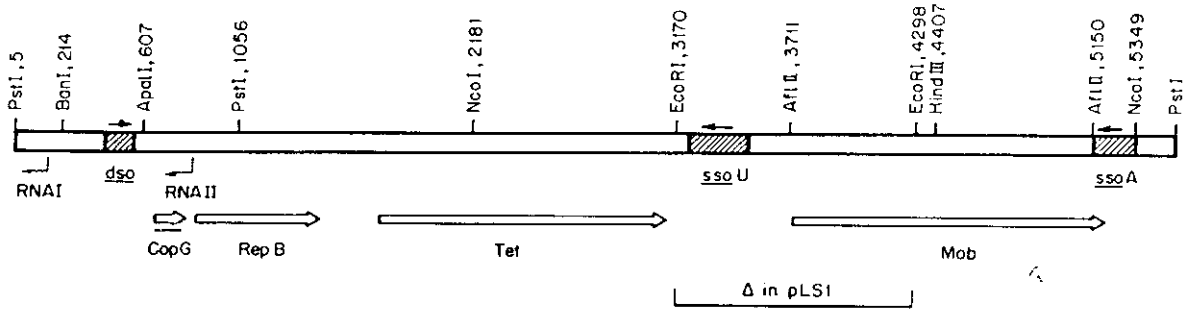
## **RESULTADOS**

---

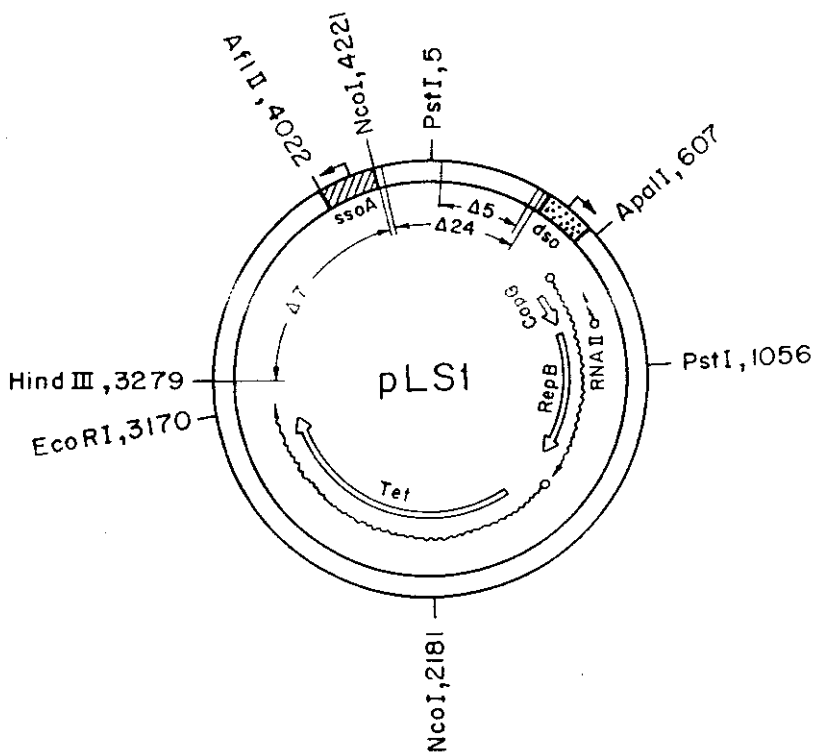
## 1. DEFINICIÓN DEL *ssoA* DE pMV158

Como se comentó en la Introducción, es necesario que en los plásmidos con replicación RC exista una etapa de conversión de los intermediarios ssDNA a dsDNA para que se complete su proceso replicativo (síntesis de la cadena retrasada). Esta etapa requiere la presencia de una señal que actúe como origen de replicación de la cadena complementaria (*sso*), tal como ocurre en los colifagos de cadena sencilla durante el paso de SS → RF.

En el plásmido pMV158 se han definido dos tipos de *sso*, según la homología de sus secuencias: *ssoA* y *ssoU* (Novick, 1989; van der Lelie, 1989). Ambos están localizados en la cadena codificante del plásmido y están separados por el gen *mobM* (Fig. 9). Hasta la fecha, éste es el único caso conocido donde en un mismo genoma se presentan dos señales distintas de conversión del ssDNA plasmídico. En este trabajo se estudiará la función de cada uno de estos orígenes de replicación, de forma separada y en varios huéspedes. El *ssoU* se encuentra en el fragmento de DNA limitado por los sitios *EcoRI* entre las coordenadas 3170 y 4298 de pMV158 (Fig. 11). Este fragmento de 1.1 kb contiene, además, la región promotora y parte del gen *mobM* y su delección dio lugar al plásmido pLS1 (4408 pb), cuyas funciones replicativas y sistemas de control del número de copias en *S. pneumoniae* han sido y siguen siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio. Tanto pMV158 como pLS1 se mantienen de forma estable en esta especie bacteriana y presentan un promedio de 36 y 22 copias por equivalente cromosómico, respectivamente. Dado que pLS1 posee un solo tipo de *sso*, el *ssoA*, y se sabe que es completamente funcional en dicho huésped, se utilizó este plásmido para el estudio detallado de este origen de replicación. Por lo tanto, y para simplificar, en este apartado (y en los siguientes que traten sobre el *ssoA*), en lugar de referirnos a la secuencia de su parental pMV158, se hablará en términos de coordenadas definidas para pLS1 por Lacks y cols., (1986). En la Figura 12 se presenta un esquema de pLS1 con los sitios de restricción más relevantes a este trabajo y su posición correspondiente en la secuencia del plásmido.



**Figura 11. Mapa físico y genético de pMV158.** Los orígenes de replicación de las cadenas líder (*dso*) y retrasada (*ssoA* y *ssoU*) se representan en un recuadro sombreado con sus respectivas direcciones de replicación (flechas). Se indican las proteínas codificadas por el plásmido y su dirección de síntesis (flechas anchas) y la posición de los RNAs antisentido, RNA I y RNA II (flechas onduladas). Se señalan los sitios de restricción más relevantes y sus coordenadas de corte. La deleción que da origen al plásmido pLS1 está indicada con un corchete.



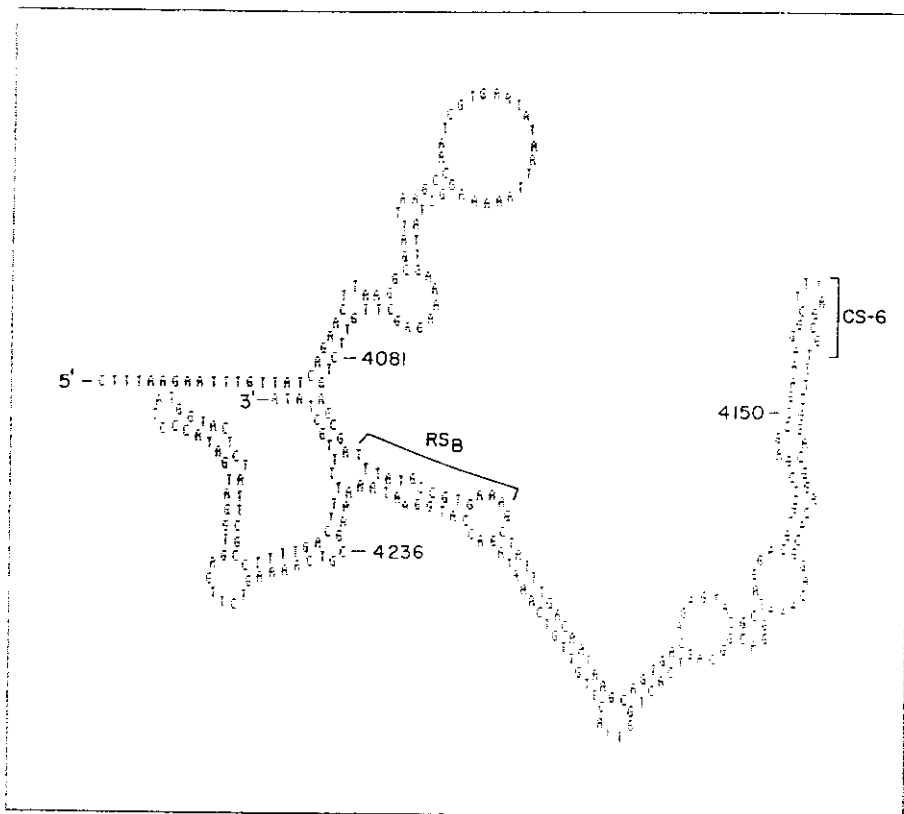
**Figura 12. Mapa físico y funcional de pLS1.** Los orígenes de replicación de las cadenas líder (*dso*) y retrasada (*ssoA*) se representan en un recuadro punteado y sombreado, respectivamente. La dirección de la replicación a partir de estos orígenes se indica con una flecha. Se muestra la extensión de las deleciones en pLS5 ( $\Delta 5$ ), pLS4 ( $\Delta 7 + \Delta 5$ ), pLS1 $\Delta 24$  ( $\Delta 24$ ), los promotores (círculos pequeños), los RNAs (flechas onduladas) y las proteínas codificadas por el plásmido (flechas anchas). Se indican los sitios de restricción más relevantes y las coordenadas de corte.

## 1.1. Análisis de deleciones en la región del *ssoA*

En el momento de iniciar esta Tesis, se tenían algunos datos sobre el origen de replicación de la cadena retrasada de pLS1 (*ssoA*), relativos a su posición y función en *S. pneumoniae* (una especie relacionada a *S. agalactiae*, desde donde pMV158 fue aislado originalmente), *B. subtilis* y *E. coli* (del Solar, 1991). Los derivados de pLS1 con los que se contaba entonces para estos estudios eran pLS5 y pLS4. El primero contiene una deleción de 332 pb (coordinadas 34 a 365;  $\Delta 5$  en Fig. 12) que resulta en el aumento de su número de copias al doble que el de su parental, en los tres huéspedes analizados. Aunque aún no se conoce exactamente la razón de este cambio fenotípico, se ha propuesto que la estructura secundaria existente en el fragmento deleciónado, actuaría como un posible elemento negativo del inicio de la replicación. El plásmido pLS4 fue construido a partir de pLS5 por eliminación del fragmento *Hind*III (3279) - *Nco*I (4221) ( $\Delta 7$  en Fig. 12). El efecto de esta segunda deleción se manifestó en un incremento de las formas ssDNA intracelulares generadas por el plásmido y en el descenso de su número de copias a la mitad del de pLS1 en *S. pneumoniae* (es decir, que tendría un número de copias cuatro veces menor que el de su parental pLS5). Tanto en este huésped como en *B. subtilis*, pLS4 mostró además, un grado de inestabilidad segregacional muy marcado, mayor incluso que el que le correspondería según un reparto al azar calculado teóricamente (del Solar, 1991; Tabla 3; ver Discusión).

La gran acumulación de intermediarios replicativos ssDNA de pLS4 en *S. pneumoniae* puso en evidencia que la señal de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA del plásmido se encontraba en este fragmento *Hind*III - *Nco*I de pLS1. Esta región contiene una secuencia de nucleótidos inversamente repetida, entre las coordinadas 4094 y 4225, con potencial para formar una estructura tipo tallo-lazo en cada cadena del DNA, con un 70% de sus bases apareadas (del Solar y cols., 1987a; Fig. 13). La presencia de este tipo de estructuras en el DNA es una característica compartida por todos los *sso* descritos hasta el momento, tanto para colifagos de cadena sencilla como para plásmidos con replicación RC. La existencia de una estructura secundaria en dicha región de pLS1 se comprobó experimentalmente mediante digestión controlada con nucleasa S1 de DNA superenrollado (del Solar y cols., 1987a). La homología de esta zona con los *sso* descritos para una serie de plásmidos de *S. aureus* permitió su

inclusión dentro del tipo *pala* ó *ssoA* de orígenes de replicación (Novick, 1989; Fig. 2). Al igual que en éstos, en el *ssoA* de pLS1 se destacan dos zonas conservadas: la región  $RS_B$ , ubicada en la base del tallo de la estructura secundaria formada y el hexanucleótido 5'-TAGCGT-3' (que denominaremos CS-6), localizado principalmente en el lazo desapareado de esta horquilla (Fig. 13). Por otro lado, se habían propuesto mecanismos alternativos de conversión  $ss \rightarrow dsDNA$  en pLS4, dado que este plásmido sigue siendo capaz de replicar en pneumococos a pesar de carecer de la señal principal de conversión del ssDNA plasmídico. Estos mecanismos son, sin embargo, muy poco eficientes, puesto que sólo garantizan la conversión a dsDNA de un porcentaje bajo de moléculas ssDNA, las cuales aparecen, como consecuencia, acumuladas en alta proporción en células de pneumococos que contienen pLS4 (del Solar y cols., 1987a; ver Fig. 15).

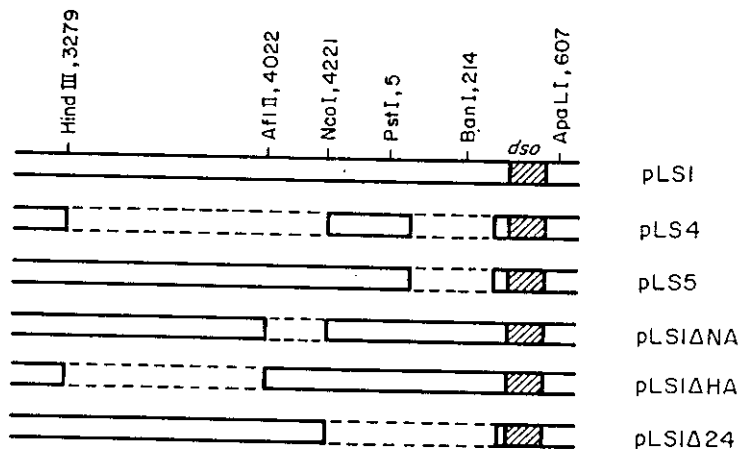


**Figura 13.** Estructura secundaria predicha del *ssoA* de pLS1. Se presenta el plegamiento intracatenario más estable predicho por ordenador (programas PCFOLD y MOLECULE) de la cadena (+) de pLS1, entre las coordenadas 4000 y 4300 del plásmido. Se indican las secuencias conservadas  $RS_B$  y CS-6 y algunas coordenadas de esta secuencia.

Teniendo en cuenta estos datos, se procedió al diseño de un estudio más detallado del *ssOA* de pLS1. En primer lugar había que acotar de forma experimental la región mínima que funcionaba como origen de replicación de la cadena complementaria en este plásmido. Este origen es completamente activo en *S. pneumoniae*, es decir, que las formas de ssDNA plasmídico detectables son muy bajas, debido al alto índice de conversión a dsDNA de las mismas. Esta característica facilitaba la determinación de variaciones en la acumulación de ssDNA plasmídico en células de pneumococos, fiel reflejo de variaciones en la funcionalidad de su *ssOA*, por lo que se utilizó dicho huésped para analizar, de forma comparativa, el contenido intracelular de ssDNA generado por plásmidos alterados en esta zona. Partiendo de la base de que la señal de conversión ss → dsDNA de pLS1 se encontraba dentro del fragmento *HindIII* - *NcoI* delecionado en pLS4 y que la estructura tipo tallo-lazo, así como las secuencias conservadas se localizan entre los sitios *AflIII* (4022) y *NcoI* (4221) incluidos en esta región, se construyeron dos derivados de pLS1 que carecían de los fragmentos *HindIII* - *AflIII* (pLS1ΔHA) y *AflIII* - *NcoI* (pLS1ΔNA) (Fig. 14). Con estos plásmidos se transformaron células competentes de *S. pneumoniae* y los clones seleccionados se crecieron en presencia de Tc (1μg/ml) hasta una D.O = 0.4, correspondiente a la mitad de su fase exponencial de crecimiento. Estos cultivos se utilizaron para preparar extractos crudos celulares. Como control se llevaron extractos de pneumococos que contenían los plásmidos pMV158 (*ssOA* + *ssOU*), pLS1 (*ssOA*), pLS5 (*ssOA* + Δ5), pLS4 (Δ*ssOA* + Δ5) y pLS1Δ24 (*ssOA* + Δ24). Este último replicón contiene una deleción que abarca desde el sitio *NcoI* hasta la coordenada 401, cercana al *dso* de pLS1 (Δ24 en Fig. 12).

El DNA plasmídico de cadena sencilla se puede detectar en extractos celulares siguiendo tres criterios: i) tiene una movilidad electroforética mayor en geles de agarosa que la de las formas monoméricas de DNA de doble cadena ccc (circulares, covalentemente cerradas superenrolladas); ii) se une a filtros de nitrocelulosa sin necesidad de desnaturalización previa, y iii) es totalmente sensible al tratamiento con nucleasa S1 (te Riele y cols., 1986). Por lo tanto, una forma de estimar la proporción de ssDNA plasmídico presente en un extracto celular, consiste en analizar (mediante hibridación con una sonda marcada) el DNA total transferido a una membrana tras su desnaturalización. La relación ss/dsDNA permitirá evaluar la función de los *ssO* plasmídicos de forma comparativa, independientemente i) del número de copias promedio (medido como dsDNA) que tengan

estos replicones en la población bacteriana, siendo dsDNA igual a la suma de las formas ccc más las formas oc (circulares abiertas) del plásmido, y ii) de variaciones experimentales entre los distintos ensayos. Para la detección de los intermediarios ssDNA y su cuantificación relativa al dsDNA en cada caso, se procedió según los apartados correspondientes de Métodos.



**Figura 14. Mapa de delecciones en pLS1.** Se representa esquemáticamente la región comprendida entre los sitios *Hind*III (coordenada 3279) y *Apa*LI (coordenada 607) de pLS1. Se señalan las delecciones (líneas punteadas) producidas en los plásmidos indicados a la derecha de cada representación. El origen de replicación de la cadena líder (*dso*) se representa en un recuadro sombreado. Se indican algunos sitios de restricción y sus correspondientes coordenadas de corte.

Los resultados obtenidos coincidieron con nuestras expectativas: sólo en el caso de pLS1ΔNA se detectó un incremento intracelular de ssDNA plasmídico comparable al de pLS4, mientras que pLS1ΔHA presentó un fenotipo igual al de su parental pLS1 (Fig. 15; Tabla 3). Ésto indica que las funciones implicadas en la conversión ss → dsDNA se hallan en la región *Afl*III - *Nco*I de pLS1 y que tanto la zona hacia la derecha (pLS1ΔHA) como hacia la izquierda (pLS5 y pLS1Δ24) de esta secuencia no influyen en la funcionalidad del *ssoA* de dicho plásmido. Por otro lado, el número de copias de pLS1ΔNA y su estabilidad segregacional bajan a niveles semejantes a los de pLS4, mientras que pLS1ΔHA mantiene ambos valores iguales a los de pLS1 (Tabla 5; ver Fig. 19). Nótese también, que en este huésped no existen diferencias significativas en cuanto al nivel de acumulación de ssDNA de pLS1 y de pMV158, a pesar de llevar este último un segundo tipo de *sso*. Esta característica había sido interpretada como la posible carencia de función del *ssoU* en *S. pneumoniae* cuando el *ssoA* está presente (del Solar y cols., 1993a) y se tratará más adelante.

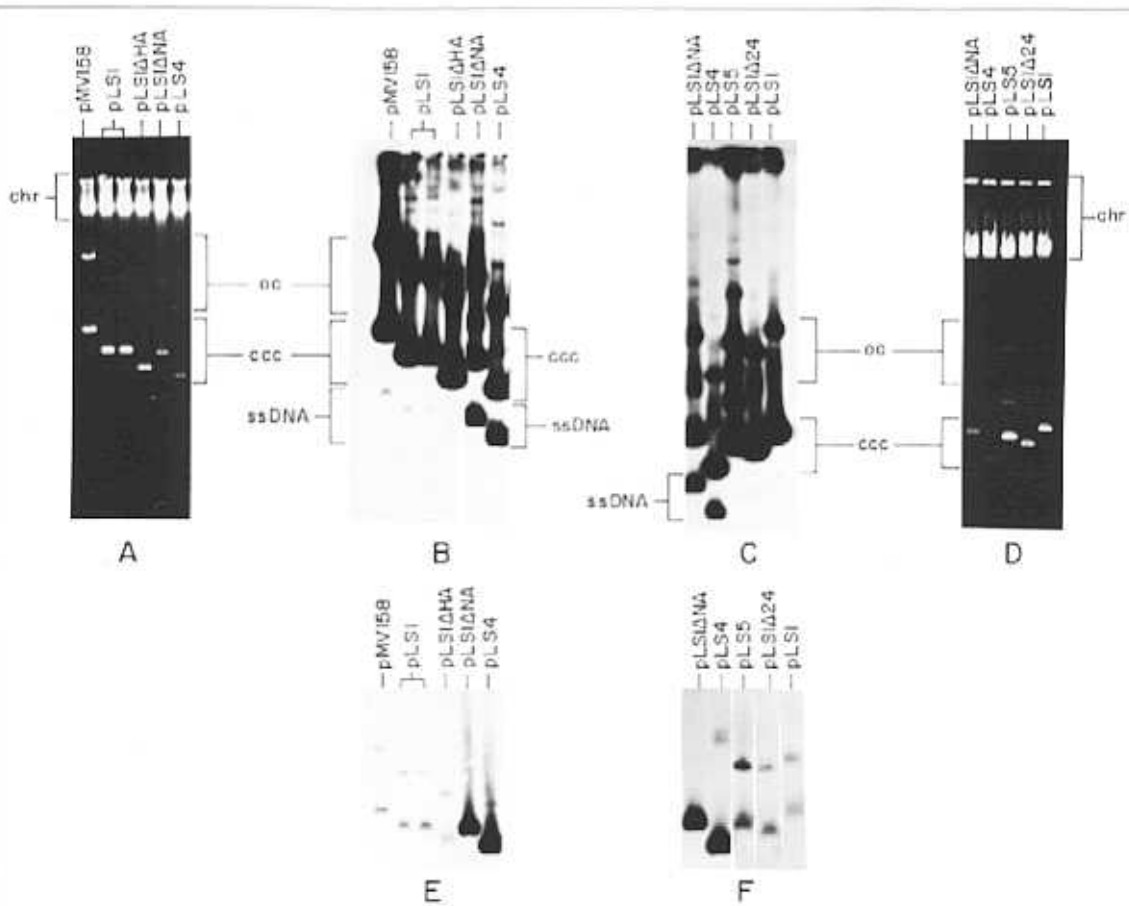


Figura 15. Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pLS1 y sus derivados en *S. pneumoniae*. El DNA total procedente de extractos crudos de células de pneumococos conteniendo los plásmidos indicados se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.7%, el cual se reveló por tinción con EtBr (A y D). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa con (B y C) o sin (E y F) desnaturalización previa; aquí se muestra la parte del gel que contiene el ssDNA plasmídico. Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Los autorradiogramas E y F han sido sobreexposados para revelar las débiles bandas correspondientes al DNA monocatenario (ssDNA) generado por los plásmidos pMV158, pLS1, pLS1ΔHA, pLS5 y pLS1Δ24. Se indican las formas de DNA plasmídico monomérico bicatenario: oc (circulares abiertas, que probablemente se solapan o estén muy cercanas a formas dimericas minoritarias del mismo) y ccc (circulares covalentemente cerradas, superenrolladas). chr: DNA cromosómico.

**Tabla 5.** Número de copias, relación molecular ss/dsDNA y estabilidad de pMV158 y sus derivados en *S. pneumoniae*

Plásmido	Número de copias <sup>a</sup>	ss/dsDNA	Lex <sup>b</sup>
pMV158	36 ± 6	0.005 ± 0.0006	< 0.004
pLS1	22 ± 2	0.006 ± 0.0003	< 0.004
pLS5	46 ± 3	0.008 ± 0.003	< 0.004
pLS4	11 ± 3	0.34 ± 0.10	0.1
pLS1ΔHA	20 ± 4	0.0052 ± 0.002	< 0.004
pLS1ΔNA	13 ± 3	0.31 ± 0.01	0.07
pLS1Δ24	21 ± 2	0.008 ± 0.002	< 0.004
pLS1Δ13	13 ± 4	0.12 ± 0.02	0.04
pLS1Δ14	12 ± 3	0.20 ± 0.04	0.05

(a) Medido como dsDNA (ccc + oc)

(b) Frecuencia de pérdida plasmídica por generación (para su cálculo, ver Métodos)

Quedando delimitado el *ssrA* de pLS1 en el fragmento *AflII* (4022) - *NcoI* (4221) de 199 pb (Fig. 16), se procedió a indagar dentro de éste acerca de las secuencias nucleotídicas que fueran importantes para su actividad *in vivo*. En una primera aproximación, se construyeron una serie de derivados delecionados de pLS1 mediante digestión controlada con nucleasa BAL31 a partir del plásmido linealizado con *AflII*. La digestión con este enzima se efectuó en condiciones que permitieran conseguir deleciones entre 100 y 200 pb a partir del sitio *AflII*. Una vez tratada con BAL31, la mezcla de reacción se sometió a la acción de la DNA PolIK de *E. coli* y de la DNA ligasa de T4 para conseguir la recircularización del DNA de los plásmidos resultantes. A continuación, se transformaron células competentes de *S. pneumoniae* con el producto de ligación, previamente cortado con *AflII* para evitar los plásmidos en donde BAL31 no hubiese actuado. Ésto se debe al mecanismo de incorporación de DNA exógeno empleado por células de pneumococos, en donde la frecuencia de transformación de plásmidos linealizados está muy disminuída respecto a la de plásmidos

circulares (Lacks, 1968). El fenómeno de incompatibilidad plasmídica existente entre elementos con el mismo replicón básico, permite que sólo un plásmido (y no más) se establezca en cada célula. Por ello, el fenotipo que adquiriera una colonia bacteriana podría ser indicativo del tipo de plásmido que contenga. Por ejemplo, se sabe que las colonias de *S. pneumoniae* que llevan un plásmido estable y con un número de copias como el de pLS1 (alrededor de 20/equivalente cromosómico), en un medio con presión de selección para el mismo (Tc), son de un tamaño mayor que las que contienen un plásmido segregacionalmente inestable y con un número de copias relativamente más bajo, como el de pLS4 (unas 10 copias/equivalente cromosómico). El menor tamaño de estas colonias parece estar determinado por un enlentecimiento del crecimiento celular ligado al grado de inestabilidad de tales replicones, es decir, que un plásmido que no se segregue homogéneamente durante la división celular, dará origen a células que carezcan del mismo y que crecerán como consecuencia más despacio en presencia de Tc. En estos casos, las colonias contarán con células más pequeñas y por lo tanto, aparecerán con un tamaño menor. Dado que pLS4 y pLS1ΔNA ven reducido su número de copias respecto al de pLS1 y son segregacionalmente inestables en *S. pneumoniae* a la vez que carecen de su señal principal de conversión del ssDNA, se consideró que un bajo número de copias en las nuevas construcciones podría ser indicativo "a priori" de la alteración del *ssoA*.

Con el fin de conseguir un derivado de pLS1 cuya deleción más pequeña producida por BAL31 tuviese un grave efecto en la funcionalidad de este origen, se seleccionaron los clones conteniendo plásmidos del tamaño más parecido a pLS1 y con el número de copias más bajo. Para ello se analizó el contenido en DNA plasmídico de 20 clones transformados, procedentes de colonias pequeñas. Para valorar el tamaño y el número de copias de cada plásmido se prepararon extractos crudos celulares a partir de dichos clones bacterianos. Una muestra (15 μl) conteniendo el DNA total de cada uno se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.8% a bajo voltaje (30V) durante 16 h, para poder apreciar mejor la diferencia de tamaño entre los distintos plásmidos. El DNA de cada preparación se visualizó tiñendo el gel con 0.5 μg/ml de EtBr y exposición a luz uv. Las formas dsDNA plasmídicas se cuantificaron mediante densitometría de los negativos de varias fotografías realizadas en estas condiciones y variando el tiempo de exposición. Se aislaron dos plásmidos que cumplían ambos requisitos: pLS1Δ13 y pLS1Δ14. Ambos carecen del sitio *RsaI* (4130) pero mantienen



Estos resultados permiten deducir una implicación importante de la secuencia y/o estructura secundaria del  $RS_{II}$  en la funcionalidad del *ssoA* de pLS1. Sin embargo, estos datos no descartan que lo realmente necesario sea una estructura global específica de este origen de replicación, más allá de una secuencia o estructura localizada. La predicción del plegamiento más estable de la región *A/III* - *NcoI* de estos dos plásmidos, evidenció una clara alteración de la totalidad de la horquilla y un aumento de las zonas desapareadas, aunque la región CS-6 se mantiene en un entorno similar que en el plásmido silvestre (Fig. 18).

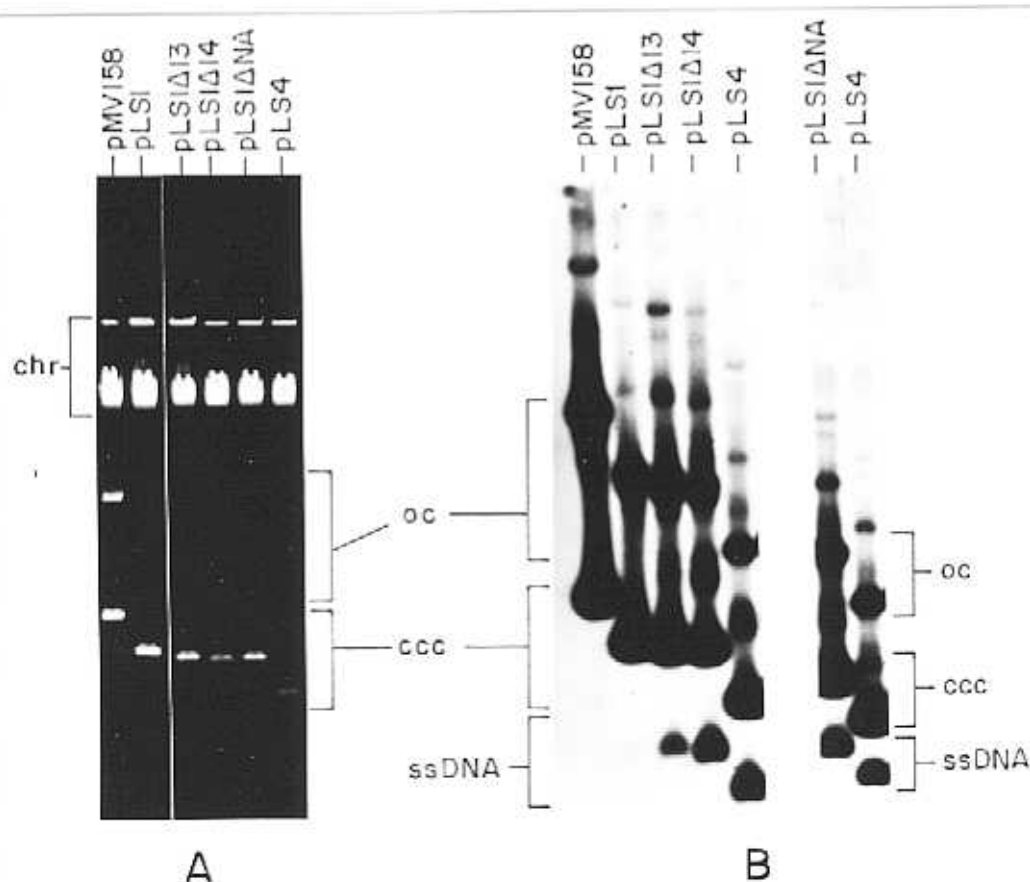


Figura 17. Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pLS1Δ13 y pLS1Δ14 en *S. pneumoniae*. Preparaciones de DNA total de células de pneumococos que contienen los plásmidos indicados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y se reveló por tinción con EtBr (A). El DNA, desnaturizado previamente, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (B) y se detectó por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Se indican las formas de DNA plasmídico bicatenario: oc (circulares abiertas) y ccc (circulares covalentemente cerradas, superenrolladas) y las de DNA monocatenario (ssDNA). chr: DNA cromosómico.

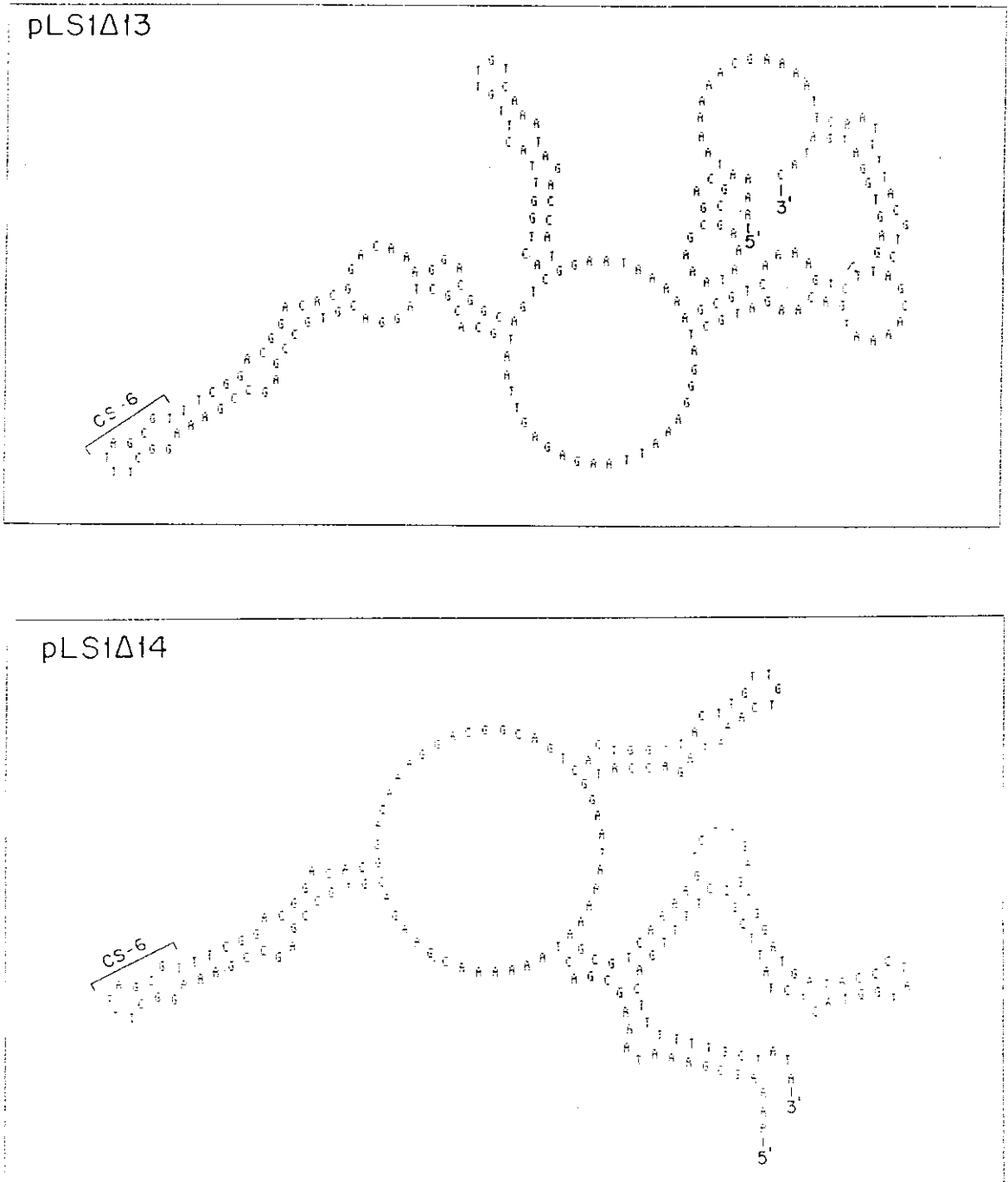
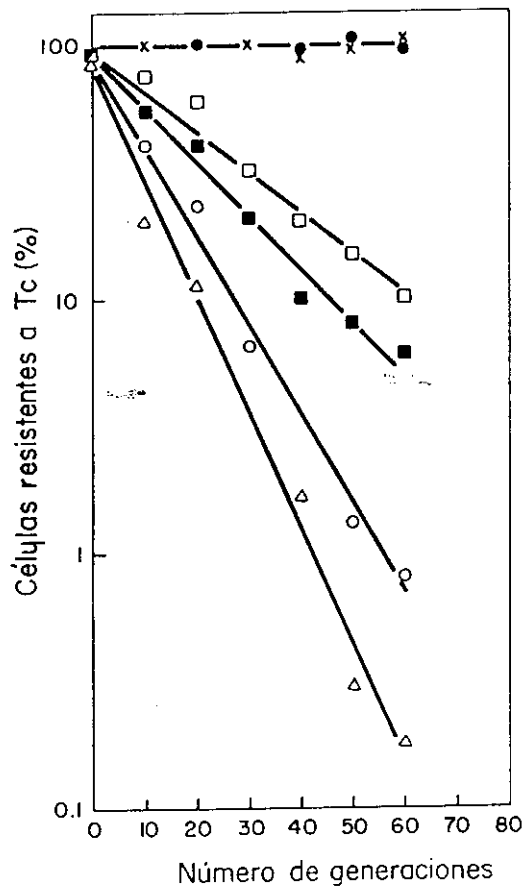


Figura 18. Efecto de las deleciones Δ13 y Δ14 en la predicción de la estructura del *ssO*A. Se presenta el plegamiento intracatenario predicho por ordenador para el ssDNA de pLS1Δ13 y pLS1Δ14 desde las coordenadas 3902 a 4300 de pLS1, generado como consecuencia de cada deleción.



**Figura 19.** Estabilidad segregacional de los derivados delecionados de pLS1 en *S. pneumoniae*. La proporción de células con plásmido en cultivos creciendo exponencialmente se determinó como el porcentaje de células Tc<sup>r</sup> medido al cabo de las generaciones indicadas. Como control, se analizó simultáneamente la estabilidad de pLS1 y pLS4. Símbolos: pLS1 (o), pLS1ΔHA (Δ), pLS1ΔNA (□), pLS1Δ13 (o), pLS1Δ14 (Δ), pLS4 (x).

## 1.2. Análisis de mutaciones en las regiones conservadas del *ssmA*

Continuando con el estudio de las regiones necesarias para la actividad del *ssmA* de pLS1, emprendimos el análisis de los requerimientos estructurales y de secuencia de las zonas conservadas de este origen (CS-6 y RS<sub>B</sub>), mediante mutagénesis dirigida. La dependencia de orientación del *ssmA* de pLS1 había sido comprobada *in vivo* (del Solar y cols., 1993a) y también se había descrito esta misma dependencia de cadena para el *ssmA* de otros plásmidos con replicación RC (Gruss y cols., 1987). Ésto permite suponer que al menos parte de las secuencias esenciales para el reconocimiento de esta señal en *S. pneumoniae* deben estar en una región desapareada de la estructura del origen. Esta es una característica que cumple la secuencia consenso CS-6, así como una parte de la secuencia

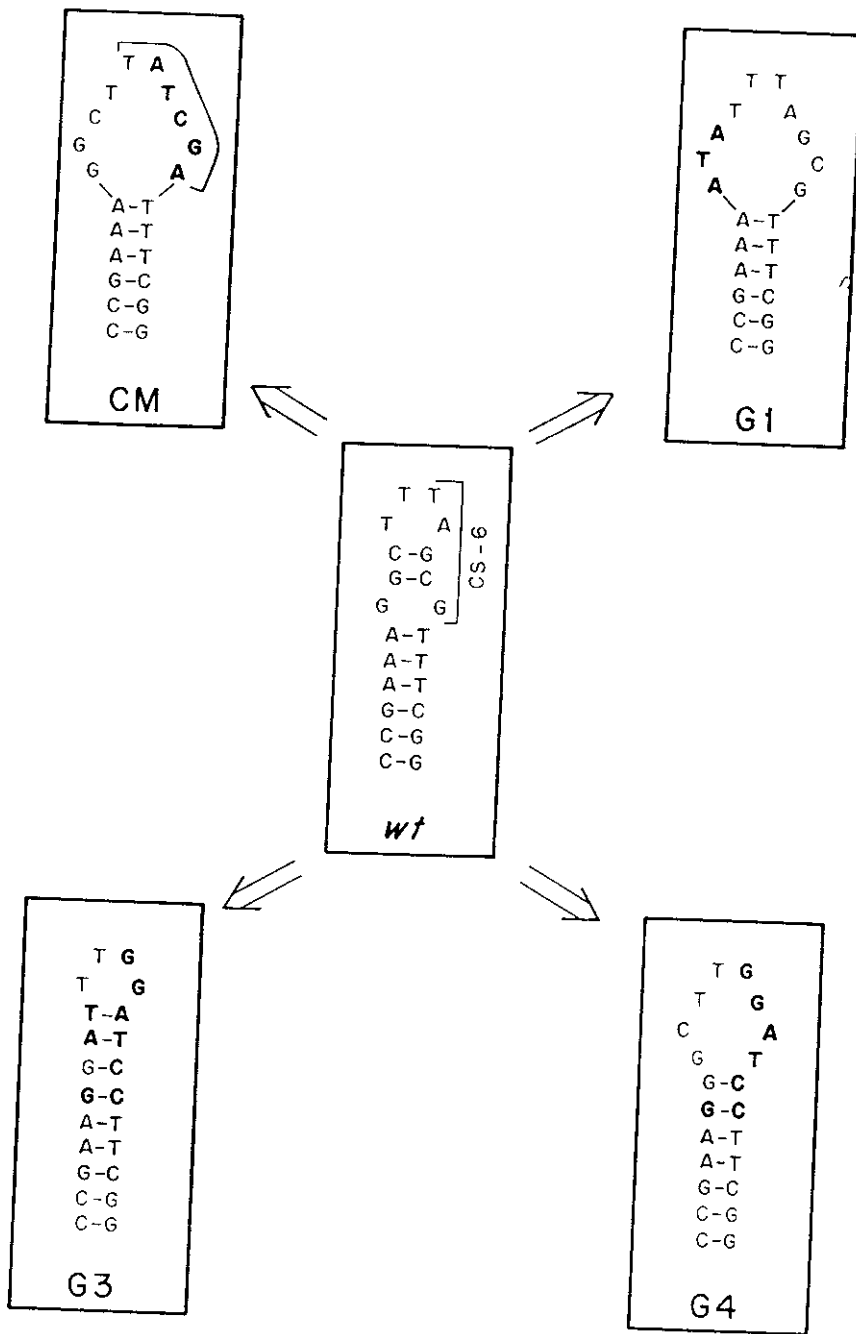
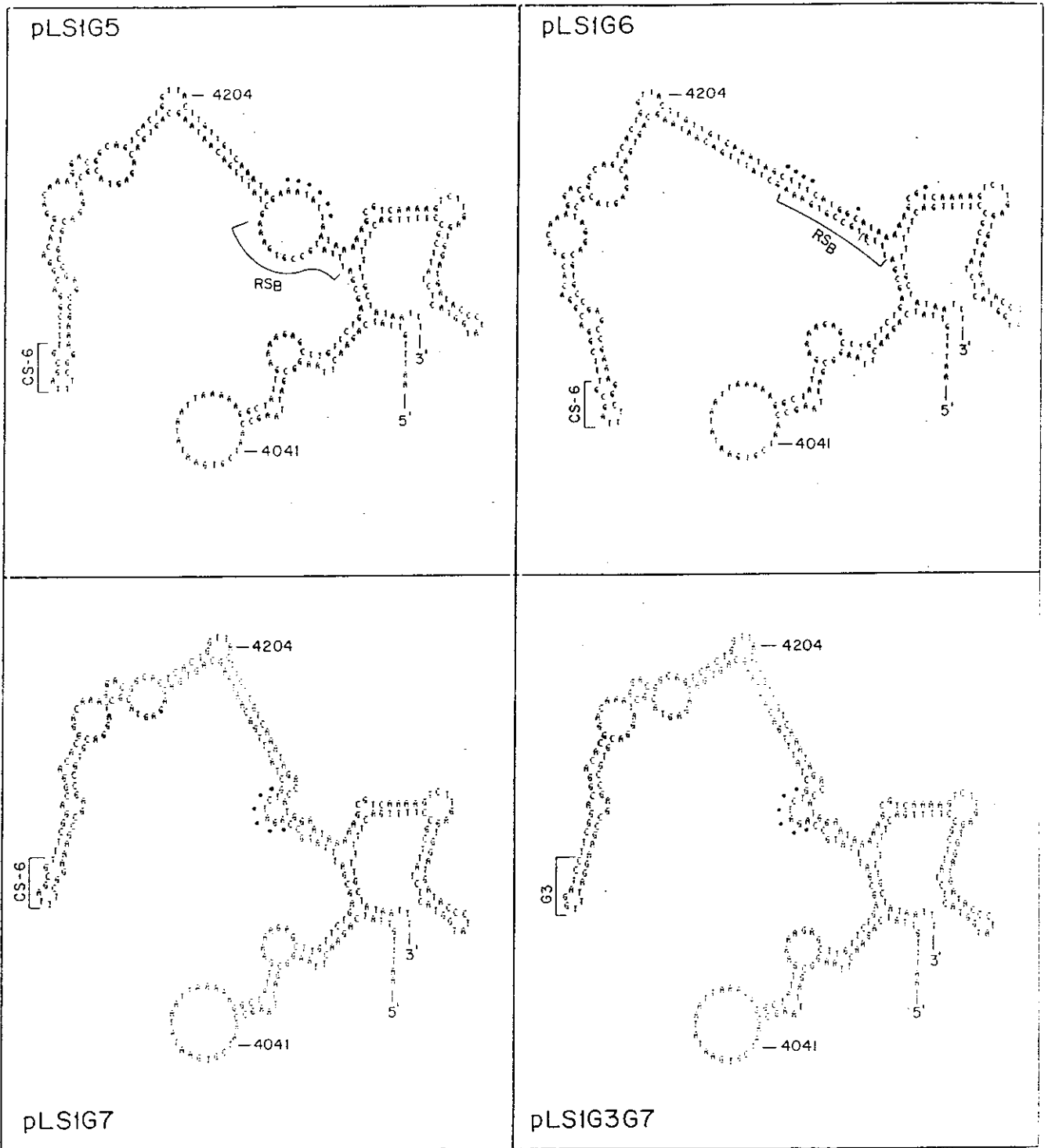


Figura 20. Mutaciones en la región CS-6 del *ssrA* de pLS1. Los nucleótidos sustituidos en la región CS-6 silvestre (centro) que dan lugar a cada mutación (CM, G1, G3, G4) se indican con letras oscuras. Se presenta la región comprendida entre las coordenadas 4149 y 4170 de pLS1. En CM se señala una secuencia muy parecida a CS-6, generada como consecuencia de la sustitución nucleotídica (corchete). La estructura secundaria completa del *ssrA* una vez introducida cada una de las mutaciones. Éstas no afectan al resto de la estructura silvestre del origen.

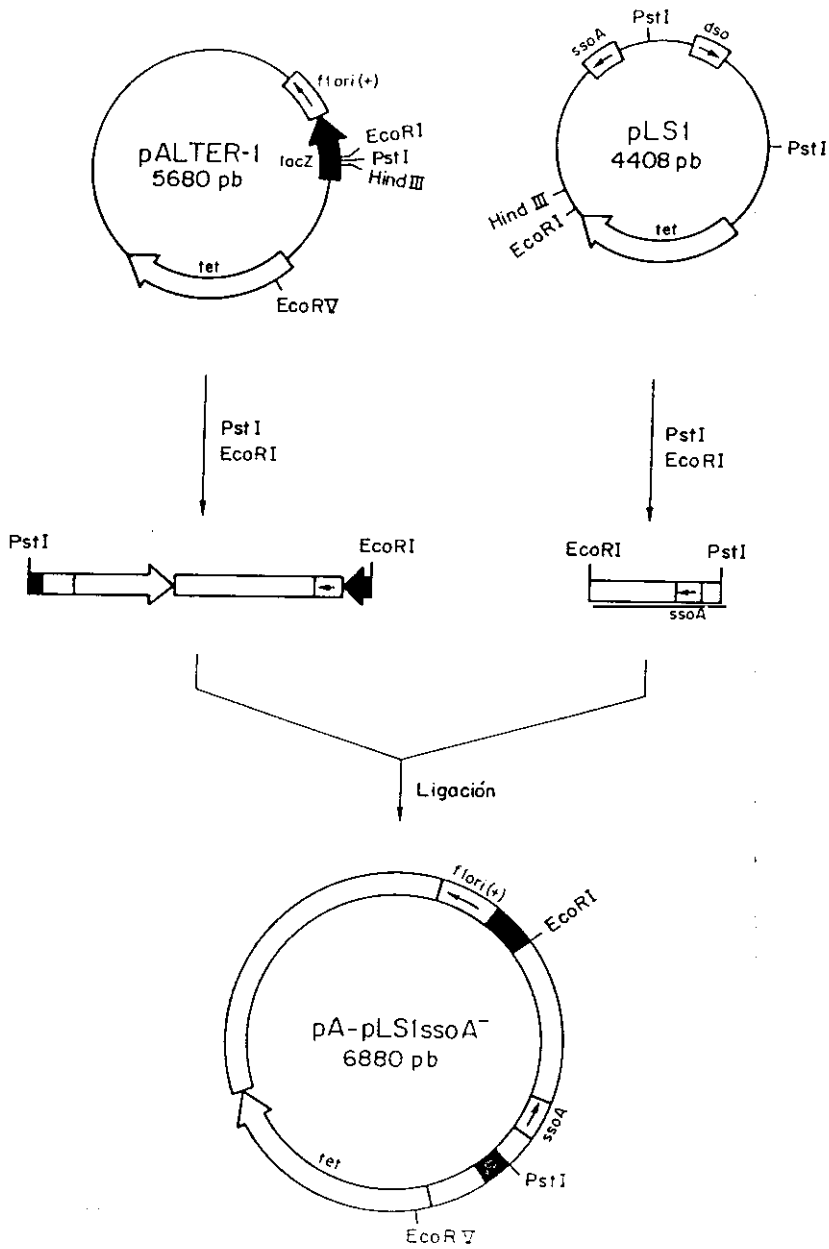
RS<sub>B</sub>. Si estas regiones no fueran relevantes se esperaría que presentaran una mayor variabilidad que la existente en regiones de apareamiento intracatenario, puesto que mutaciones en zonas desapareadas no desestabilizarían la estructura secundaria del *ssoA* ni obligarían a mutaciones compensatorias para mantener el apareamiento. Con el fin de comprobar si efectivamente eran las zonas desapareadas de estas secuencias las que determinaban la funcionalidad del origen, se diseñaron una serie de mutantes en donde se alteró la secuencia y/o la estructura local de ambas regiones conservadas.

En un primer grupo se introdujeron cambios sutiles (pLS1CM) o totales (pLS1G3 y pLS1G4) en la secuencia CS-6, en las secuencias desapareadas del RS<sub>B</sub> (pLS1G7) o en ambas regiones (pLS1G3G7). La modificación de la estructura local en estas zonas como consecuencia de las mutaciones generadas fue muy pequeña. En un segundo grupo de mutantes se alteró el apareamiento interno de la estructura adoptada por el *ssoA* de pLS1 en la región CS-6 (pLS1G1) o RS<sub>B</sub> (pLS1G5 y pLS1G6) variando la secuencia nucleotídica de las zonas complementarias a ellas. Los cambios producidos y las predicciones de las estructuras secundarias generadas en cada caso se esquematizan en las Figuras 20 y 21. Aquí se puede ver además, que estas mutaciones sólo afectan zonas específicas dentro del origen, mientras que la estructura global del mismo permanece inalterada.

Para realizar los experimentos de mutagénesis dirigida, se clonó el fragmento pequeño *EcoRI* - *PstI* de pLS1 (coordenadas 3170 a 5; Fig. 12) que contiene el *ssoA*, en el fagémido pALTER-1 cortado con las mismas enzimas de restricción, dando lugar al fagémido recombinante pA-pLS1ssoA<sup>+</sup> (Fig. 22). Los sitios *EcoRI* y *PstI* (coordenadas 5 y 48, respectivamente) en este vector, se encuentran en una región de clonaje múltiple incluida dentro del gen *lacZ*. La selección del recombinante y el procedimiento de mutagénesis dirigida seguido, se detallan en el apartado 10 de Métodos. Los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis, en cada caso, se presentan en la Tabla 6. A la vez que se modificó la secuencia del *ssoA*, se crearon sitios de restricción que permitieron localizar la mutación deseada más fácilmente.



**Figura 21.** Mutaciones en la región  $RS_B$  del *ssoA* de pLS1. Se presenta la estructura secundaria predicha por ordenador para los derivados mutagenizados del *ssoA* en la región  $RS_B$ , dando lugar a pLS1G5, pLS1G6, pLS1G7 y al doble mutante (en  $RS_B$  y CS-6) pLS1G3G7. La región plegada incluye las coordenadas 4000 y 4300 de pLS1. Los puntos negros señalan los nucleótidos sustituidos en la secuencia silvestre. Se indican algunas coordenadas del plásmido, las secuencias conservadas que permanecen inalteradas y los extremos 5' y 3' de la cadena plegada; cadena (+).



**Figura 22.** Construcción del fagémido recombinante  $pA-pLS1ssoA^-$ . Se digirieron 1  $\mu g$  del DNA de  $pALTER-1$  y 3  $\mu g$  del DNA de  $pLS1$  con los enzimas  $PstI$  y  $EcoRI$ . Los productos de cada digestión se corrieron en un gel preparativo de agarosa 1%, a partir del cual se purificó el fragmento grande de  $pALTER-1$  (5637 pb) y el fragmento  $PstI - EcoRI$  pequeño de  $pLS1$  (1243 pb). Ambos se mezclaron en una proporción 1:1 en moléculas y se trató con T4 DNA ligasa. Se usó un tercio de la mezcla de ligación para transformar células competentes de *E. coli* JM109 y los clones conteniendo el fagémido recombinante se seleccionaron en placas TY con IPTG (0.5 mM), X-Gal (20  $\mu g/ml$ ) y Tc (15  $\mu g/ml$ ). El sentido de la replicación a partir de cada uno de los orígenes representados (recuadro blanco) se indica con una flecha. Se muestra la dirección de transcripción de los genes (flechas anchas) y los sitios de restricción más relevantes. El gen  $lacZ$  queda inactivado como consecuencia de esta construcción.

Tabla 4. Oligonucleótidos y mutaciones generadas en la región del *ssoA* de pLS1

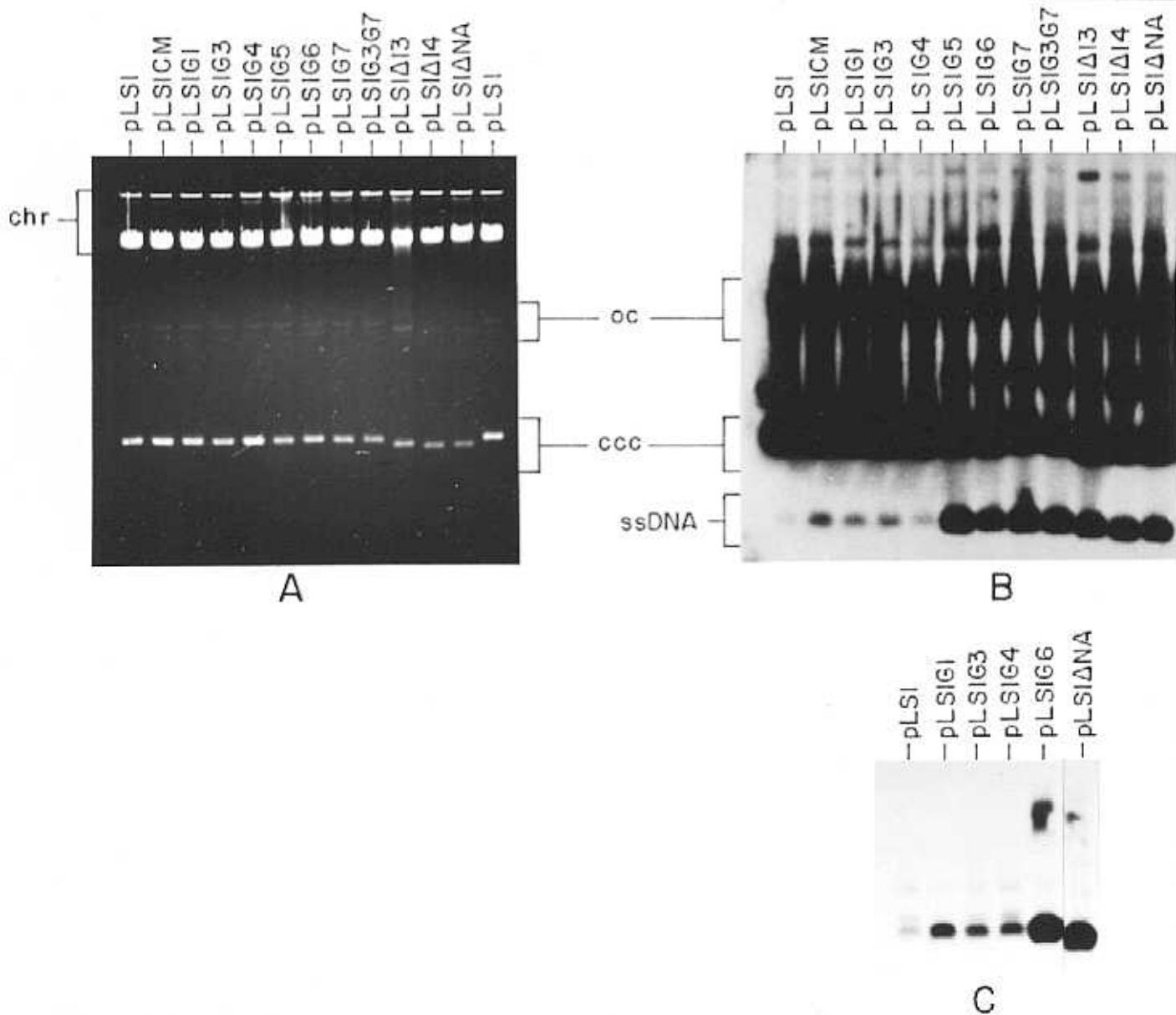
Mutación (X)	Oligonucleótido (5' - 3') <sup>a</sup>	Sitio de restricción
CM	CGAGCCGAAAGGCTT <u>ATCG</u> ATTTTCGGACGGACACGGA	<i>Cla</i> I
G1	CGTGCCGAGCCGAAA <u>ATAT</u> TTTAGCGTTTCGGAC	<i>Ssp</i> I
G3	CGTGCCGAGCCGAAGGATTT <u>GGATC</u> CTTCGGACGGACACGG	<i>Bam</i> HI
G4	CCGAGCCGAAGGGCTT <u>GGATC</u> CTTCGGACGGACACGG	<i>Bam</i> HI
G5	CTTGTTGTCAAATAGAA <u>ATAT</u> TAATAAAAAGCGTCAAAAAGTCTTG	<i>Ssp</i> I
G6	CTTGTTGTCAAATAGCTTTCATGGCATAAAAAGCTTCAAAAAGTCTT GAGTGGA	<i>Hind</i> III
G7	TGAGCGATTTATGCC <u>AGATC</u> TGCTATTTGACAATAA	<i>Bg</i> III

(a) Los cambios generados en la secuencia silvestre de pLS1 están subrayados; los sitios de restricción creados y reconocidos por los enzimas indicados a la derecha, están en letras oscuras.

Para determinar si la acumulación de ssDNA y/o número de copias de los plásmidos derivados de pLS1 que contenían cada mutación había variado, se transfirió el fragmento *Eco*RI - *Pst*I clonado en pALTER (y mutagenizado) nuevamente al plásmido original (intercambiando el mismo fragmento silvestre de pLS1 por uno mutado) y los plásmidos resultantes se establecieron en *S. pneumoniae*. A estos replicones se les denominó pLS1X, donde X representa el tipo de cambio generado (CM, G1, G3 - G7, G3G7). En todos los casos, el número de copias que exhibieron estos derivados fue semejante al de su parental (Fig. 23A). Solamente pLS1G3G7 se mostró un tanto inestable en este huésped (Lex = 0.02), mientras que los demás plásmidos analizados (pLS1CM, pLS1G3 y pLS1G6) se mantuvieron establemente en la población al cabo de 60 generaciones ensayadas.

Cuando se analizó el nivel intracelular de ssDNA acumulado por estos plásmidos, se pudieron distinguir dos categorías de mutantes (Fig. 23B y C). Los plásmidos que tenían alterada la región CS-6 (pLS1CM, pLS1G1, pLS1G3 y pLS1G4) acumularon una cantidad de ssDNA tres veces superior a la de pLS1, independientemente de la naturaleza de la

mutación introducida. Por otro lado, los plásmidos con la región  $RS_B$  modificada (pLS1G5, pLS1G6 y pLS1G7), así como el doble mutante (pLS1G3G7), presentaron un fenotipo similar al de los plásmidos en donde la secuencia  $RS_B$  se había deletado totalmente (pLS1 $\Delta$ 13 y pLS1 $\Delta$ 14) o carecían completamente de *ssnA* (pLS1 $\Delta$ NA).



**Figura 23.** Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de los derivados mutagenizados de pLS1. El DNA total de células de pneumococos que contienen los plásmidos indicados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y tinción con EtBr (A), transfiriéndose posteriormente a un filtro de nitrocelulosa con (B) o sin (C) desnaturalización previa; aquí se muestra la parte del gel correspondiente al ssDNA plasmídico. Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Ambos autorradiogramas han sido sobreexpuestos para revelar las débiles bandas correspondientes al ssDNA de los plásmidos pLS1CM, pLS1G1, pLS1G3 y pLS1G4. Como control se llevó el mismo ensayo con pLS1. Se indican las formas plasmídicas bicatenarias: circulares abiertas (oc) y circulares covalentemente cerradas, superenrolladas (ccc). chr: DNA cromosómico.

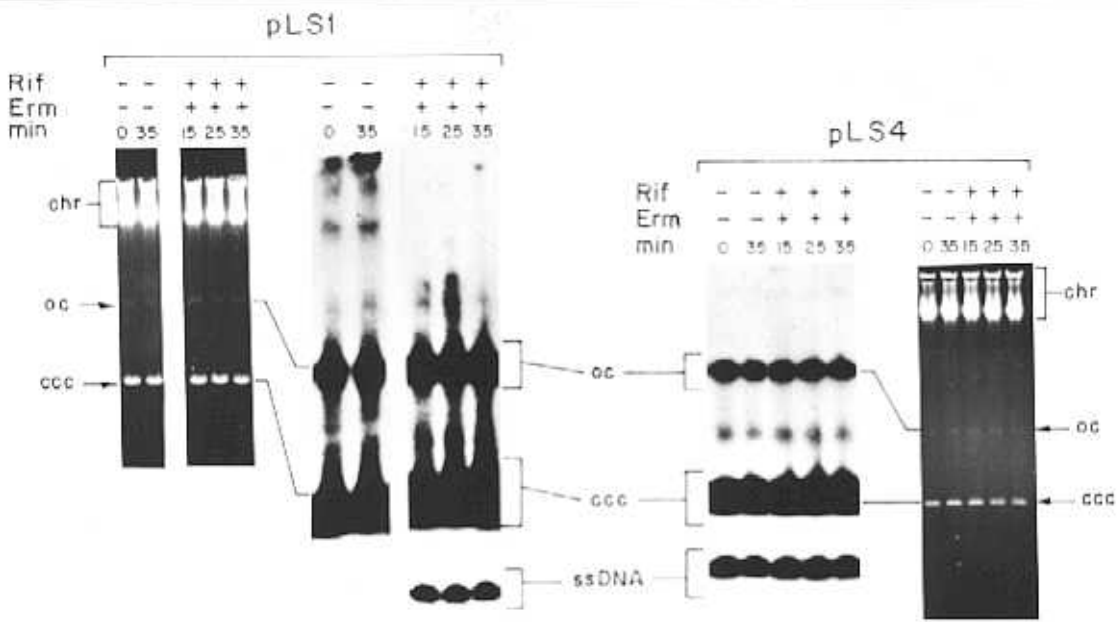
Estos resultados permiten concluir que, en *S. pneumoniae*, tanto la secuencia nucleotídica de las bases desapareadas como el apareamiento intracatenario de la región RS<sub>B</sub> de pLS1 tienen un rol principal en el reconocimiento huésped-plásmido para la conversión ss → dsDNA plasmídico *in vivo*, y que la región CS-6 tiene una influencia, aunque bastante menor, en la funcionalidad de este origen. En segundo lugar, si el reparto de cada replicón fuera completamente al azar durante la división celular y por lo tanto ligado únicamente a su número de copias, todos estos derivados deberían ser tan estables como pLS1 en la población, dado que ninguna de las alteraciones locales del *ssoA* supusieron un descenso significativo en su número de copias. Sin embargo, no sucede así para pLS1G3G7. Ésto, junto con otros datos de estabilidad obtenidos durante la realización de este trabajo, ponen de manifiesto una relación poco clara entre ambas características plasmídicas (esta última observación se tratará en la Discusión).

## 2. EL MECANISMO DE INICIACIÓN DE LA CADENA RETRASADA DE pLS1

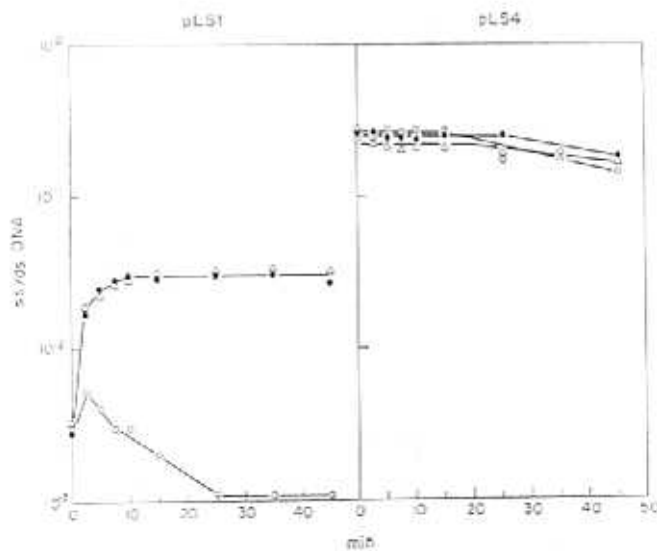
Los enzimas bacterianos que participan en la síntesis de la cadena complementaria durante la replicación RC habían sido descritos para algunos plásmidos de *S. aureus* (pT181, pC194 y pUB110) e involucran a la RNAP en dicho proceso (Birch y Khan, 1992; Boe y cols., 1989). Para estos plásmidos se había sugerido entonces, un mecanismo de iniciación similar al utilizado por los fagos filamentosos de *E. coli* (ver Introducción), en donde la RNAP sintetiza un pequeño transcrito que oficia como cebador a las DNA polimerasas del huésped en la replicación de la cadena retrasada. Aunque nada se sabía acerca de la forma en que los plásmidos de estreptococos iniciaban la síntesis de esta cadena, la gran homología existente entre el *ssoA* de pLS1 (funcional en *S. pneumoniae*) y el de los plásmidos anteriores (funcional en *S. aureus*), hacía suponer un mecanismo de acción semejante en todos estos casos. Para determinar si la RNAP de pneumococos estaba realmente implicada en el proceso de conversión ss → dsDNA, se analizaron los productos plasmídicos generados después de tratar con rifampicina (100 µg/ml), eritromicina (100 µg/ml) o con ambos antibióticos juntos, cultivos en crecimiento exponencial de células de *S. pneumoniae* conteniendo pLS1 (*ssoA*) o pLS4 ( $\Delta$ *ssoA*). A intervalos de tiempo diferentes, se tomaron muestras de los cultivos así

tratados y con ellas se prepararon extractos crudos celulares. El DNA total de cada preparación se corrió en un gel de agarosa 0.7% y se transfirió, con desnaturalización previa, a una membrana de nitrocelulosa para determinar la cantidad relativa de cada una de las formas de DNA plasmídico generadas. El tratamiento con rifampicina (Rif) inhibe la actividad de la RNAP y por lo tanto, la síntesis de RNA. Si éste era el enzima responsable de la síntesis del pRNA en pLS1, la adición del antibiótico debía traducirse en el acúmulo de formas ssDNA como consecuencia directa de la falta de cebadores para la síntesis de la cadena complementaria del plásmido. Si estos pRNAs eran producto de alguna otra actividad enzimática, como por ejemplo la primasa o el primosoma, la inhibición de la RNAP no debía suponer ningún efecto en la acumulación de las formas monocatenarias del plásmido, al menos a corto plazo. Para conseguir mantener una cantidad constante de DNA plasmídico se trató cada preparación con eritromicina (Erm), un inhibidor de la síntesis proteica. El tratamiento con este antibiótico impedía la síntesis de nuevas moléculas de RepB, previniendo así próximas rondas replicativas desde el *dso*.

En la Figura 24A se muestran los geles teñidos con EtBr y los autorradiogramas correspondientes a los ensayos realizados con cultivos sin tratar o donde se agregaron ambos antibióticos juntos. Aquí se observa un notable incremento de las formas ssDNA generadas por pLS1 en las células tratadas con Rif, mientras que en las mismas condiciones no se registró ningún cambio para pLS4. Se cuantificaron las diferentes formas de DNA plasmídico en cada preparación y la relación molecular ss/dsDNA se graficó en función del tiempo de tratamiento con los antibióticos mencionados (Fig. 24B). Los resultados obtenidos indican la actuación directa de la RNAP de *S. pneumoniae* en el inicio de la síntesis de la cadena retrasada de pLS1. Tras la adición de Rif o de Rif + Erm, la relación ss/dsDNA se vio incrementada rápidamente alcanzando a los 15 min un nivel 10 veces más alto respecto al del cultivo no tratado. Este comportamiento sólo se observó en las preparaciones que contenían pLS1, indicando que la RNAP actúa de forma específica en plásmidos que llevan la señal *ssoA*. Por el contrario, pLS4 no experimentó ningún cambio en su comportamiento replicativo cuando se inhibió la síntesis proteica y/o del RNA, siendo la cantidad de ssDNA plasmídico acumulada igual (y alta) en todos los casos, tanto con como sin antibiótico. Ésto puso de manifiesto que los mecanismos alternativos de inicio de la síntesis de la cadena complementaria, en ausencia del *ssoA*, que deben existir en pLS4 para permitir su replicación



A



B

Figura 24. Efecto de la rifampicina en la conversión  $ss \rightarrow dsDNA$  en pLS1 y pLS4. Cultivos de pneumococos en crecimiento exponencial, que contienen el plásmido pLS1 o pLS4 se trataron (+) o no (-) con rifampicina (Rif), eritromicina (Erm) o ambos antibióticos juntos. A los tiempos indicados (min) se tomaron muestras de cada uno, con los que se prepararon extractos crudos. El DNA de los mismos se sometió a electroforesis en gels de agarosa 0.7% y posterior transferencia a nitrocelulosa con desnaturalización. Las distintas formas de DNA plasmídico se visualizaron como en el caso anterior. A. En el gel teñido con EtBr y en los autorradiogramas correspondientes se indican las formas de DNA monocatenario (ssDNA) y bicatenario (dsDNA): oc (circulares abiertas) y ccc (circulares covalentemente cerradas y superenrolladas). chr: DNA cromosómico. B. Se cuantificaron las formas ss y dsDNA (ccc + oc) de cada plásmido y la relación molecular ss/dsDNA se representa en función del tiempo de tratamiento con los antibióticos indicados. Símbolos: Rif (○), Erm (□), Rif + Erm (△).

en *S. pneumoniae*, son independientes de RNAP. Por otro lado, cuando los cultivos conteniendo pLS1 se trataron solamente con Erm, se observó un claro descenso en la relación ss/dsDNA del plásmido con el transcurso del tiempo (Fig. 24B). Dado que este antibiótico sólo actúa a nivel de la síntesis proteica (sin alterar la síntesis de RNA), evitando así la producción de nuevas moléculas ssDNA del plásmido, este hecho podría tener dos explicaciones: i) que el descenso en la cantidad relativa de formas ssDNA de pLS1 observado, fuera producto de la propia degradación de estas moléculas por nucleasas existentes en el cultivo o en los extractos celulares procedentes del mismo, o ii) que el contenido en ssDNA plasmídico descendiera como consecuencia de su conversión posterior a formas dsDNA, promovida por la acción de la RNAP que hubiese todavía en el sistema. Como en los cultivos que contenían pLS4 no se observó un descenso tan acusado de las formas ssDNA plasmídicas tras el tratamiento con Erm, parece ser que la segunda explicación es la más probable, ya que si fuera degradación, y por tratarse de un experimento realizado en el mismo hospedador y en las mismas condiciones, tanto la monocadena de uno como del otro plásmido deberían haber sido atacadas de igual manera.

Si la causa del descenso de las formas ssDNA generadas por pLS1, en un sistema donde está inhibida la replicación a partir del *dso*, fuera debido realmente a su posterior conversión a formas dsDNA, estos resultados confirmarían una vez más, que la RNAP que hubiese en estos cultivos (o extractos) no actúa en los mecanismos alternativos de conversión ss → dsDNA de pLS4, al menos de una forma evidente, y sólo interviene en la síntesis de la cadena complementaria de plásmidos que contengan el *ssoA*.

### 3. REPLICACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DEL *ssoA* DE pLS1

La síntesis *in vitro* de la cadena complementaria de pLS1 y sus derivados se estudió en dos sistemas diferentes: el de *S. aureus* y el de *S. pneumoniae*.

```

pLS1      4082
          TGAGCGA--TTTATGCCGTGAAAGCTATTTGACAATAAGCAGTGACAG-----AGTACGCTAGGA-CGTGCCGAGC
          *** * ***** ** ** **
pE194     632
          AGAGGTACTTTTATGCCGAGAAAACTTTTGCGT-----GTGACAGTCCTTAAATATACTTAGAGCGTA---AG-
          632

pLS1      CGAAAGGCTTTAGCG-----TTTTCGGACGGACAC-----GGACA---AA-GGACGGCAGT-CACTGGTTAC
          ***** **
pE194     CGAAAGTAG-TAGCGACAGCTATTAACCTTTCGGTTGCAAAGCTCTAGGATTTTAAATGGACG-CAGCGCA---TCAC

pLS1      TTGTTGTCAAATAGACCA-TGGAATAAAAAGCGTCA
          * **** ** * ***** ** *
pE194     ACG---CAAAAAGGAAATTGGAATAAAT-GCGAAAT
          802
          4240

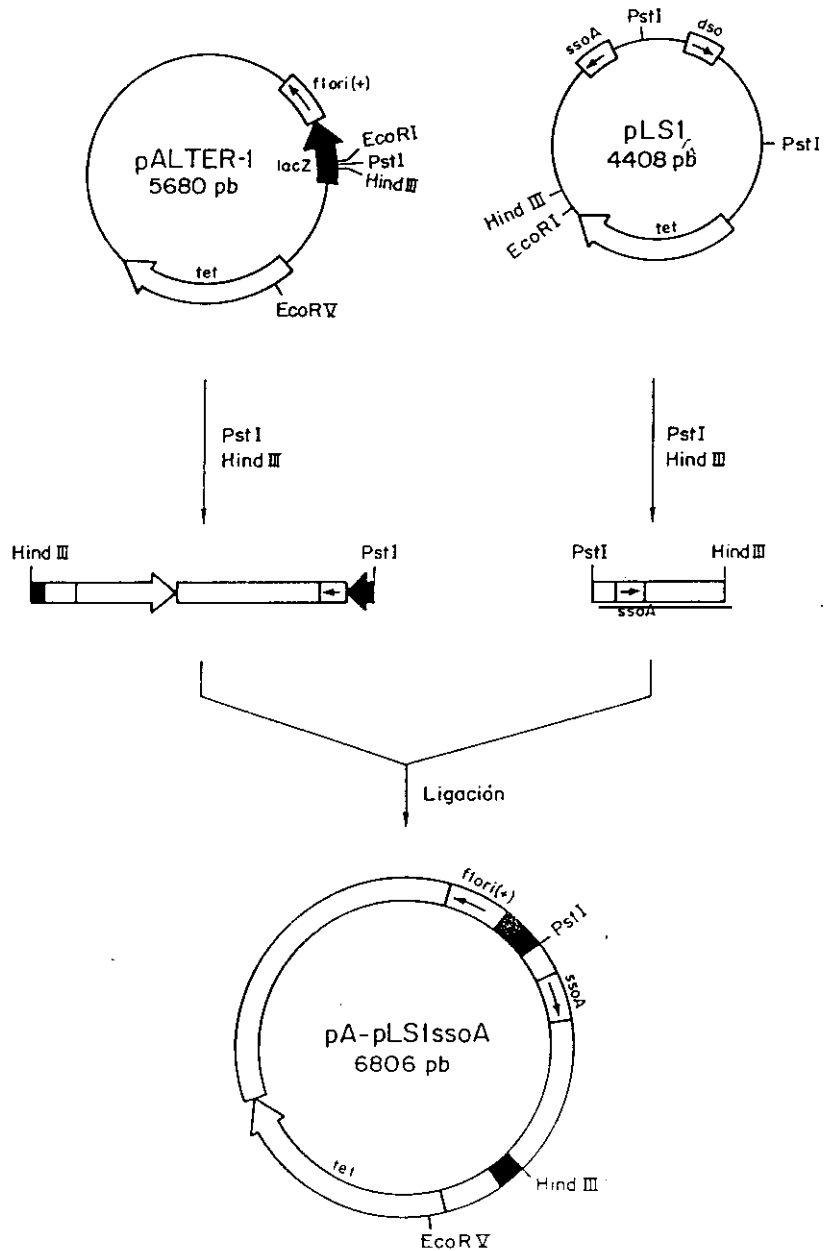
```

**Figura 25. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del *ssmA* de pLS1 y del *ssmA* de pE194. Se indican los nucleótidos idénticos entre ambos orígenes de replicación (\*). Las coordenadas del alineamiento son: pLS1 (4082 a 4240; Lacks y cols., 1986) y pE194 (632 a 802; Horinouchi y Weisblum, 1982a).**

### 3.1. El sistema de *Staphylococcus aureus*

Este sistema de replicación fue el primero que se ensayó, entre otras cosas, por disponerse de los protocolos de trabajo para el desarrollo del mismo (Birch y Khan, 1992). También se había puesto a punto un sistema de replicación *in vitro* de la cadena líder de pLS1 en *E. coli* (del Solar y cols., 1987b), pero como se sabía que la eficiencia de conversión ss → dsDNA a partir del *ssmA* de pLS1 es muy baja o nula en esta bacteria (del Solar y cols., 1987a), era poco adecuado para nuestros objetivos en un primer momento. Aunque nada se conocía acerca de la funcionalidad de este origen de replicación en *S. aureus*, se sabía que pE194, un plásmido perteneciente a la familia de pMV158 y original de este huésped, replicaba consecuentemente muy bien en él. Además, pE194 contiene una señal de conversión ss → dsDNA análoga al *ssmA* de pLS1 (Fig. 25). Así fue, que se decidió realizar los experimentos de replicación de la cadena complementaria de pLS1 empleando extractos libres de células de *S. aureus*. Para ello se utilizó la estirpe RN4220, por ser un mutante defectivo en el sistema restricción-modificación de la bacteria, lo que le permite aceptar DNA exógeno sin degradarlo. El ssDNA utilizado como sustrato se obtuvo a partir del fagémido recombinante pA-pLS1<sub>ssmA</sub> (pALTER-1 con el fragmento *Hind*III (3279) - *Pst*I (5) de pLS1 clonado en la orientación correcta; Fig. 26). Esta construcción presenta la señal *ssmA* de pLS1 clonada de tal forma que al generarse el ssDNA a partir del *dso* del vector,

por superinfección con un fago "helper", esta señal queda contenida en el elemento monocatenario y correctamente ubicada respecto a la dirección de replicación de la cadena retrasada plasmídica.



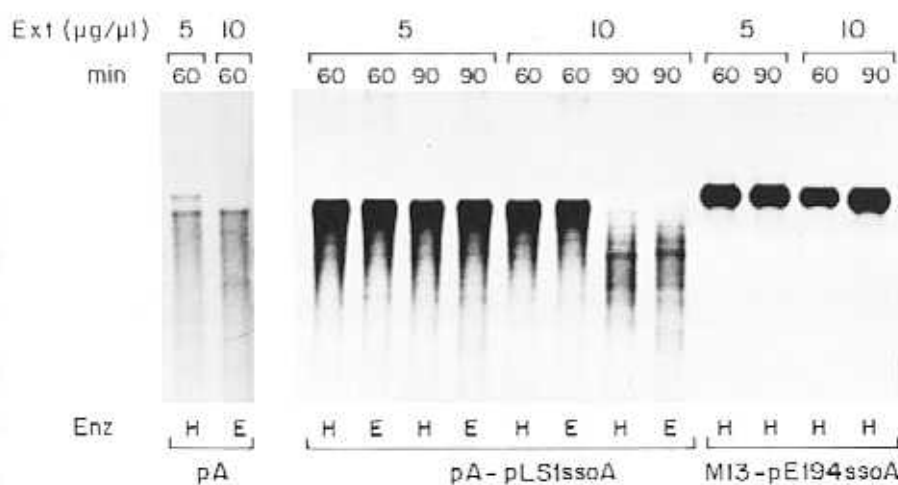
**Figura 26. Construcción del fagémido recombinante pA-pLS1ssoA.** Se digirieron 1  $\mu$ g del DNA de pALTER-1 y 3  $\mu$ g del DNA de pLS1 con los enzimas *PstI* y *HindIII*. Los productos de cada digestión se corrieron en un gel preparativo de agarosa 1%, a partir del cual se purificó el fragmento grande de pALTER-1 (5672 pb) y el fragmento pequeño *PstI* - *HindIII* de pLS1 (1134 pb). Ambos se mezclaron en una proporción 1:1 en moléculas y se trató con T4 DNA ligasa durante 16 h a 14 °C. Para la detección de los recombinantes se procedió igual que para la construcción de pA-pLS1ssoA' (ver Fig. 22). El sentido de la replicación a partir de cada uno de los orígenes representados (recuadro blanco) se indica con una flecha. Se muestra la dirección de transcripción de los genes (flechas anchas) y los sitios de restricción más relevantes. El gen *lacZ* queda inactivado como consecuencia de esta construcción.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 30  $\mu$ l conteniendo 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 16 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M NAD, 50  $\mu$ M cAMP, 200  $\mu$ M ATP, 50  $\mu$ M de GTP, UTP y CTP, 50  $\mu$ M de dATP (ó dCTP), dGTP y dTTP, 20  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (ó [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP) 10  $\mu$ Ci, 150 ng de ssDNA y la cantidad de extracto necesaria para obtener una concentración final de proteínas de 5 - 20  $\mu$ g/ $\mu$ l. La temperatura de incubación fue 32 °C. La reacción se detuvo y el DNA se extrajo de la preparación mediante fenolización y precipitación con etanol. Estos productos fueron tratados en algunos casos con enzimas de restricción y se visualizaron en geles de agarosa 0.8% o en geles de secuencia (8% PAA/8 M urea), según el caso.

### 3.1.1. Determinación de las mejores condiciones para la síntesis *in vitro* de la cadena complementaria de pLS1

El primer paso consistió en probar si el *ssoA* de pLS1 era eficientemente reconocido en el sistema de replicación *in vitro*, descrito por Birch y Khan (1992) para plásmidos de *S. aureus*. Si la síntesis de DNA tenía lugar, se debía optimizar el sistema para conseguir el mejor rendimiento para pLS1. La obtención de los sustratos ssDNA, así como la preparación de extractos acelulares de *S. aureus* y las reacciones básicas de replicación, se detallan en los apartados correspondientes de Métodos. Como control positivo, se llevó el ssDNA de un fago derivado de M13 en donde se había clonado la señal *ssoA* de pE194 (M13-pE194*ssoA*) y para el que ya se habían definido las condiciones de replicación de la cadena retrasada: la síntesis completa de esta cadena para 150 ng de ssDNA aislado de M13-pE194*ssoA* se consiguió al cabo de 60 minutos de reacción (a 32 °C) en una mezcla que contenía 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteínas del extracto (Dempsey y cols., 1995). Para determinar las condiciones necesarias para una ronda de replicación a partir del ssDNA de pA-pLS1*ssoA*, se probaron dos cantidades de extracto (5 y 10  $\mu$ g/ $\mu$ l) y dos tiempos de reacción (60 y 90 min). A continuación, el DNA producto de cada ensayo se purificó de la mezcla y se digirió con *HindIII*, con el fin de homogeneizar las diferentes formas plasmídicas (circulares abiertas, circulares cerradas, superenrolladas y/o lineales) generadas al completarse la síntesis de la cadena complementaria. En ambos casos, este enzima sólo tiene un sitio de restricción en el recombinante: en M13-pE194*ssoA*, *HindIII* corta a unos 150 pb "corriente abajo" de la zona desde donde se inicia la síntesis de la cadena retrasada (Dempsey y cols., 1995), mientras

que en pA-pLS1ssoA corta a unos 870 pb "corriente abajo" de esta región (ver más adelante). En este último caso, además se realizaron los mismos ensayos utilizando *EcoRV*, cuyo sitio de restricción se encuentra a unos 1450 pb del inicio de la replicación a partir de este *ssoA*. Los productos obtenidos fueron: una banda muy definida e intensa para M13-pE194ssoA y una banda algo más difusa, de intensidad similar para pA-pLS1ssoA (Fig. 27). Aquí, altas concentraciones de extracto (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y un elevado tiempo de reacción (90 min) perjudican la replicación, ya que el patrón de bandas observado tras la digestión con *HindIII* o *EcoRV* ponen de manifiesto la degradación del DNA. Ésta podría deberse al incremento en la mezcla de reacción de las DNasas presentes en el extracto y al mayor tiempo para que estas actuaran. Por otro lado, la replicación a partir del ssDNA procedente de pALTER-1 (pA, vector del *ssoA* de pLS1) es prácticamente nula, indicando que toda la replicación observada proviene del reconocimiento de la señal de conversión clonada en dicho vector.



**Figura 27.** Replicación *in vitro* a partir del *ssoA* de pLS1 y pE194 en el sistema de *S. aureus*. Para los ensayos de síntesis de la cadena complementaria (30  $\mu\text{l}$ ) se emplearon 150 ng del ssDNA aislado de pA-pLS1ssoA y de M13-pE194ssoA en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dATP (10  $\mu\text{Ci}$ ), utilizando diferentes concentraciones de extracto acelular (Ext). Al cabo de los tiempos indicados, se paró la reacción con 30  $\mu\text{l}$  de solución de parada (2% SDS, 50 mM EDTA y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinasa K). El DNA se purificó de la mezcla y se cortó con las enzimas *HindIII* (H) o *EcoRV* (E). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa 0.8% y se secó posteriormente al vacío para su exposición autorradiográfica. Como control se llevó el ssDNA aislado de pALTER-1 (pA).

Se puede concluir entonces, que el *ssmA* de pLS1, que actúa eficientemente como señal de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA *in vivo* en *S. pneumoniae*, es también reconocido por ciertos factores de *S. aureus*, *in vitro*, que permiten la conversión completa de la mayoría de las moléculas de ssDNA que contienen esta señal (pA-pLS1*ssmA*). Sin embargo, parece que la replicación a partir del *ssmA* de pE194 es más eficiente que desde el origen homónimo de pLS1, ya que, en las mismas condiciones, hay un número mayor de moléculas ssDNA de M13-pE194*ssmA* que completan la síntesis de la hebra complementaria de DNA (mayor definición de bandas), mientras que la difusión de las bandas de pA-pLS1*ssmA* podría ser indicativo de formas parcialmente bicatenarias producto de una replicación incompleta, que no desaparecen al aumentar la cantidad de proteínas del extracto ni el tiempo de reacción. Los mejores índices de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA desde el *ssmA* de pLS1, se consiguieron con 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto de *S. aureus* RN4220 y 60 min de reacción a 32 °C y coinciden con las condiciones previamente descritas para pE194, pT181 y pSN2 (Dempsey y cols., 1995). A no ser que se indique otra cosa, éstas han sido las condiciones empleadas en los experimentos de replicación que se describirán a continuación.

### 3.1.2. Efecto de las mutaciones en las regiones conservadas del *ssmA* de pLS1

Una vez definidas las condiciones óptimas para la replicación a partir del *ssmA* de pLS1, se procedió al análisis de los mutantes en donde se habían alterado (mediante sustitución o deleción de nucleótidos) las regiones conservadas de este origen. Para ello, se construyó una serie de fagémidos recombinantes similares a pA-pLS1*ssmA*, que contenían el fragmento *Hind*III (3279) - *Pst*I (5) de los derivados de pLS1 (pLS1X, pLS1 $\Delta$ 13, pLS1 $\Delta$ 14 y pLS1 $\Delta$ NA) con su *ssmA* alterado o delecionado, clonado en los correspondientes sitios de restricción en pALTER-1. Como en los casos anteriores, el ssDNA generado por estos fagémidos, contenía la señal de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA (mutagenizada) expuesta en la orientación correcta empleada para la replicación. Las reacciones de replicación se realizaron empleando estos ssDNA como sustrato. En cada caso, se corrió la mitad del DNA replicado por este sistema en un gel de agarosa 0.8% durante 12 h a 2.5 V/cm (Fig. 28) y la otra mitad se utilizó para cuantificar la radiactividad incorporada mediante unión del DNA marcado a filtros y precipitación diferencial con TCA (ver Métodos).

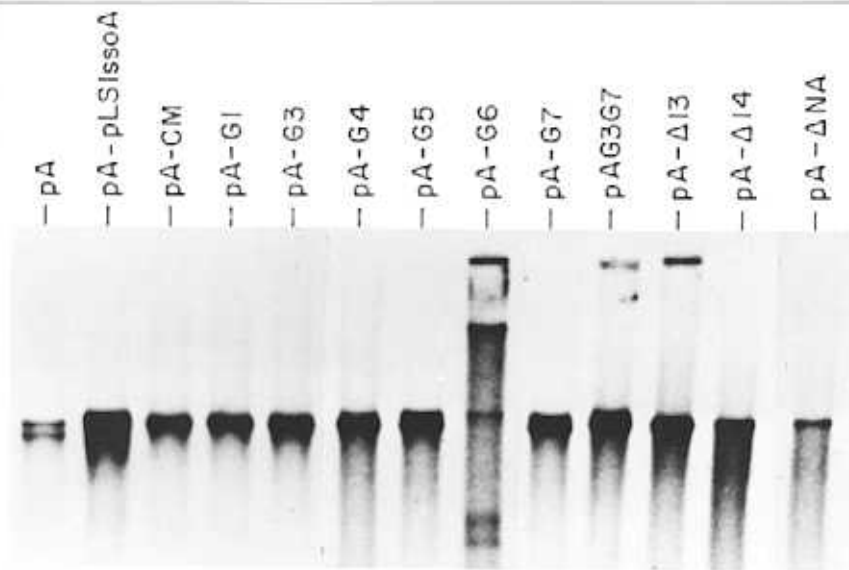


Figura 28. Replicación *in vitro* a partir de los *ssoA* mutagenizados de pLS1 en *S. aureus*. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 30  $\mu$ l que contienen 150 ng del ssDNA de los fagémidos recombinantes indicados y 5  $\mu$ g/ $\mu$ l de extracto proteico en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP (10  $\mu$ Ci). A los 60 min de incubación a 32  $^{\circ}$ C la reacción se detuvo con 30  $\mu$ l de solución de parada y los productos DNA se purificaron y digirieron con *Hind*III antes de someterlos a electroforesis en un gel de agarosa 0.8%. Se muestra el autorradiograma del gel secado al vacío.

El valor de incorporación de nucleótidos marcados al ssDNA (indicativo de la eficiencia de síntesis de la cadena complementaria) fue muy similar para todos los mutantes no delecionados (pA-X) y correspondió aproximadamente a la mitad de la radiactividad incorporada por el fagémido recombinante que contenía el *ssoA* silvestre (no se muestra). Por otro lado, los derivados delecionados (pA- $\Delta$ 13 y pA- $\Delta$ 14) presentaron un nivel más bajo de los productos de replicación, de forma proporcional a la extensión de la deleción. En pA- $\Delta$ NA, donde la región *Afl*III (4022) - *Nco*I (4221) que comprende el *ssoA* de pLS1 se halla totalmente ausente, sólo se detectaron niveles basales de replicación, semejantes a los presentados por el vector solo (pA en Fig. 28). Estos resultados indican que, al igual que lo que sucedía en *S. pneumoniae*, el reconocimiento del *ssoA* de pLS1 en *S. aureus* es específico y no existen regiones alternativas eficientes de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA en los fragmentos *Hind*III(3279) - *Afl*III(4022) ni *Nco*I(4221) - *Pst*I(5), en este huésped. Sin embargo, los resultados anteriores eran bastante curiosos, ya que también se esperaba una

correspondencia con los datos obtenidos *in vivo* para *S. pneumoniae* (es decir, una marcada reducción en los niveles de replicación a partir de los orígenes con mutaciones en la región RS<sub>B</sub> en relación a los que contenían alterada la región CS-6 del *ssoA*). Sin embargo, en *S. aureus* los datos indican que la eficiencia de replicación a partir de los ssDNA conteniendo cada uno de los derivados mutagenizados del *ssoA* de pLS1 es muy parecida y sólo existe una diferencia significativa respecto a los derivados delecionados de éste.

Un caso hasta ahora inexplicable, lo representa la mutación G6 (total apareamiento de las regiones desapareadas del RS<sub>B</sub>; Fig. 21). El fragmento de DNA que contiene dicha mutación es incapaz de actuar como señal de conversión ss → dsDNA *in vitro* en el sustrato monocatenario correspondiente (pA-G6). Esta mutación determina además, que pLS1G6 no se pueda establecer en *S. aureus* indicando que este plásmido es incapaz de replicar en dicho huésped (ver más adelante).

### 3.1.3. Mecanismo de iniciación de la cadena retrasada de pLS1 en *S. aureus*

Para comprobar si la RNAP de *S. aureus* estaba implicada en la síntesis de cebadores para la replicación de la cadena complementaria de pLS1 como sucede en *S. pneumoniae*, se probó la replicación a partir del ssDNA aislado de pA-pLS1ssoA en presencia de Rif y/o en ausencia de rNTPs, usando el sistema de replicación *in vitro* de *S. aureus*. La Rif se añadió a una concentración de 100 µg/ml, antes de agregar el extracto proteico y los ensayos sin rNTPs se realizaron con un tampón de reacción que carece de UTP, CTP y TTP, manteniendo el resto de sus componentes básicos. Como control se llevó el ssDNA aislado de M13-pE194ssoA, en donde ya se había demostrado la necesidad de la RNAP para iniciar la síntesis de la cadena retrasada (Dempsey y cols., 1995). Los productos obtenidos de cada reacción se linealizaron con *HindIII* y se corrieron en un gel de agarosa 0.8% durante 12 hs a 2.5 V/cm, que se secó posteriormente al vacío para su exposición autorradiográfica. En ambos casos, la síntesis de la cadena complementaria se vio afectada por la ausencia de rNTPs o por la adición de Rif, ya que el grado de replicación a partir de estos sustratos ssDNA descendió notablemente, sobre todo en las preparaciones que contenían Rif (Fig. 29). En los ensayos donde se suprimió la adición de rNTPs se pudo observar cierto grado de

incorporación de nucleótidos marcados durante la síntesis de DNA, que probablemente se debiera a la presencia de ribonucleótidos en el extracto empleado.

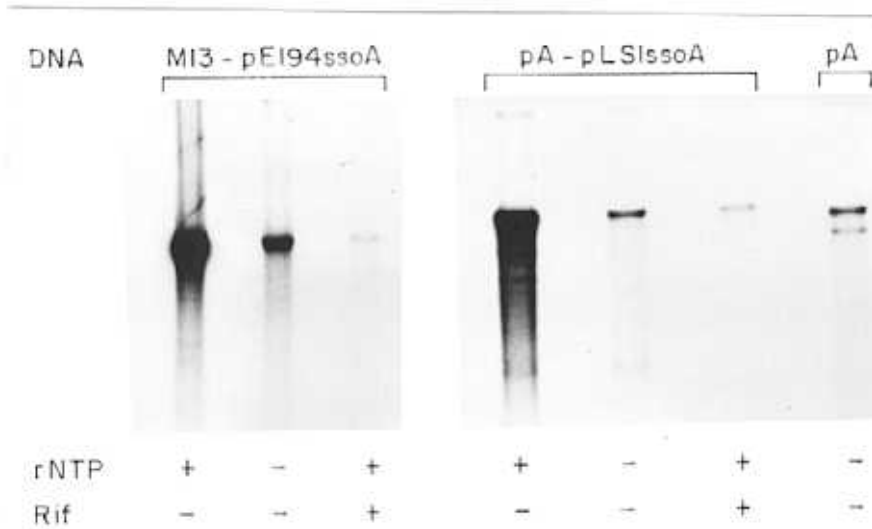
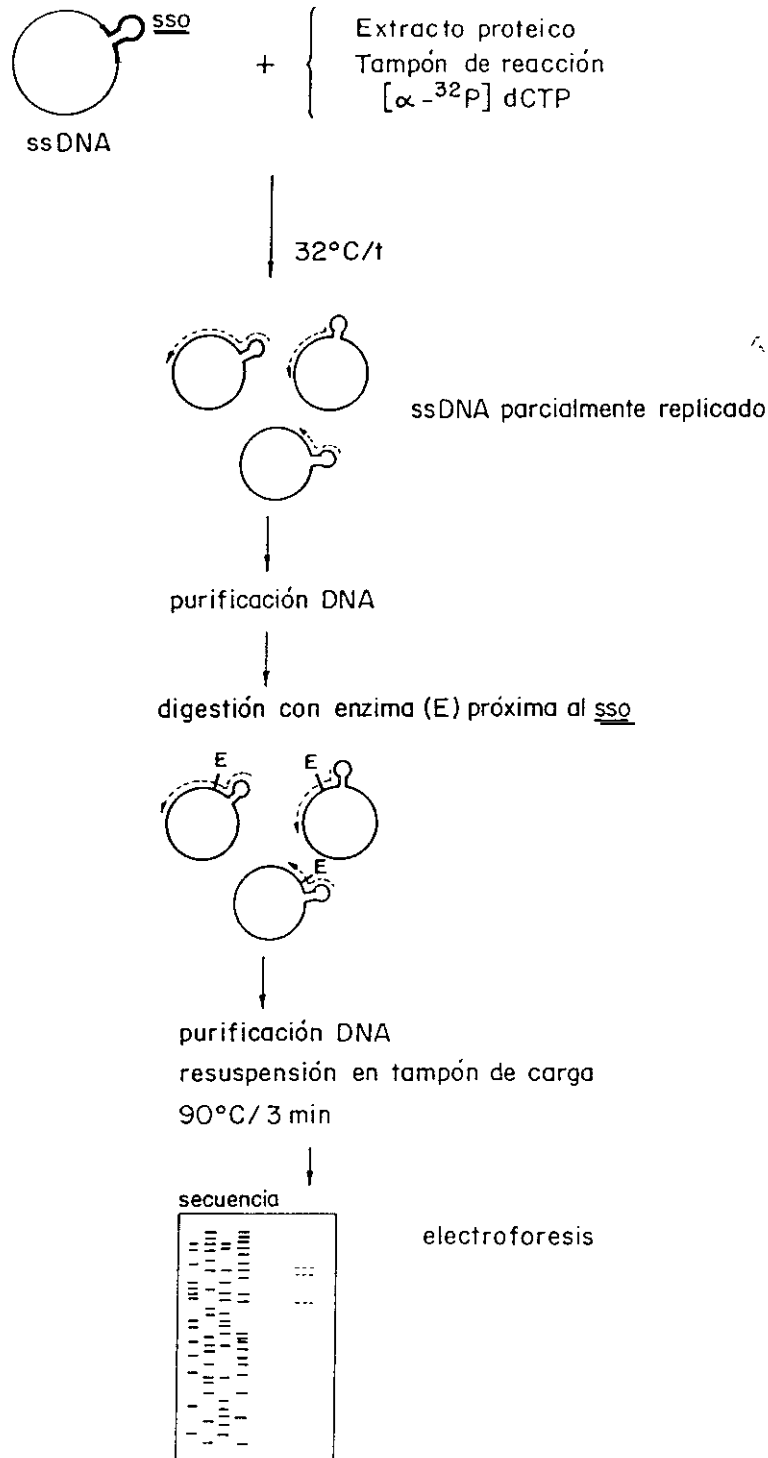


Figura 29. Efecto de la rifampicina o ausencia de rNTPs en la síntesis de la cadena retrasada de pLS1 y pE194. Se empleó el sistema de replicación *in vitro* de *S. aureus*. Los ssDNA aislados de pA-pLS1ssoA, M13-pE194ssoA y pALTER-1 (pA) se incubaron junto con 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto proteico y el tampón de reacción correspondiente con (+) o sin (-) rNTPs en presencia de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP (10  $\mu\text{Ci}$ ). Se agregó (+) o no (-) rifampicina (Rif) a las muestras indicadas. Los productos DNA se purificaron y digirieron con *Hind*III antes de someterlos a electroforesis en gel de agarosa. Se presenta el autorradiograma del gel secado al vacío.

### 3.1.4. Especificidad de inicio de la cadena retrasada a partir del *ssoA*

Los datos obtenidos hasta ahora nos proveen información acerca de la eficiencia de replicación de la cadena retrasada, pero no sobre la especificidad del proceso de iniciación de la misma. Nos interesaba saber entonces si, a pesar de no haber diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de replicación de la hebra complementaria en los derivados mutagenizados del *ssoA* de pLS1, existía al menos, alguna particularidad relativa a la especificidad de inicio de esta cadena a partir de ellos. En primer lugar, se determinaron los sitios de iniciación de la cadena complementaria de pLS1 a partir del *ssoA* silvestre y a continuación, se determinaron los sitios de iniciación en los derivados mutagenizados de éste. Para ello, se empleó el sistema de replicación de *S. aureus* utilizando como sustrato el



**Figura 30. Esquema del experimento base para determinar los puntos de iniciación de la cadena retrasada.** El ssDNA que se utiliza como sustrato lleva clonado el *sso* del plásmido que se desea estudiar. El ensayo de replicación *in vitro* de la cadena complementaria se realiza como en los casos anteriores. La cantidad de extracto proteico, el tiempo de incubación y los enzimas de restricción empleados son específicos en cada caso. Luego del tratamiento enzimático, cada muestra de DNA se fenoliza, precipita y desnatura por calentamiento antes de cargar en el gel de secuencia (6% PAA/8 M urea). Como control de peso molecular se lleva una secuencia de nucleótidos conocida. La cantidad y tamaño de las bandas (líneas punteadas) que aparecen separadas en el gel representan el o los puntos de iniciación de la cadena retrasada. La posición de los mismos se puede calcular sobre la secuencia de DNA del plásmido correspondiente (ver texto).

ssDNA aislado de los fagémidos recombinantes correspondientes. Con el fin de realizar un estudio comparativo se llevaron, a modo de control, los mismos ensayos descritos por Dempsey y cols. (1995) para determinar los sitios de iniciación de la cadena retrasada a partir del *ssoA* de pE194. En la Figura 30 se presenta un esquema del experimento generalizado para tal efecto. Este experimento se basa en conseguir la mayor cantidad posible de moléculas ssDNA parcialmente replicadas, en donde sólo se debe elegir el tiempo adecuado de reacción para que la conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA no llegue a completarse mediante la ligación de la cadena recién sintetizada. Estas moléculas se digieren posteriormente con un enzima de restricción que contenga un único sitio de corte en el DNA sustrato, próximo a la región del *ssoA* y ubicado en la dirección empleada por la replicación, obteniéndose fragmentos lineales parcialmente bicatenarios. La hebra de DNA recién sintetizada (y por lo tanto marcada radiactivamente) presente en estos fragmentos, se puede visualizar en un gel desnaturizante de PAA, en donde el tamaño y la definición de las bandas darán una idea acerca de los puntos de iniciación de la cadena complementaria a partir del *sso* estudiado. Para fragmentos definidos, su extremo 3' corresponderá al sitio de restricción conocido y el extremo 5' se remontará al sitio del DNA desde donde se ha iniciado su síntesis. El enzima empleado para el análisis de la replicación desde el *ssoA* de pLS1 y sus derivados fue *Afl*III, ya que su sitio de corte define este origen hacia la izquierda, coincidiendo con la dirección de la replicación a partir del mismo. Una vez que la síntesis de la cadena complementaria tiene lugar en la única dirección posible (5'  $\rightarrow$  3') debe pasar por el sitio *Afl*III para así continuar la replicación hasta el final. Por lo tanto, el corte con este enzima y posterior tratamiento electroforético de los fragmentos de DNA resultantes dará lugar a productos de replicación marcados, cuyos tamaños corresponden a la distancia entre los sitios de iniciación y el sitio de restricción. Para la determinación de los sitios de iniciación de la cadena retrasada a partir del *ssoA* de pE194, el enzima utilizado fue *Hind*III (Dempsey y cols., 1995).

Para realizar este experimento había que elegir en primer lugar, el tiempo de reacción que permitiera conseguir un máximo número de moléculas del sustrato ssDNA parcialmente replicadas. Si el tiempo de incubación era demasiado largo y la síntesis de la cadena complementaria se completaba, al cortar con el enzima de restricción y correr los productos en el gel desnaturizante de PAA, se obtendrían moléculas del tamaño total del sustrato, en

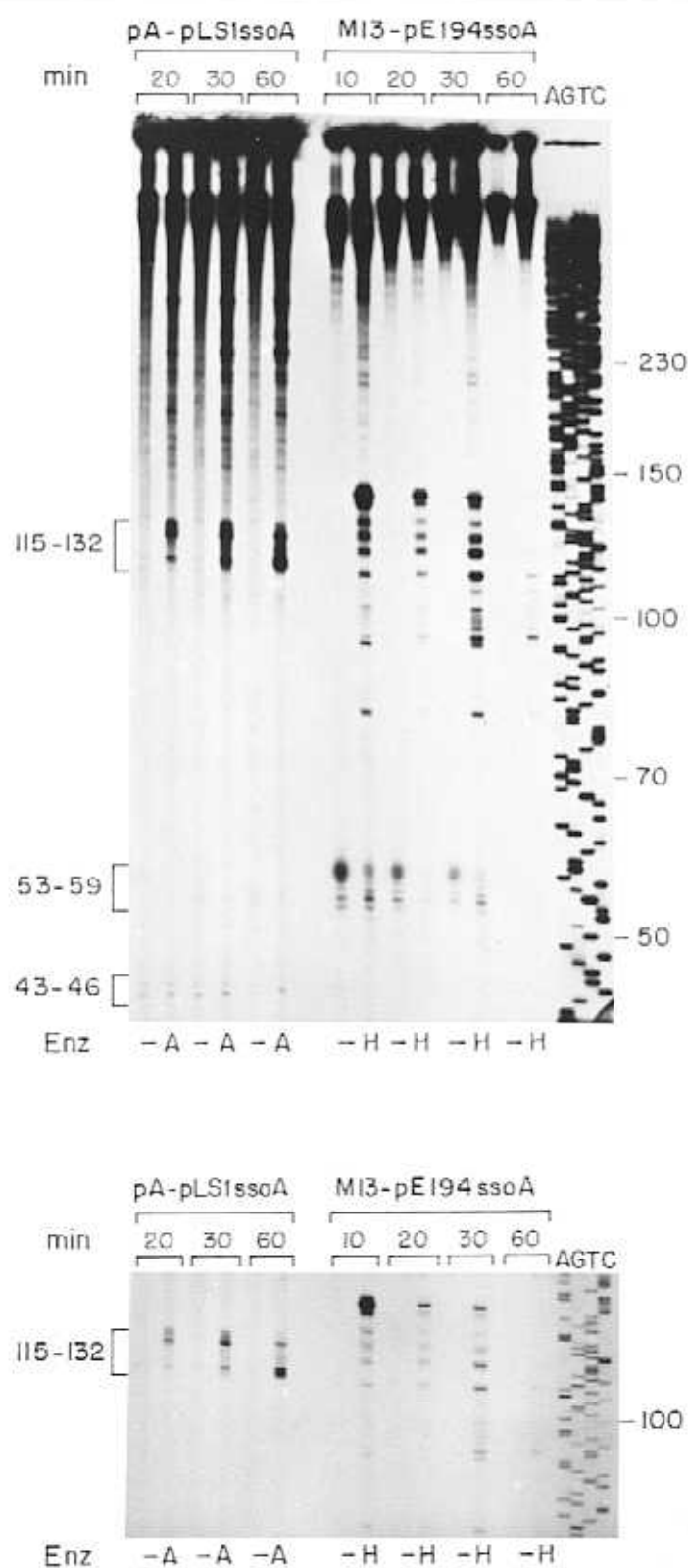
el caso que ambos extremos de la cadena recién sintetizada ya hubiesen sido ligados por las ligasas del extracto. Por otro lado, el tiempo de reacción debía ser suficiente para que la síntesis de la nueva cadena de DNA llegase hasta el sitio de restricción correspondiente. Este estudio se llevó a cabo para el *ssoA* de pLS1, en donde se determinó el grado de replicación a diferentes tiempos utilizando el ssDNA de pA-pLS1ssoA. Para ello se procedió según el protocolo general de síntesis *in vitro*, pero partiendo de un volumen de reacción 7 veces mayor que el de una reacción individual, es decir de 210  $\mu$ l y una cantidad de ssDNA correspondiente (1  $\mu$ g). Al cabo de los tiempos de incubación indicados en la Figura 31 se extrajeron muestras de 30  $\mu$ l a las que se agregó rápidamente un volumen igual de solución de parada (50 mM EDTA, 2% SDS, 25  $\mu$ g/ml Proteinasa K). El DNA producto de cada reacción se corrió en un gel de agarosa 0.8% sin digestión enzimática previa. Los resultados indicaron que al cabo de 40 min todas las moléculas ssDNA de pA-pLS1ssoA se encuentran totalmente replicadas (Fig. 31). Como las muestras no se linealizaron previo a la corrida electroforética, se observó un barrido correspondiente a las diferentes formas adoptadas por el dsDNA circular. Se necesitan alrededor de 20 min para que la mayoría de las moléculas ssDNA se encuentren parcialmente duplicadas. Para la replicación a partir del *ssoA* de pE194 se había definido el tiempo correspondiente, en 15 min (Dempsey y cols., 1995).



**Figura 31.** Replicación a partir del *ssoA* de pLS1 a diferentes tiempos. Se empleó el sistema de replicación *in vitro* de *S. aureus* como en los casos anteriores, pero partiendo de un volumen de reacción y cantidad de ssDNA correspondiente a los 7 ensayos presentados (210  $\mu$ l y 1  $\mu$ g, respectivamente). Se incubó a 32 °C y a los tiempos indicados se retiraron muestras de 30  $\mu$ l y se paró la reacción con otros 30  $\mu$ l de solución de parada. El DNA se purificó y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.8% sin digestión enzimática previa.

Para comprobar el efecto del tiempo de reacción en la especificidad de síntesis de la cadena retrasada, se determinaron los puntos de inicio de la replicación a partir del *ssoA* de pLS1 tomando muestras a intervalos de tiempo diferentes y siguiendo el esquema experimental comentado anteriormente (Fig. 30). Se llevaron también las correspondientes reacciones de síntesis a partir del *ssoA* de pE194. La mitad del DNA producto de cada reacción se digirió con *AfIII* (para pA-pLS1*ssoA*) o *HindIII* (para M13-pE194*ssoA*); la otra mitad se llevó como control sin digerir y cada una de estas muestras se sometió a electroforesis en un gel de 8% PAA/8 M urea. Sólo se consideraron específicas las bandas de DNA procedentes de la digestión enzimática, mientras que las bandas que aparecían en ambas muestras se consideraron como productos de iniciación inespecífica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

Los productos generados a partir del *ssoA* de pLS1 tras el corte con *AfIII* consisten en un grupo de bandas muy definidas de tamaños comprendidos entre 115 y 132 nt, que corresponden al menos a seis puntos de iniciación específicos de la cadena complementaria, localizados próximo a la secuencia CS-6 y a las repeticiones directas contenidas en este origen (ver Fig. 40) Para determinar la localización de los sitios de iniciación, sólo se necesita contar desde el sitio *AfIII* y hacia el extremo 5' de la secuencia de pLS1 sobre la cadena (-), el número de nucleótidos que corresponden al tamaño de las bandas generadas. En el caso de pE194 también aparecen múltiples bandas asociadas a diferentes puntos de iniciación de la cadena complementaria. Aunque en este caso el patrón es algo diferente, la localización mayoritaria de iniciación coincide con la de pLS1, es decir, próximo a una secuencia homóloga a CS-6 presente en el *ssoA* de pE194 (Dempsey y cols., 1995; ver Discusión). Los productos de replicación no digeridos consisten fundamentalmente en una serie de moléculas de gran tamaño, aunque también se puede ver una proporción de productos pequeños, tanto en las muestras que contienen el *ssoA* de pLS1 como de pE194 (de 43 a 46 nt para el primero y de 53 a 59 nt para el segundo). Estos fragmentos, que también son evidentes en las muestras digeridas, habían sido interpretados como moléculas que no habían alcanzado el sitio de restricción correspondiente (Dempsey y cols., 1995). El tamaño tan definido de estas pequeñas bandas podría deberse a la existencia de una estructura o secuencia especial en el origen que fuese difícil de ser atravesada por las DNA polimerasas del extracto, induciendo la detención temporal de las mismas.



**Figura 32.** Sitios de iniciación de la cadena complementaria de pLS1 y pE194 en *S. aureus*. Los ssDNA que contienen el *ssxA* de pLS1 (pA-pLS1ssoA) o de pE194 (M13-pE194ssoA) se utilizaron como sustrato para los ensayos de replicación *in vitro* de la cadena retrasada. A los tiempos indicados se detuvo la reacción y el producto DNA se purificó, digiriéndose la mitad con *AfIII* (A) o *HindIII* (H). Las muestras tratadas o sin digerir (-) se sometieron a electroforesis en un gel desnaturizante de PAA (6% - 8 M urea). Como control de peso molecular se llevó una secuencia de DNA de M13mp18 (AGTC). Los números indican el tamaño en nucleótidos de las bandas señaladas. En la parte inferior de la figura se muestra la región del gel correspondiente a las bandas que contienen el sitio de iniciación de la cadena retrasada, en un autorradiograma poco expuesto donde puede apreciarse una mejor definición de las mismas.

Estos datos permiten concluir que la iniciación de la replicación a partir del *ssoA* de pLS1 y de pE194 en *S. aureus* es específica y abarca un pequeño rango en la secuencia nucleotídica de ambos plásmidos, ya que existen varios puntos para la iniciación de la cadena complementaria. El cambio observado en la intensidad de las bandas mayoritarias con el transcurso del tiempo podría tener dos explicaciones. Como se ve en la Figura 32, a medida que pasa el tiempo, las bandas más pequeñas van adquiriendo mayor intensidad mientras que las mayores se hacen cada vez menos intensas. Dado que la RNAP de *S. aureus* sintetiza los RNA cebadores para la síntesis de la cadena complementaria de pLS1 (ver apartado anterior) y de pE194 (Dempsey y cols., 1995), una posible explicación sería que los fragmentos de mayor tamaño presentes sobre todo a intervalos cortos de tiempo (10 y 20 min) representasen al híbrido pRNA-DNA y que, en las bandas menores, este RNA se encontrase degradado. A tiempos próximos a los 60 min, todas las moléculas ya no serían híbridas y presentarían el tamaño menor. Esta posibilidad es improbable, ya que el tratamiento del DNA producto de una reacción de 20 min con RNasa A, RNasa H o álcali (después de su desnaturalización por calentamiento), no alteró el patrón de bandas observado (no se muestra para pLS1; Dempsey y cols., 1995 para pE194). Este dato permite concluir, sin embargo, que los puntos de iniciación de la cadena complementaria mapeados en este experimento corresponden a los puntos de transición de pRNA a DNA, ya que carecen del "primer".

Otra explicación sería que, a medida que pasa el tiempo, el extremo 5' de los fragmentos más largos se ligasen más rápidamente al extremo 3' del DNA recién sintetizado que los fragmentos menores, consiguiéndose así la síntesis completa de esta cadena. Estas moléculas circulares, tras la digestión con el enzima de restricción se retendrían junto con las moléculas de gran tamaño presentes en la zona próxima a los pocillos del gel y esto permitiría visualizar durante más tiempo los fragmentos más cortos. Sin embargo, esta explicación es también poco probable, ya que la velocidad de síntesis del DNA es muy alta y la diferencia de unos pocos nucleótidos entre unas y otras bandas no sería suficiente para explicar esta situación de forma satisfactoria. Por lo tanto, no parece existir una explicación simple para el cambio en el patrón del tamaño de estas bandas con el transcurso del tiempo de reacción.

### 3.1.5. Iniciación de la cadena complementaria a partir de los derivados mutagenizados del *ssOA*

Para determinar el efecto de las mutaciones en las regiones conservadas del *ssOA* de pLS1 en la especificidad de inicio de la cadena retrasada del plásmido, se realizó una segunda serie de experimentos utilizando como sustrato el ssDNA procedente de algunos de los fagémidos recombinantes que contenían cada una de estas secuencias alteradas (pA-G1, pA-G3, pA-G5, pA-G7, pA-G3G7). Como control, se llevó el mismo ensayo de replicación con el ssDNA aislado de pA-pLS1*ssOA*. El tiempo de reacción empleado fue 20 min, ya que era el tiempo en que la mayoría de las moléculas ssDNA se encontraban parcialmente replicadas. El mutante G6 y los derivados con una delección total o parcial del *ssOA* no se emplearon como sustrato para estos ensayos, dada la falta o baja funcionalidad registrada en este sistema de replicación. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 33. Las bandas conseguidas tras la digestión con *Afl*III del DNA que lleva las mutaciones en el *ssOA*, cuando se observan, son menos intensas que las bandas procedentes de la replicación a partir del origen silvestre. En el caso de los mutantes en la región CS-6 (pA-G1 y pA-G3) todavía pueden verse, en autorradiografías sobreexpuestas, algunas bandas definidas (Fig. 33, abajo). Ésto indica que la especificidad de inicio de la cadena retrasada es muy baja y algo diferente para esta clase de mutantes. Por otro lado, los mutantes en RS<sub>B</sub> ensayados muestran un patrón de bandas prácticamente invisible, incluso en autorradiografías muy expuestas, a excepción de G7 (cambios en la secuencia que mantienen casi inalterada la estructura local del RS<sub>B</sub>). En este caso, el patrón específico de bandas es muy parecido al obtenido a partir del *ssOA* silvestre, aunque es mucho menos intenso. El doble mutante G3G7 carece totalmente de especificidad de inicio. Se puede concluir entonces, que en *S. aureus*, cambios locales en el *ssOA* de pLS1 que afecten la estructura y/o la secuencia de las dos regiones conservadas, disminuyen y/o alteran bastante la iniciación específica de la cadena retrasada a partir de esta señal.

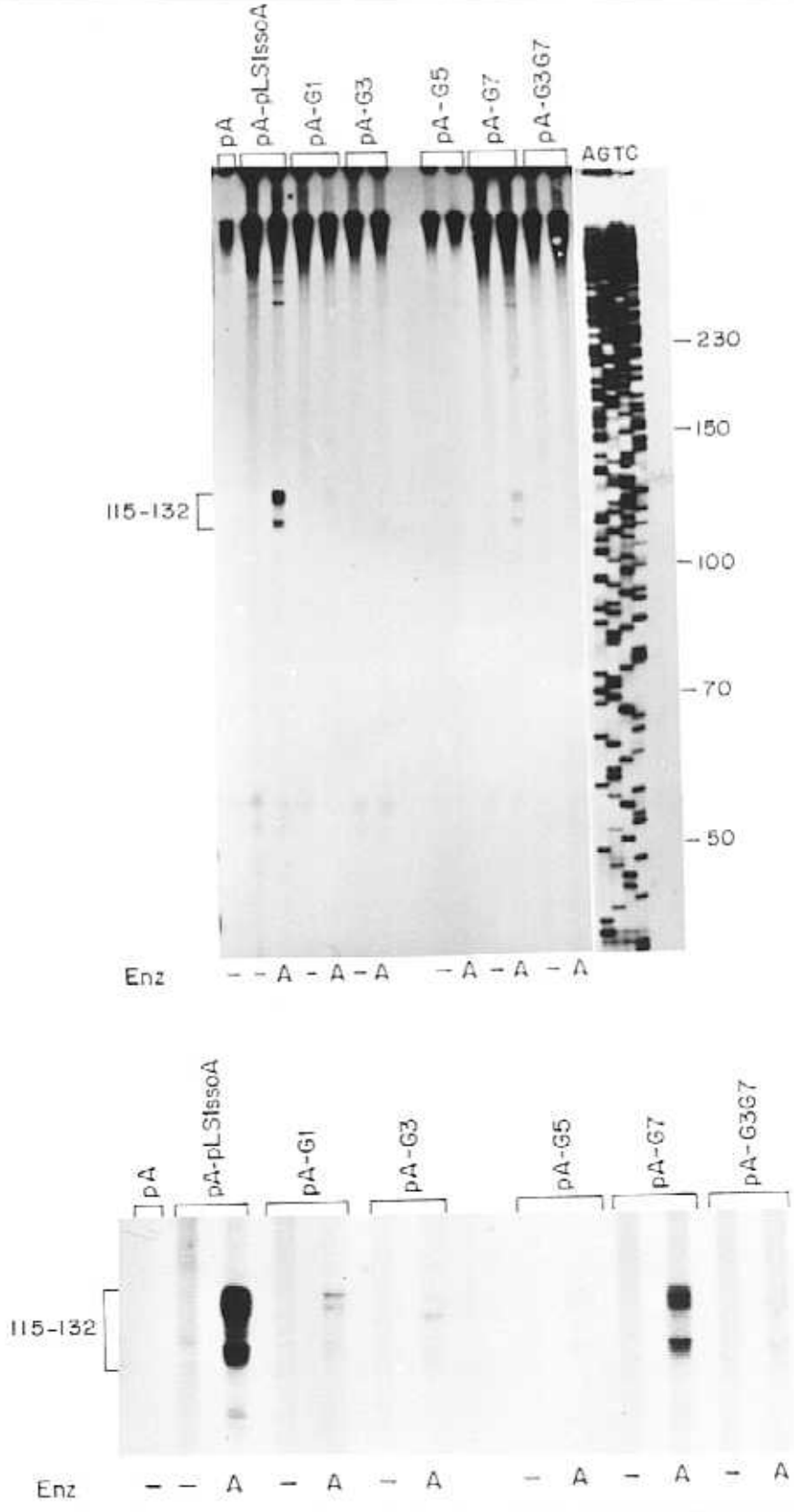


Figura 33. Iniciación de la cadena retrasada a partir de los derivados mutagenizados del *ssoA* de pLS1 en *S. aureus*. Se empleó el sistema de replicación *in vitro* de *S. aureus* utilizando como sustrato 150 ng del ssDNA que lleva el *ssoA* silvestre (pA-pLS1ssoA) como control positivo, 150 ng del ssDNA de pALTER-1 (pA) como control negativo, y 150 ng del ssDNA que lleva algunos derivados mutagenizados del mismo (pA-G1, pA-G3, pA-G5, pA-G7 y pA-G3G7). A los 20 min de incubación se paró la reacción y el DNA purificado de cada ensayo se digirió (A) o no (-) con el enzima *Afl*III antes de someterlo a electroforesis en un gel de 6% PAA/8 M urea. Se llevó una secuencia de M13mp18 como control de peso molecular (AGTC). Los números indican el tamaño en nucleótidos de las bandas señaladas. Para ver con más detalle el comportamiento de los mutantes, se amplió la región de una autorradiografía sobreexpuesta del gel que contiene las bandas con los sitios de iniciación de la cadena retrasada en cada caso (abajo).

### 3.1.6. Eficiencia de replicación *in vivo* de la cadena retrasada de pLS1 y sus derivados.

Con el fin de establecer una relación entre los resultados obtenidos *in vitro* en el sistema de replicación de *S. aureus*, con los correspondientes datos *in vivo*, se electroporaron células competentes de esta bacteria con 10 ng del DNA de pLS1, pLS1X, pLS1Δ13, pLS1Δ14, pLS1ΔNA y pLS1ΔHA. No se obtuvo ningún transformante con el plásmido pLS1G6, pese a que se realizaron varios intentos, incluso con cantidades muy elevadas de DNA plasmídico (100 ng y 500 ng). Ésto indica que, por razones aún desconocidas, esta mutación confiere un fenotipo letal a la mutación G6 en *S. aureus*. Para determinar la cantidad de ssDNA plasmídico acumulado en este huésped, se crecieron los cultivos conteniendo el plásmido pLS1 y los derivados mencionados hasta la mitad de su fase exponencial ( $DO_{600} = 0.6$ ). Con ellos se prepararon extractos crudos y el DNA total se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa, previo tratamiento desnaturalizante del mismo. Las diferentes formas plasmídicas presentes en cada muestra se visualizaron mediante hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Como control, se llevaron muestras de DNA total preparadas a partir de cultivos de estafilococos conteniendo dos plásmidos derivados de pE194 (pSK270 y pE194cop6) de los cuales se sabía que su *ssdA* era perfectamente funcional en esta bacteria. Las distintas formas del DNA de estos plásmidos se visualizaron con una sonda radiactiva de pE194. La relación ss/dsDNA calculada para ambos replicones fue menor que la de pLS1, indicando que el *ssdA* de pLS1 es reconocido con menor eficiencia que el de pE194, en *S. aureus*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se esperaba que, a diferencia de lo que sucedía en *S. pneumoniae* (distinto grado de acumulación de ssDNA plasmídico según la región del *ssdA* mutagenizada), el efecto de las mutaciones en este origen fuese similar en todos los casos. Ésto fue efectivamente lo que se observó, ya que el grado de acumulación de ssDNA de cada uno de los plásmidos pLS1X ensayados fue el mismo, independientemente de la región alterada (Fig. 34). Por otro lado, el nivel de ssDNA acumulado por pLS1ΔHA (carece del fragmento *HindIII* - *AflIII* de pLS1, pero mantiene la señal *ssdA* intacta) es mayor que el de pLS1 y que del resto de sus derivados. Ésto podría indicar que el fragmento delecionado contiene alguna región que favorece la

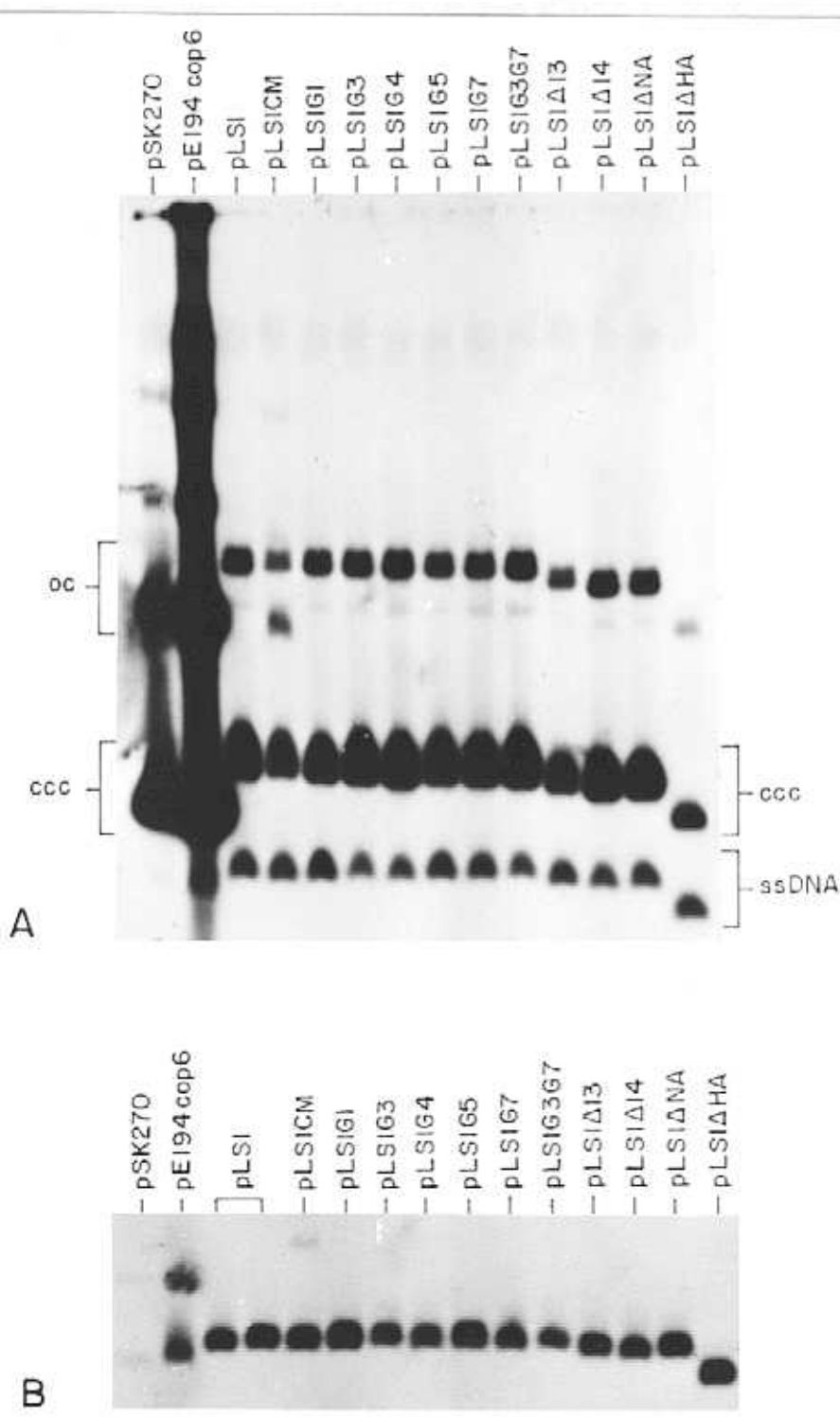


Figura 34. Acumulación de ssDNA de pLSI y sus derivados en *S. aureus*. El DNA total de cultivos de estafilococos que contienen los plásmidos indicados se corrió en un gel de agarosa 0.7% y se transfirió a nitrocelulosa con (A) o sin (B) previa desnaturalización. Como control se llevaron los plásmidos pSK270 (pE194 con el sitio de clonado múltiple de pUC19) y pE194cop6 (mutante de copias de pE194 en este huésped). Las muestras se visualizaron por hibridación con una sonda radiactiva de pLSI y pE194, dado que no existe hibridación cruzada entre ambos plásmidos en las condiciones usadas. Se indican las posiciones de las formas plasmídicas monocatenarias (ssDNA) y bicatenarias (oc: circulares abiertas y ccc: circulares covalentemente cerradas y superenrolladas).

actuación del origen de hebra sencilla o, que allí exista alguna señal de conversión ss → dsDNA de pLS1 que sólo sea reconocida en la célula viva. Basándonos en los datos que se tenían de la replicación *in vitro* (ver Fig. 28), se esperaba que existiera un nivel intracelular de ssDNA mayor para los mutantes que presentaban la delección parcial o total del *ssaA*. Contrariamente a nuestras expectativas, no se observó diferencia alguna, que fuese significativa, entre el grado de acumulación de ssDNA de pLS1 y el de pLS1Δ13, pLS1Δ14 y pLS1ΔNA. En conjunto, estos datos indican que no existe una relación clara entre la eficiencia de replicación *in vitro*, la especificidad de iniciación de la cadena retrasada y la acumulación de ssDNA *in vivo* de cada uno de estos plásmidos en *S. aureus*. Esta cuestión se tratará con más detalle en la Discusión.

### 3.2. El sistema de *Streptococcus pneumoniae*

Los resultados obtenidos de los ensayos de replicación *in vitro* a partir del *ssaA* de pLS1 y sus derivados indicaron un claro efecto de las mutaciones generadas en este origen en el proceso de iniciación específica de la cadena complementaria en *S. aureus*. Sin embargo, el nivel de replicación total, tanto *in vivo* (medido como acumulación de formas ssDNA plasmídicas) como *in vitro*, no permitió distinguir un comportamiento replicativo diferente entre las distintas clases de mutantes. Por el contrario, los datos que se tenían del grado de acumulación de ssDNA de estos plásmidos en *S. pneumoniae* revelaba un comportamiento diferente según la región del *ssaA* que estuviese alterada en cada replicón. Este hecho ponía de manifiesto la existencia en pneumococos de un mecanismo de replicación de la cadena retrasada más sensible al tipo de mutación introducida. Con el fin de comprender mejor las diferencias existentes entre los mecanismos empleados por ambos huéspedes para la replicación de pLS1, se decidió poner a punto un sistema de replicación *in vitro* de *S. pneumoniae*.

#### 3.2.1. Preparación de extractos libres de células de *S. pneumoniae*

En primer lugar, había que elaborar un procedimiento para preparar extractos

acelulares de pneumococos con un alto contenido de las enzimas necesarias para la replicación plasmídica. Como también se requería que estas proteínas estuvieran en su mayor parte activas, se evitó el tratamiento clásico con deoxicolato sódico (Na-DOC, detergente suave que induce la lisis endógena en *S. pneumoniae*) para romper la pared celular de esta bacteria y se puso a punto un sistema de lisis enzimática, utilizando autolisina pura. Al igual que en todas las bacterias gram(+), la pared celular de *S. pneumoniae* se compone de una gruesa capa de peptidoglicano, a la cual se encuentran asociadas algunas enzimas (sidasas, amidasas, endopeptidasas) encargadas de degradar pequeñas porciones de la estructura rígida de la pared, durante diversos procesos fisiológicos (crecimiento celular, separación de células hijas, transformación genética). Además del peptidoglicano, la pared celular de pneumococos contiene un alto porcentaje en ácidos teicoicos, que poseen residuos de colina como sustituyente más frecuente (Mosser y Tomasz, 1970). El enzima autolítico mayoritario en esta bacteria es una N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (denominada comúnmente, autolisina), que depende de la presencia de colina en la pared celular para adquirir su conformación activa, reconocer su sustrato y ejercer su acción degradativa sobre la capa de peptidoglicano celular (Howard y Gooder, 1974; García-Bustos y Tomasz, 1987). Se sabe que este enzima puede actuar de forma exógena, ya que es el principal responsable de la lisis bacteriana cuando ésta alcanza una etapa avanzada de su fase exponencial. Por lo tanto, constituía un elemento adecuado para la digestión enzimática de la pared de células pneumocócicas para la preparación de los extractos.

La autolisina empleada en este trabajo, fue purificada en el laboratorio del Dr. R. López según el protocolo descrito por García y cols. (1987). Se sabía además, que la actuación de este enzima sobre paredes celulares aisladas de pneumococos es máxima si se incubaba a 37 °C en tampón fosfato o tris-malato 2 - 10 mM pH 7.0 y NaCl hasta 100 mM, durante algunas horas (Mosser y Tomasz, 1970; Howard y Gooder, 1974). Para producir la lisis de células de pneumococos concentradas 100 veces, bastaba incubarlas en el mismo tampón anterior (20 - 50 mM) con 5 µg/ml de autolisina pura, durante 15 min a 37 °C (E. García, comunicación personal). Con el fin de determinar las mejores condiciones de lisis para la preparación de extractos de replicación, es decir, el menor tiempo de incubación a la temperatura más baja posible para evitar la degradación de las proteínas de interés por proteasas que hubiese en el sistema, se hicieron varias pruebas utilizando en cada ensayo una

misma concentración de células y diferentes cantidades de autolisina, temperatura y tiempos de incubación en tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) 25 y 50 mM pH 6.9. Para ello, se concentró 100 veces un cultivo de *S. pneumoniae* crecido hasta una  $\text{DO}_{650} = 0.4$ , que corresponde a la mitad de su fase exponencial de crecimiento, y se resuspendieron las células en el tampón de lisis correspondiente (ver Tabla 7) que además contenía 1 mM EDTA, 5 mM EGTA y 0.1 mM PMSF. Dado que la estabilidad de las proteínas es mayor en una solución con alta concentración salina y que se había visto que el KCl potenciaba la acción de la autolisina en paredes celulares aisladas de pneumococos (Howard y Gooder, 1974), se agregó 150 mM KCl a cada preparación. Una vez resuspendidas, las células se sometieron a dos series de congelamiento a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (nieve carbónica) y descongelamiento a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ , para desestabilizar la estructura de la pared bacteriana antes de agregar el enzima. A continuación, se incubó cada muestra con varias cantidades de autolisina a la temperatura y tiempos indicados en la Tabla 7 y se realizó otra ronda de congelación/descongelación. Se centrifugó a alta velocidad y se midió la concentración de proteínas presentes en cada sobrenadante. Como control de lisis total, se trató una cantidad de células igual a la de los ensayos anteriores, con Na-DOC 5%.

La concentración de proteínas en el sobrenadante indica el grado de lisis conseguido en cada preparación, ya que las células que no han sido lisadas precipitan durante la centrifugación y no aportan sus proteínas al sobrenadante. El total de proteínas medido en la muestra control, se tomó como un 100% de células lisadas y se relacionó a éste, el valor obtenido en los otros ensayos para calcular el porcentaje de lisis en cada caso. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 7. Éstos indican que la temperatura de incubación es un factor principal para conseguir la lisis de un alto porcentaje de células, siendo ésta máxima a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . De acuerdo con estos datos, las mejores condiciones para la actuación de la autolisina se consiguen empleando una cantidad de  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , tampón 50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  e incubación a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min. Sin embargo, para la preparación de extractos a mayor escala (empleados en los ensayos de replicación), se eligió un tiempo de reacción de 7 min (que también aseguraba un alto porcentaje de células lisadas, ver Tabla 7) para afectar lo menos posible la calidad proteica del extracto. Una vez conseguida la lisis de las células de pneumococos por este procedimiento, se continuó de la misma forma empleada para la elaboración de extractos acelulares de *S. aureus* (ver Métodos).

Tabla 7. Lisis de células de pneumococos

Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6.9	autolisina (μg/ml)	temp. (°C)	tiempo (min)	% lisis
25 mM	5	0	45	25
25 mM	10	0	45	30
50 mM	10	0	45	34
50 mM	10	22	15	53
50 mM	10	22	30	62
50 mM	20	22	15	52
50 mM	10	37	7	87
50 mM	20	37	7	87
50 mM	10	37	10	89
50 mM	10	37	15	92
50 mM + DOC 5%	-	37	10	100

### 3.2.2. Determinación de las mejores condiciones para la síntesis *in vitro* de la cadena retrasada de pLS1 y pE194

Para conseguir las condiciones necesarias de replicación a partir del *ssoA* de pLS1, utilizando extractos de *S. pneumoniae*, se empleó como sustrato de la reacción, el ssDNA generado por pA-pLS1ssoA (150 ng) y se probaron diferentes cantidades del extracto proteico (4, 8, 16 y 32 μg/μl). Estos ensayos se realizaron también con el ssDNA aislado de M13-pE194ssoA (150 ng), con el fin de probar si el *ssoA* de este plásmido de estafilococos era reconocido como señal de iniciación de la cadena retrasada en este sistema. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento del sistema anterior. Los ensayos se incubaron durante 60 min a 32 °C, ya que este tiempo era suficiente para conseguir que cada recombinante complete la síntesis de la cadena complementaria (ver más adelante). El DNA purificado de cada reacción se linealizó con *HindIII* en ambos casos y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.8%. El mejor rendimiento replicativo a partir del

ssDNA de pA-pLS1ssoA se obtuvo cuando se empleó una concentración de proteínas del extracto de  $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Fig. 35). Se necesitó una cantidad igual de extracto para conseguir los mejores índices replicativos a partir del ssDNA de M13-pE194ssoA. Sin embargo, la menor intensidad de la banda obtenida tras la digestión enzimática del DNA evidencia una eficiencia de replicación menor que la conseguida a partir del *ssoA* de pLS1 en este sistema. Si se emplean concentraciones de extracto más altas ( $16$  y  $32 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), la replicación en ambos casos se ve perjudicada, ya que el patrón de digestión con *Hind*III indica la existencia de degradación del DNA (Fig. 35). Estos datos pusieron de manifiesto que se había conseguido un sistema efectivo de replicación *in vitro* (independiente de síntesis proteica) de *S. pneumoniae* y que el *ssoA* de pE194 era efectivamente reconocido como señal de conversión *ss*  $\rightarrow$  *ds*DNA en este sistema. Dado que la incorporación de nucleótidos marcados fue prácticamente nula cuando se utilizó el ssDNA aislado desde los vectores de ambos *ssoA* plasmídicos (pA y M13), se puede concluir que la síntesis de DNA en los recombinantes procede de las señales clonadas en los sustratos empleados.



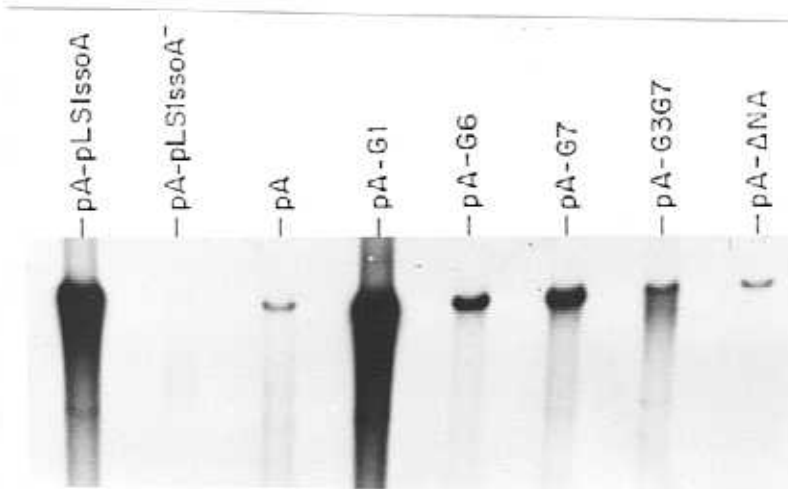
**Figura 35.** Replicación *in vitro* a partir del *ssoA* de pLS1 y pE194 en el sistema de *S. pneumoniae*. Se utilizaron  $150 \text{ ng}$  de los ssDNA aislados de pA-pLS1ssoA y M13-pE194ssoA como sustrato de la replicación. Como control negativo se llevó  $150 \text{ ng}$  del ssDNA de ambos vectores pALTER-1 y M13mp19 (pA y M13). Cada ensayo se realizó con cuatro concentraciones de proteínas del extracto (Ext) diferentes y siguiendo el mismo procedimiento empleado en el sistema de *S. aureus*. El tiempo de incubación de cada reacción fue de  $60 \text{ min}$  y los productos DNA obtenidos se digirieron con *Hind*III y se corrieron en un gel de agarosa  $0.8\%$  durante  $12 \text{ h}$  a  $2.5 \text{ V/cm}$ . Se presenta el autorradiograma del gel secado al vacío.

### 3.2.3. Efecto de las mutaciones en las regiones conservadas del *ssmA* de pLS1

Como habíamos observado anteriormente, el ssDNA acumulado por los plásmidos pLS1X en *S. pneumoniae* ponía en evidencia dos categorías de mutantes, según la zona del *ssmA* que se hubiera mutagenizado. Los cambios en la región CS-6 provocaban un incremento de tres veces en el nivel de ssDNA acumulado por estos plásmidos, mientras que los replicones que contenían la región RS<sub>B</sub> alterada presentaban un grado de acumulación de ssDNA tan alto como pLS1ΔNA (Δ*ssmA*). Como el nivel de ssDNA acumulado por todos los mutantes en CS-6 fue el mismo, se tomó un representante de esta categoría (pLS1G1) para realizar los ensayos de replicación *in vitro*. Para ello, se empleó el ssDNA del fagémido recombinante que contiene el *ssmA* de pLS1 con la mutación G1 (pA-G1). Lo mismo ocurría para los integrantes de la categoría de mutantes en RS<sub>B</sub>. Aquí se seleccionó un representante de cada clase de mutación [pLS1G6 (pA-G6): cambios en la estructura local del RS<sub>B</sub>; pLS1G7 (pA-G7): cambios en la secuencia conservada del RS<sub>B</sub> y pLS1G3G7 (pA-G3G7): cambios en ambas secuencias conservadas, CS-6 y RS<sub>B</sub>]. Como control negativo se llevó un sustrato monocatenario con la región complementaria del origen de hebra sencilla de pLS1. Este sustrato se consiguió a partir del fagémido recombinante pA-pLS1*ssmA*<sup>-</sup> (Fig. 22) que presenta el fragmento *Pst*I - *Eco*RI de pLS1 conteniendo la región del *ssmA*, clonado en la orientación contraria a la empleada para la replicación del plásmido, de tal forma que la monocadena generada por éste posee la secuencia complementaria de dicho origen (*ssmA*<sup>-</sup>). El DNA producto de cada reacción se trató igual que en el caso anterior.

Los resultados obtenidos (Fig. 36), se resumen a continuación. La eficiencia de conversión ss → dsDNA a partir del mutante en CS-6 (pA-G1) fue prácticamente idéntica a la del *ssmA* silvestre (pA-pLS1*ssmA*), ya que la intensidad que presentan ambas bandas de DNA son parecidas. Por otro lado, cualquier alteración en la región RS<sub>B</sub> produjo un drástico descenso en la intensidad de tales bandas o, lo que es lo mismo, en el nivel de síntesis de la cadena complementaria a partir de los sustratos correspondientes (pA-G6, pA-G7, pA-G3G7). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos *in vivo*, presentados en la Figura 23. Allí se hablaba de acumulación intracelular de ssDNA plasmídico, lo que es igual a eficiencia de conversión ss → dsDNA (valorada en los experimentos *in vitro*), ya que si ésta es baja, la cantidad de ssDNA acumulada *in vivo* será alta. Sin embargo, se esperaba que los valores

de replicación *in vitro* para el mutante G1 fuesen menores, concretamente la tercera parte del nivel obtenido, para poder conseguir una correspondencia exacta con los datos *in vivo*. Ésto no ocurrió, probablemente porque las condiciones empleadas en este sistema de replicación (alta concentración de ssDNA y alta concentración de proteínas del extracto) compensen de alguna forma las dificultades que presentan los mutantes en CS-6 para replicar al mismo nivel que el plásmido silvestre *in vivo*. La dependencia de orientación del *ssoA* de pLS1, para poder ser reconocido por la maquinaria replicativa del huésped como señal de iniciación de la cadena retrasada, se había demostrado en *in vivo* en *S. pneumoniae* (del Solar y cols., 1993a), por lo tanto, se esperaba que esta dependencia también se manifestara *in vitro*. Efectivamente, el sistema empleado permitió solamente la replicación de la cadena complementaria a partir del *ssoA* y no del *ssoA'*, confirmando así los datos previos. Por otro lado, el grado casi indetectable de incorporación de nucleótidos marcados al ssDNA de pA- $\Delta$ NA corrobora el hecho de que en este sistema la replicación tiene lugar únicamente a partir del segmento *Afl*III - *Nco*I incluido en el fragmento de DNA clonado en pALTER.



**Figura 36.** Síntesis de la cadena retrasada a partir de los *ssoA* mutagenizados en *S. pneumoniae*. Se siguió el mismo procedimiento anterior empleando 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto proteico y 150 ng del ssDNA aislado de los fagémidos recombinantes indicados. El autorradiograma se sobreexpuso para poder visualizar las bandas correspondientes a los mutantes en la región  $RS_{\beta}$  (pA-G6 y pA-G7) y al doble mutante (pA-G3G7).

### 3.2.4. Iniciación de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1 y sus derivados

Para determinar la especificidad de inicio de la síntesis de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1 y sus derivados, se procedió de la misma forma que en el sistema de *S. aureus*, siguiendo el esquema de trabajo presentado en la Figura 30. Con el fin de obtener las condiciones en que la mayor parte de las moléculas ssDNA estuviesen parcialmente replicadas, se analizó el grado de replicación a diferentes tiempos a partir del ssDNA procedente de pA-pLS1*ssoA* y M13-pE194*ssoA*. A los 60 min de reacción ambos sustratos ya habían conseguido completar la síntesis de la cadena complementaria, mientras que a los 20 min la mayoría de estas moléculas se encontraban parcialmente replicadas (Fig. 37).

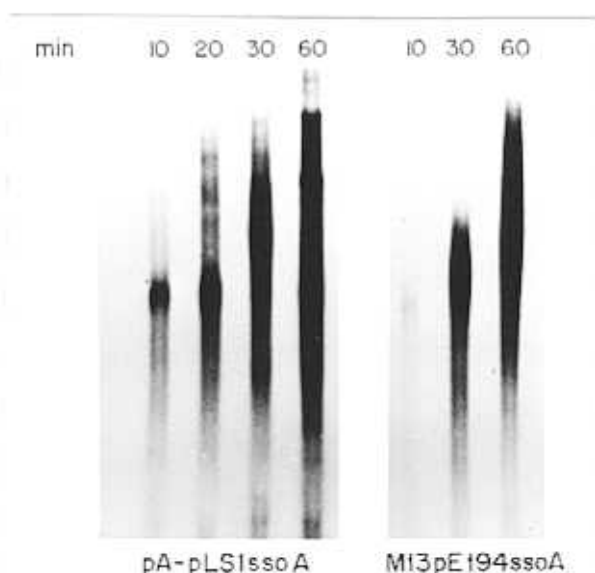


Figura 37. Síntesis de la cadena retrasada a partir del *ssoA* de pLS1 y pE194 a diferentes tiempos. En el primer caso, se partió de un volumen de reacción total de 120  $\mu$ l que contenían 600 ng del ssDNA aislado de pA-pLS1*ssoA*. En el segundo caso, se partió de un volumen de 90  $\mu$ l conteniendo 450 ng del ssDNA de M13-pE194*ssoA*. Para ambos ensayos de replicación se emplearon 8  $\mu$ g/ $\mu$ l de extracto obtenido de pneumococos y se incubó a 32 °C. A los tiempos indicados se extrajeron muestras de 30  $\mu$ l a las que se les agregó otros 30  $\mu$ l de solución de parada, para detener la reacción. Los productos DNA de cada muestra se purificaron y se sometieron directamente a electroforesis en gel de agarosa 0.8%, sin digestión enzimática previa.

Para comprobar el efecto del tiempo de incubación en el proceso de iniciación de la replicación a partir del *ssoA* de pLS1, se analizaron los productos generados tras el corte con *Afl*III del DNA luego de transcurridos 10, 20 y 40 min de reacción (Fig. 38). Tras la electroforesis de dichos productos, se obtuvieron cuatro bandas de tamaño bien definido (130,

106, 99 y 85 nt) cuyos extremos 5' mapearon en diferentes zonas de este origen. El extremo 5' correspondiente a la banda de 130 nt coincide con la región de inicio de la hebra complementaria definida para pLS1 (próxima a CS-6) en el sistema de *S. aureus* (ver Fig. 40). El fragmento de 85 nt comienza más cerca del RS<sub>B</sub>, mientras que los dos restantes lo hacen en la zona comprendida entre ambas secuencias conservadas. Por el contrario, no se encontraron puntos específicos de iniciación de esta cadena a partir del *ssOA* de pE194, ya que no se ven bandas definidas tras la digestión con *HindIII* del DNA producto de una reacción de 20 min que contenía el ssDNA de M13-pE194*ssOA* (Fig. 38). Este hecho podía significar que la iniciación de la replicación a partir de este origen fuera inespecífica en *S. pneumoniae* o que estos puntos mapearan en una zona lejana a la región homóloga a CS-6 y no fuera posible detectarlos con dicha enzima.

A continuación, se analizaron los puntos de iniciación de la cadena retrasada a partir de los derivados mutagenizados del *ssOA* de pLS1. Para ello, se empleó como sustrato el ssDNA procedente de los fagémidos recombinantes conteniendo cada una de las mutaciones producidas en este origen (pA-X). Después de un período de incubación de 20 min, se analizaron los productos generados tras la digestión con *AflII* del DNA purificado en cada reacción. Los resultados conseguidos (Fig. 39) revelaron nuevamente la existencia de dos categorías de mutantes. Mientras que los que tienen la región CS-6 alterada mantienen puntos de iniciación de la cadena retrasada similares a los generados a partir del *ssOA* silvestre (representados por las bandas de 130, 106, 99 y 85 nt), la iniciación a partir de los orígenes que tienen el RS<sub>B</sub> o ambas regiones conservadas mutagenizadas es completamente inespecífica, ya que no se ve ninguna banda definida en las muestras tratadas con el enzima. Además, en la primera clase de mutantes, así como a partir del *ssOA* silvestre, se observan dos pequeñas bandas de 53 y 54 nt tras la digestión del DNA que, si bien también aparecen como productos de replicación desde los mutantes en RS<sub>B</sub>, aquí son de intensidad mucho más baja. Por otro lado, existen algunas diferencias entre el patrón de bandas generado a partir del *ssOA* silvestre y el obtenido a partir de alguno de los mutantes en CS-6. En el primer caso, así como a partir del mutante CM, aparece una banda de 130 nt bien definida (Fig. 38 y 39) que sólo puede intuirse muy débilmente en otros mutantes de esta categoría como G1, G3 y G4.

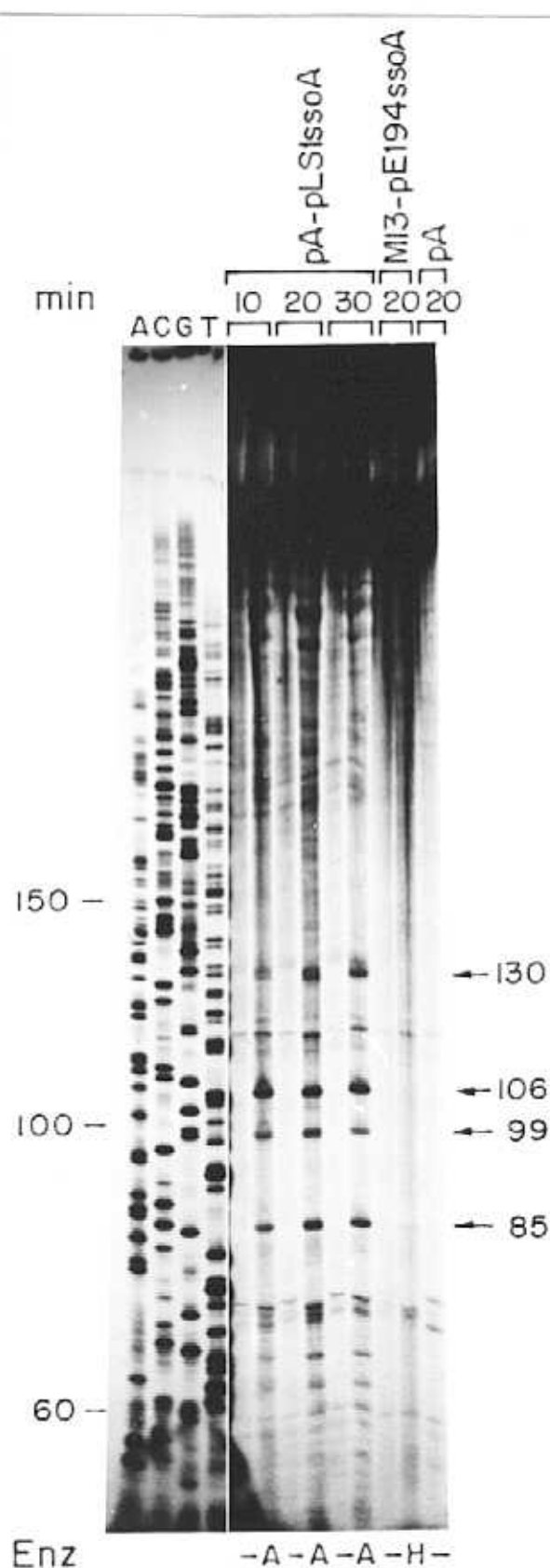


Figura 38. Sitios de iniciación de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1 y pE194 en *S. pneumoniae*. Se empleó el mismo procedimiento que el seguido para el sistema de *S. aureus*, pero utilizando  $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto obtenido de pneumococos. Los ssDNA que se usaron como sustrato en cada reacción proceden de pALTER-1 (pA, control negativo), pA-pLS1ssoA y M13-pE194ssoA. Las reacciones se llevaron a cabo durante distintos tiempos (min) de incubación a  $32^\circ\text{C}$  y la mitad del producto DNA purificado de cada una se trató o no (-) con las enzimas *Afl*III (A) o *Hind*III (H). Ambas muestras se corrieron en un gel de 6% PAA/8 M urea, llevando una secuencia de pLS1 como control de peso molecular (ACGT). Los números indican el tamaño en nucleótidos de las bandas señaladas.

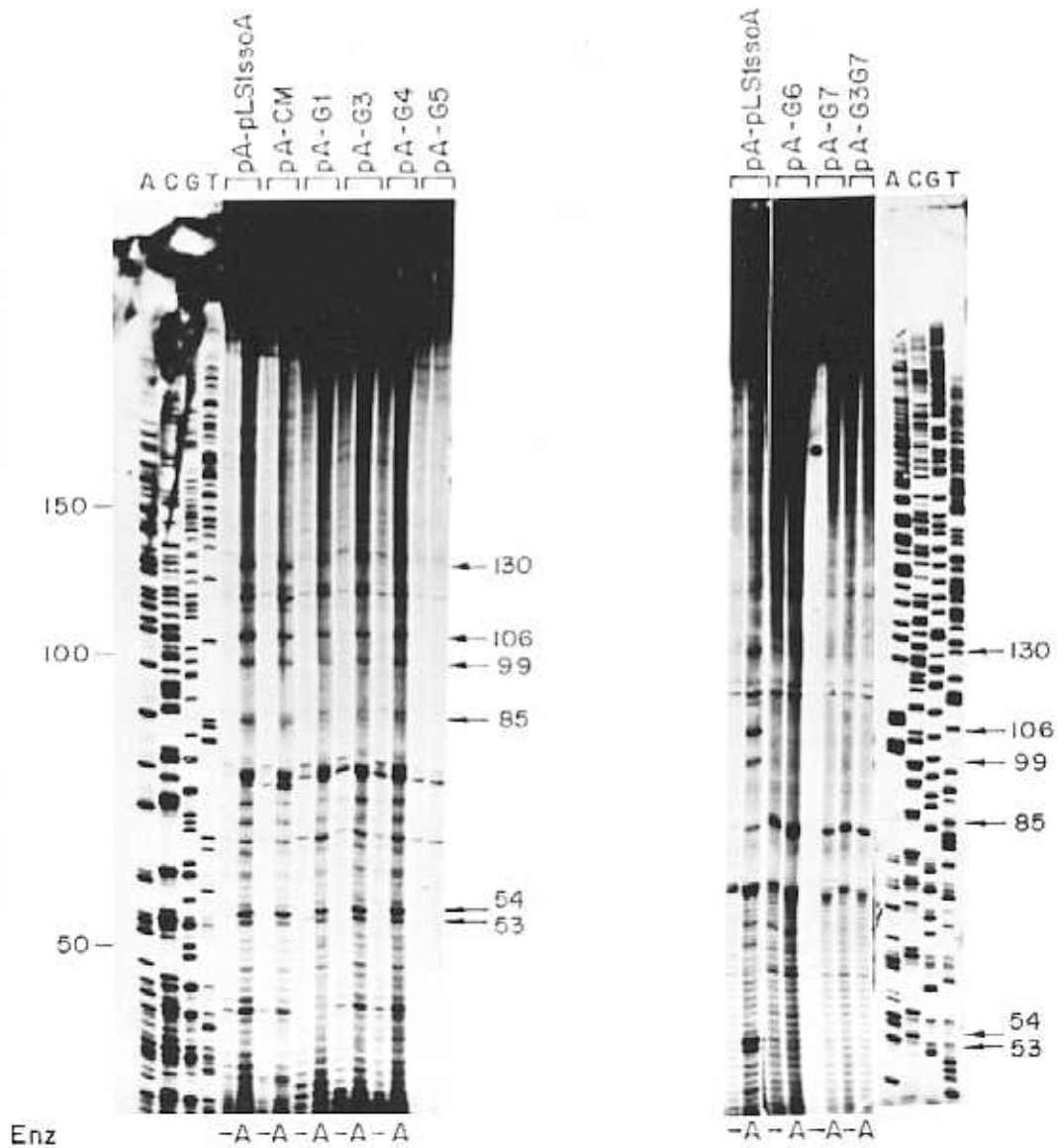
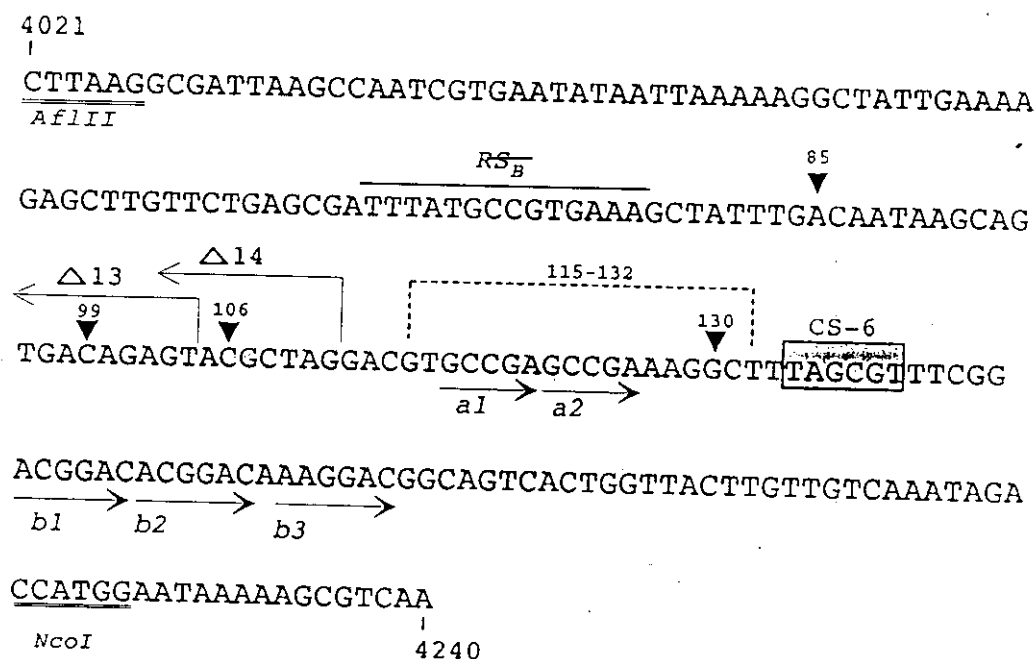


Figura 39. Iniciación de la cadena complementaria a partir de los derivados mutagenizados del *ssoA* de pLS1 en *S. pneumoniae*. Como sustrato de cada reacción se utilizaron los ssDNA procedentes de los fagémidos recombinantes indicados y se prosiguió igual que el ensayo anterior. El DNA se purificó de la mezcla y la mitad de cada muestra se digirió con *A*/III (A). El DNA tratado o no (-) con el enzima de restricción se corrió en el gel desnaturizante de PAA llevando una secuencia de pLS1 como control de peso molecular (ACGT). Los números indican el tamaño en nucleótidos de las bandas señaladas.

El conjunto de datos obtenidos nos permiten concluir que el sistema de replicación *in vitro* de *S. pneumoniae* es funcional y específico del *ssoA* de pLS1, ya que no se consiguió síntesis a partir del *ssoA*<sup>-</sup>. La replicación de la cadena complementaria a partir de los mutantes en CS-6, a pesar de ser menos eficiente *in vivo*, mantiene una especificidad de inicio muy parecida a la del plásmido silvestre. Por otro lado, cualquier mutación en la región RS<sub>B</sub> se traduce en una eficiencia mucho menor de síntesis de esta cadena, tanto *in vivo* como *in vitro*, y además ésta se inicia de forma inespecífica. La baja proporción de moléculas ssDNA aisladas de pA-G6, pA-G7 y pA-G3G7 que habían completado la síntesis de la hebra complementaria (Fig. 36) provendrían, según estos datos, de diversos puntos de conversión ss → dsDNA inespecíficos. En la Figura 40 se señalan los nucleótidos y regiones de la secuencia del *ssoA* de pLS1 desde donde tiene lugar el inicio de la replicación de la cadena retrasada de este plásmido en los sistemas de *S. aureus* y *S. pneumoniae*, para una visualización comparativa entre ambos.



**Figura 40. Puntos de iniciación de la cadena retrasada de pLS1 en *S. aureus* y *S. pneumoniae*.** Se muestra la secuencia nucleotídica de la hebra de DNA de pLS1 entre las coordenadas 4021 y 4240, que contiene la región del *ssoA*. Se indican los sitios de restricción *AfIII* y *NcoI* (subrayado doble), los bordes hacia la derecha de las deleciones Δ13 y Δ14 (flechas quebradas), la región RS<sub>B</sub> (sobrerrayado), la secuencia conservada CS-6 (recuadro sombreado) y las repeticiones directas (flechas con punta negra). La zona que incluye los sitios desde donde se inicia la síntesis de la cadena complementaria en *S. aureus* se señala con un corchete en línea discontinua y los puntos principales de iniciación en *S. pneumoniae* se marcan con un triángulo negro. Los números indican la distancia entre estos puntos y el sitio *AfIII*.

## 4. INTERACCIONES ENTRE *ssoA* Y RNAP

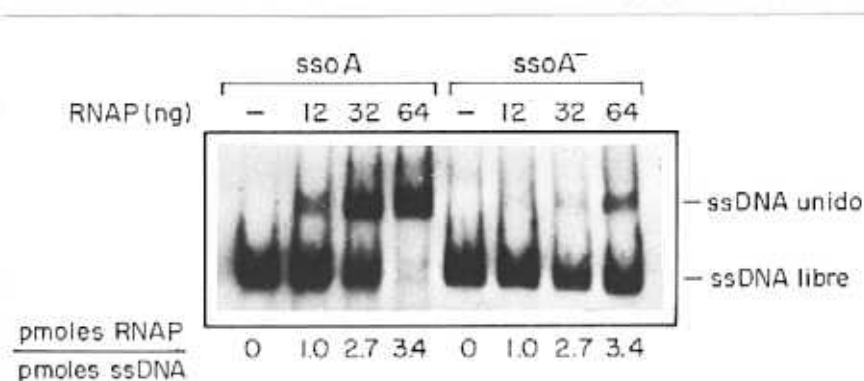
Los resultados obtenidos hasta ahora permitían concluir que las mutaciones introducidas en las regiones conservadas del *ssoA* de pLS1 afectan tanto la eficiencia como especificidad de inicio de la síntesis de la cadena retrasada, en mayor o menor grado dependiendo de la región del origen que se alterase. Sin embargo, dichos resultados no explican las razones de estas diferencias fenotípicas. Por ejemplo, los cambios en la secuencia o en la estructura local del RS<sub>B</sub> tienen consecuencias muy drásticas en la replicación del plásmido (baja eficiencia e iniciación inespecífica de la cadena retrasada) en *S. pneumoniae*, mientras que las mutaciones en CS-6 producen sólo un leve descenso en la eficiencia de conversión ss → dsDNA *in vivo*, sin alterar prácticamente la especificidad de inicio de dicha cadena. Estos datos pueden ser interpretados al menos de tres formas: i) que la región RS<sub>B</sub> esté implicada en la unión directa de la RNAP, encargada de sintetizar el "primer" para que tenga lugar la replicación de la cadena retrasada, ii) que esta región sea el sitio de unión de algún otro factor bacteriano necesario para activar la función de la RNAP o posibilitar su unión al ssDNA, o iii) que la región RS<sub>B</sub> esté implicada en la unión de otro factor bacteriano indispensable para que tenga lugar la síntesis del DNA de la cadena retrasada una vez sintetizado el "primer". Cualquiera de estas teorías explicarían por qué alteraciones del RS<sub>B</sub> interfieren negativamente en la síntesis de la cadena complementaria de pLS1. Por otro lado, la secuencia y estructura local de CS-6, aunque no es fundamental, parecía tener una función colaboradora en la replicación de esta cadena. Con el fin de determinar el significado de cada una de estas regiones conservadas del *ssoA* en la unión de la RNAP y/o en la síntesis del pRNA, se realizaron experimentos de retardo en gel y de transcripción *in vitro* usando la RNAP purificada de *B. subtilis* y como sustrato, un fragmento pequeño de DNA monocatenario que contenía el *ssoA* silvestre o mutado de pLS1.

### 4.1. Retardo en gel de fragmentos ssDNA con la secuencia *ssoA*

Para probar el primer supuesto, es decir, si RS<sub>B</sub> constituía el sitio de unión de la RNAP al *ssoA*, se analizó la capacidad de este enzima de retardar la migración (como consecuencia de su unión específica) de fragmentos de DNA monocatenario que contenían

la señal *ss**oA* de pLS1. Como control negativo se utilizaron otros fragmentos ssDNA del mismo tamaño con la secuencia complementaria del *ss**oA*, *ss**oA*<sup>-</sup>. Ambos sustratos ssDNA se obtuvieron por amplificación asimétrica, mediante PCR, de una región de 313 pb del DNA de pLS1 que comprende la secuencia *ss**oA*. Para ello, se utilizaron dos oligonucleótidos que delimitan las zonas conservadas de este origen de replicación: hacia la izquierda, el oligo 1, 5'-TCAGCAAATGACAAGATGCTAGG-3', presente en los fragmentos ssDNA que contienen la secuencia *ss**oA* producidos tras la reacción de amplificación y hacia la derecha, el oligo 2, 5'-TCATCCACTCAAGACTTTTGACGC-3', el cual se encuentra en los fragmentos ssDNA que llevan la región *ss**oA*<sup>-</sup>. Las reacciones de PCR se realizaron con 50 y 0.5 pmoles de cada uno de estos oligos, donde el oligo que se puso en mayor cantidad, dependía de la hebra de DNA se quisiese amplificar. En ambos casos (cuando se amplificó una u otra hebra) se obtuvieron, además de los fragmentos ssDNA correspondientes de 313 nt, otra banda correspondiente al producto de DNA bicatenario de 313 pb (no se muestra). Para purificar los fragmentos ssDNA de cada reacción, se sometió el producto total de cada ensayo a electroforesis en un gel preparativo de agarosa que permitía la separación de pequeños fragmentos de DNA, desde el cual se extrajeron las bandas ssDNA de interés (ver Métodos).

La RNAP utilizada fue la de *B. subtilis*, ya que se trataba de la única RNAP de bacterias gram(+) de la que podíamos disponer. Ésta fue purificada con su factor  $\sigma$  mayoritario ( $\sigma^A$ ) en el laboratorio de la Dra. M. Salas por el Dr. M. Mencía, según el protocolo descrito por Moreno y cols., 1974. Los fragmentos ssDNA se marcaron en su extremo 5' (mediante tratamiento con T4 PNK y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP) y se precipitaron junto con poli(dIdC), de tal forma que en los 2  $\mu$ l (0.003  $\mu$ g) de ssDNA utilizados en cada ensayo de retardo hubiese aproximadamente 200 veces más de competidor (1.0  $\mu$ g) respecto al ssDNA marcado. Se probaron distintas cantidades de RNAP y cada reacción (10  $\mu$ l) se incubó 5 min en hielo antes de cargar un gel nativo de PAA (40:1) 3.5%. El tampón de incubación contenía 200 mM NaCl y 90 mM sulfato amónico para promover la interacción específica entre ambos elementos, dado que en ausencia de sulfato amónico o si se utilizaban concentraciones menores de NaCl, se había observado un grado considerable de interacciones inespecíficas entre ellos (no se muestra).



**Figura 41.** Análisis de unión de la RNAP de *B. subtilis* al *ssoA* y *ssoA'* de pLS1. Se incubaron 300 pg (30,000 cpm) de los fragmentos ssDNA de 313 nt, aislados de reacciones de PCR asimétrica (ver texto), conteniendo la secuencia *ssoA* de pLS1 (*ssoA*) o la región complementaria de ésta (*ssoA'*) marcados en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ , con las cantidades indicadas de RNAP (saturada con su subunidad  $\sigma^A$ ) durante 5 min en hielo. El tampón de reacción se compone de 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200 mM NaCl, 4% sacarosa, 1 mM DTT y 90 mM sulfato amónico. Todas las muestras (10  $\mu\text{l}$ ) contienen 1  $\mu\text{g}$  de DNA competidor (polidIdC). Se cargaron en un gel nativo de PAA (40:1) 3.5% y se corrieron a 100 V a 4  $^\circ\text{C}$ . Se calculó la relación entre los pmoles de ssDNA y de RNAP utilizados en cada caso. Se muestra la autorradiografía del gel, donde pueden verse las bandas correspondientes al ssDNA libre y retrasado por la unión de la RNAP.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 41. Cuando se incubaron 12 ng de RNAP con el ssDNA que contenía el *ssoA* de pLS1, se observó la formación de una pequeña cantidad de complejos ssDNA-RNAP, de migración retrasada respecto a la del ssDNA libre. Estos complejos no se formaron cuando se empleó la misma cantidad de RNAP con el ssDNA que contenía la secuencia *ssoA'*. Al incrementar a 32 ng la cantidad de enzima utilizado, aumentó considerablemente la proporción de complejos ssDNA-RNAP formados, cuando el ssDNA empleado contenía la secuencia *ssoA*. En las mismas condiciones, continuaba sin verse un retardo significativo de los fragmentos ssDNA con la secuencia *ssoA'*. Cuando la cantidad de RNAP utilizada se elevó a 64 ng, todo el ssDNA conteniendo la secuencia *ssoA* empleado en el ensayo se encontraba acomplejado a la proteína, mientras que sólo se observó una pequeña fracción de complejos ssDNA-RNAP, cuando el sustrato empleado fue el ssDNA con la secuencia *ssoA'*. Estos datos demuestran que la RNAP de *B. subtilis* reconoce específicamente el *ssoA* de pLS1 y no su secuencia complementaria *ssoA'*, ya que la afinidad de unión del enzima al ssDNA que contiene la primera de estas secuencias es mucho mayor que en el segundo caso. El hecho de que cantidades elevadas de RNAP (64

ng) induzcan la formación de una pequeña proporción de complejos DNA-proteína cuando se empleó el ssDNA con la secuencia *ssoA*<sup>-</sup>, no es de extrañar, ya que la RNAP se une naturalmente al DNA y aunque su afinidad por este ssDNA es baja, sería lógico observar algún tipo de unión (inespecífica) en estas condiciones de ensayo. Por otro lado, los datos obtenidos en este experimento permitieron concluir que no es necesario la presencia ni unión de otro factor del huésped para que la RNAP reconozca la señal *ssoA* de pLS1.

#### 4.1.1. Efecto de mutaciones en el *ssoA* en la interacción con RNAP

Para estudiar el efecto que tenían las mutaciones generadas en las regiones conservadas del *ssoA* frente a la unión de la RNAP, se realizaron experimentos de retraso en gel utilizando fragmentos ssDNA que contenían las mutaciones X (CM, G1, G3 - G7 y G3G7) incubados con diferentes cantidades de RNAP. Los fragmentos ssDNA empleados se obtuvieron por amplificación asimétrica, mediante PCR, de una región de unos 313 pb que contenía la secuencia con cada mutación del *ssoA*, presente en los plásmidos pLS1X, y purificación posterior siguiendo el procedimiento anterior. Cada una de las reacciones de PCR se realizaron empleando 50 pmoles del oligo 1 y 0.5 pmoles del oligo 2. Los fragmentos ssDNA purificados se marcaron en sus extremos 5' como en el caso anterior. Los ensayos de retardo se realizaron con una cantidad de ssDNA marcado correspondiente a 30,000 cpm (unos 3 ng) en cada caso. Las cantidades de RNAP utilizadas se indican en la Figura 42.

Cuando se ensayó la unión del enzima a estos fragmentos ssDNA, se observó nuevamente dos categorías de resultados, dependiendo de la región del origen que se hubiese alterado. El defecto mayor en la unión de la RNAP se observó para los fragmentos que tenían la región RS<sub>B</sub> mutagenizada. Todos ellos presentaron un comportamiento similar al observado para el ssDNA con la secuencia *ssoA*<sup>-</sup>, es decir, que no se detectó unión de la RNAP cuando se emplearon 12 ng de la misma y sólo se observó una escasa proporción de ssDNA acomplejado cuando se usaron cantidades muy altas del enzima (64 ng; Fig. 42A). Estos complejos, al igual que en el caso anterior, son probablemente consecuencia de la unión inespecífica de la RNAP al DNA. Por el contrario, la unión de la RNAP a todos los

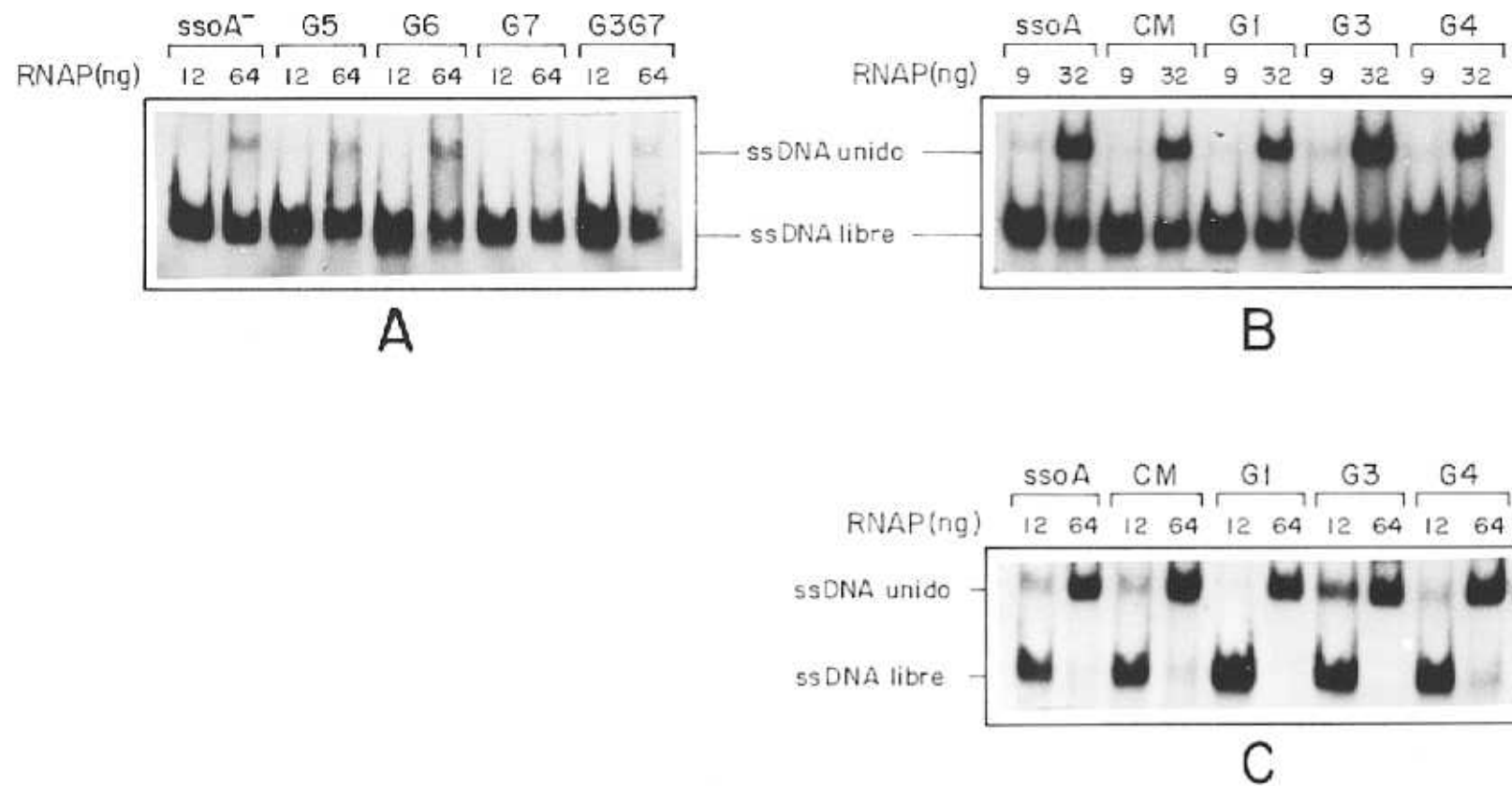


Figura 42. Unión de la RNAP de *B. subtilis* a los derivados mutagenizados del *ssoA* de pLS1. Se emplearon 300 pg (30 000 cpm) de los fragmentos ssDNA de 313 nt que contenían cada una de las mutaciones indicadas, en RS<sub>B</sub> y el doble mutante G3G7 (A) y en CS-6 (B y C), para los experimentos de retraso en gel. Se llevó como control positivo y negativo, respectivamente, los ssDNA usados antes (*ssoA* y *ssoA*<sup>-</sup>). Se incubaron con las cantidades de enzima indicadas y se prosiguió de la misma forma y en las mismas condiciones que en el ensayo anterior.

fragmentos ssDNA que presentaban la secuencia CS-6 alterada fue similar a la observada con los fragmentos que tenían la región *ssoA* silvestre. Cuando se emplearon 12 ng del enzima, se observó una pequeña proporción de complejos ssDNA-RNAP que se incrementó cuando se añadieron 32 ng de proteína. En la mayoría de los casos, todo el ssDNA presente en cada ensayo se unió al enzima cuando se emplearon 64 ng de RNAP (Fig. 42B y C). Para probar si la RNAP de *B. subtilis* era capaz de unirse al *ssoA* y a los mutantes en la secuencia CS-6 de este origen, en cantidades menores, se realizaron los mismos ensayos con 9 ng de proteína, observándose todavía una pequeña cantidad de complejos (Fig. 42B). En este caso, la banda retrasada correspondiente a los complejos ssDNA-RNAP para los fragmentos con las mutaciones CM, G1 y G4 es más débil, pero sigue siendo visible en autorradiografías sobreexpuestas (no se muestra).

Dado que cualquier mutación generada en la región RS<sub>B</sub> del *ssoA* de pLS1 impide la unión de la RNAP al ssDNA que la contenga (G5, G6, G7 y G3G7), se puede concluir que la RNAP de *B. subtilis* interacciona directamente con esta región, necesitando para ello que tanto la secuencia como la estructura local de esta zona se encuentren intactas, o bien, que la región intacta del RS<sub>B</sub> determine la configuración necesaria del DNA para que la RNAP pueda unirse a su correspondiente sitio en el ssDNA. De todas formas, la falta de unión del enzima al ssDNA traería como consecuencia que no se sintetice el RNA cebador para la síntesis de la cadena complementaria de pLS1, lo que derivaría en el incremento de las formas plasmídicas de DNA monocatenario detectadas *in vivo* y en la baja eficiencia de la replicación de esta cadena observada *in vitro*, en *S. pneumoniae*.

Todos estos datos nos proporcionaban una valiosa información acerca de la interacción entre la RNAP y el *ssoA*, así como del efecto en esta unión de los diferentes tipos de mutaciones generadas en el origen. Sin embargo, estos datos no nos proporcionaban ninguna información acerca de la actividad de este enzima en el sistema empleado para los análisis de retardo, en donde no intervenían otros factores bacterianos. Es decir, que los datos obtenidos hasta el momento no nos permitían descartar la participación de otros componentes del huésped en la síntesis del pRNA. Fue entonces, que emprendimos un proyecto con el fin de crear un sistema en donde se pudiera sintetizar el RNA cebador de la cadena retrasada de pLS1 a partir de su *ssoA*. Hasta ahora, sólo se habían ideado sistemas para la síntesis del

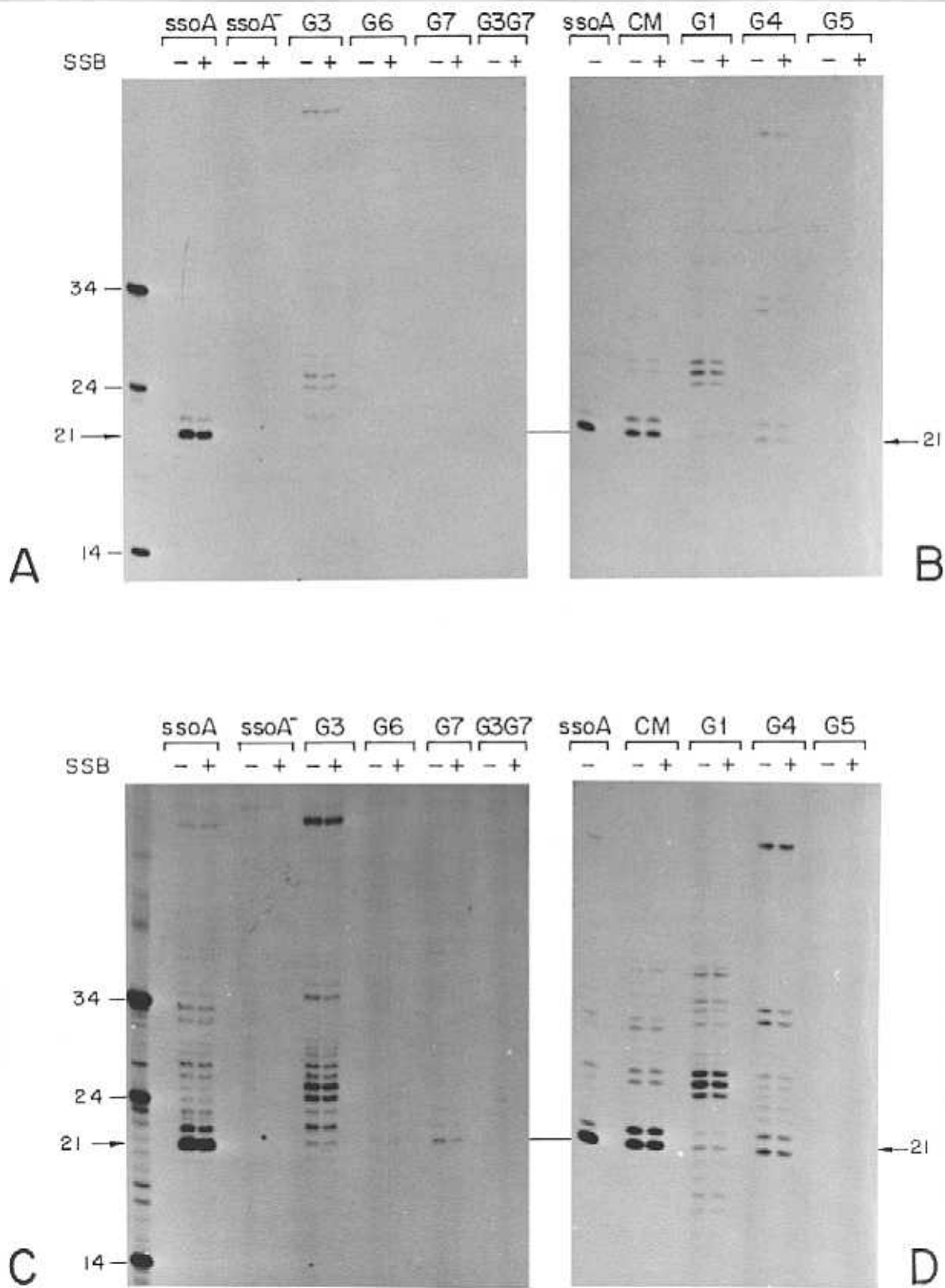
pRNA de la cadena complementaria en colifagos de cadena sencilla (ver Introducción), pero no se había descrito nada comparable en la síntesis de "primers" para plásmidos con replicación RC. Basándonos en los experimentos de transcripción *in vitro* descritos por Mencía y cols. (1996), se desarrolló un sistema que permitió determinar la capacidad de la RNAP de *B. subtilis* para sintetizar los RNA cebadores de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1 y desde los derivados mutagenizados de éste.

## 5. SÍNTESIS *IN VITRO* DE pRNAs A PARTIR DEL *ssoA* DE pLS1

Los primeros ensayos, se realizaron con los fragmentos ssDNA que contenían la señal *ssoA* silvestre y con los que contenían la secuencia complementaria (*ssoA*<sup>-</sup>), como control negativo. Los sustratos ssDNA se obtuvieron de la misma forma que para los ensayos de retardo anteriores. Para detectar los productos de cada reacción, se empleó una mezcla de rNTPs que contenía [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP. Las dimensiones de los transcritos sintetizados se determinaron por comparación con oligonucleótidos de DNA marcados radiactivamente, de tamaño conocido. Para cada clase de fragmentos ssDNA se realizaron dos reacciones: una con y otra sin SSB, para valorar el efecto de esta proteína en la configuración del *sso* para que actúe como sustrato de la RNAP. Se calculó que eran necesarios 28.5 pmoles (0.53  $\mu$ g) de SSB para cubrir totalmente los 0.1 pmoles (0.01  $\mu$ g) del ssDNA de 313 nt utilizado como sustrato en cada reacción. Para asegurar la saturación, se puso un exceso de esta proteína (1  $\mu$ g). La cantidad de RNAP empleada fue 1 pmol (0.4  $\mu$ g) por reacción. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 50  $\mu$ l siguiendo el esquema de trabajo que se detalla a continuación: 1) El ssDNA (1  $\mu$ l) se calentó durante 2 min a 90 °C junto con 20  $\mu$ l del tampón de reacción (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl, 4% sacarosa, 1 mM DTT, 90 mM sulfato amónico), para eliminar las posibles estructuras intracatenarias formadas durante el proceso de purificación del ssDNA. Seguidamente, se enfrió cada muestra gradualmente durante 45 min, para que pudieran formarse las estructuras secundarias funcionales propias de estos fragmentos, en una situación más fisiológica. 2) A continuación, se agregó SSB a la parte correspondiente de los ensayos y se incubó 20 min a 30 °C. Las reacciones que no llevaban SSB se mantuvieron en hielo durante el mismo período de tiempo. 3) A cada preparación se le agregó 1  $\mu$ g de BSA para contribuir a la estabilidad de la RNAP,

la cual se añadió a continuación. La RNAP utilizada había sido previamente incubada con la subunidad  $\sigma^A$  pura, con el fin de complementar las moléculas de RNAP que hubiesen perdido esta proteína durante el proceso de purificación. Se mantuvo cada preparación durante 5 min en hielo antes de agregar el tampón de reacción suplementado con ATP, GTP, CTP necesarios a una concentración final de 200  $\mu$ M, 80 $\mu$ M [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP (5  $\mu$ Ci), 5  $\mu$ g heparina, para inhibir una segunda ronda de transcripción llevada a cabo por la misma molécula de RNAP, y 5 unidades enzimáticas de un inhibidor de RNasas. 4) Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 10 min y se pararon agregando 5  $\mu$ l de una mezcla conteniendo 100 mM EDTA y 2  $\mu$ g/ $\mu$ l tRNA, empleado como "carrier" para facilitar la precipitación de los ácidos nucleicos. 5) Los ácidos nucleicos se aislaron de cada mezcla de reacción mediante precipitación con 5.5  $\mu$ l de acetato potásico 3M pH 4.8 y 140  $\mu$ l de etanol absoluto. Las muestras se resuspendieron en 6  $\mu$ l de tampón de carga y se calentaron durante 3 min a 90°C para desnaturalizar la unión entre el RNA recién sintetizado y su sustrato ssDNA, sometiéndose posteriormente a electroforesis a 2000 V en un gel de 15% PAA - 8 M urea.

Los resultados obtenidos de la autorradiografía del gel correspondiente se presentan en la Figura 43. Cuando se empleó como sustrato el ssDNA que contenía la secuencia *ssOA* de pLS1 se obtuvieron productos de la reacción de transcripción, en donde el RNA mayoritario conseguido fue un pequeño transcrito de 21 nt, visible incluso en autorradiogramas poco expuestos (Fig. 43A y B). Si se sobreexpone la imagen, se puede observar además, una banda de 22 nt, aunque de menor intensidad, así como toda una gama de fragmentos de mayor tamaño poco intensos (Fig. 43C y D). Cuando se ensayó el sustrato ssDNA que contenía la secuencia *ssOA'*, no se obtuvieron productos significativos de la reacción de transcripción (en autorradiografías muy expuestas sólo puede observarse una banda muy débil de unos 65 nt; Fig 43C). Ésto era esperable, dado que en los experimentos de retardo (Fig. 41) no se había detectado unión específica de la RNAP a fragmentos ssDNA conteniendo esta secuencia. Los datos obtenidos confirman entonces, que la RNAP de *B. subtilis* reconoce específicamente el origen de replicación de la cadena retrasada de pLS1 (*ssOA*) y que no es necesario la presencia de un factor adicional del huésped para promover la síntesis de RNA cebadores de dicha cadena. Dado que el tamaño del pRNA mayoritario sintetizado es de 21 nt y que no se detectaron productos de mayor tamaño cuando se analizaron las mismas muestras en geles de PAA menos concentrados (6%-8 M urea; no se



**Figura 43. Síntesis *in vitro* de pRNAs a partir del *ssoA* silvestre y mutagenizados de pLS1.** Las reacciones se realizaron con 0.1 pmol (10 ng) de los fragmentos ssDNA que contienen el *ssoA* silvestre o cada una de las mutaciones indicadas. Como control negativo se llevó *ssoA*<sup>-</sup>. Las muestras con SSB (1  $\mu$ g) se incubaron 20 min a 30 °C antes de agregar 1 pmol de RNAP (0.4  $\mu$ g). A continuación, se dejó reposar cada preparación 5 min a 4 °C para permitir la interacción enzima-sustrato. La reacción de síntesis se llevó a cabo a 37 °C en presencia de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP. Los ácidos nucleicos se extrajeron de la mezcla mediante precipitación con acetato potásico 3M pH 4.8 y etanol. Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento y se sometieron a electroforesis en un gel de 15% PAA/8 M urea. Como control de peso molecular se llevó un grupo de oligonucleótidos marcados de tamaño conocido (entre 14 y 34 nt). Se señala con una flecha la posición del producto RNA mayoritario (21 nt). Su tamaño se calculó teniendo en cuenta que el RNA tiene una migración electroforética mayor que el DNA utilizado como control de peso molecular.

muestra), se puede proponer la existencia de un punto principal en el *ss0A* de pLS1, donde finaliza la síntesis de este RNA y como consecuencia de esto, la transcripción "run off" no tiene lugar a partir de dicha señal de replicación. Por otro lado, los resultados presentados en la Figura 43 indican que, tanto en presencia como en ausencia de SSB, el sustrato monocatenario adopta la conformación necesaria para ser reconocido por el enzima, ya que los productos obtenidos en ambos casos (con y sin proteína) son los mismos (este hecho se comentará más adelante).

### 5.1. Efecto de mutaciones en el *ss0A* en la síntesis de pRNAs

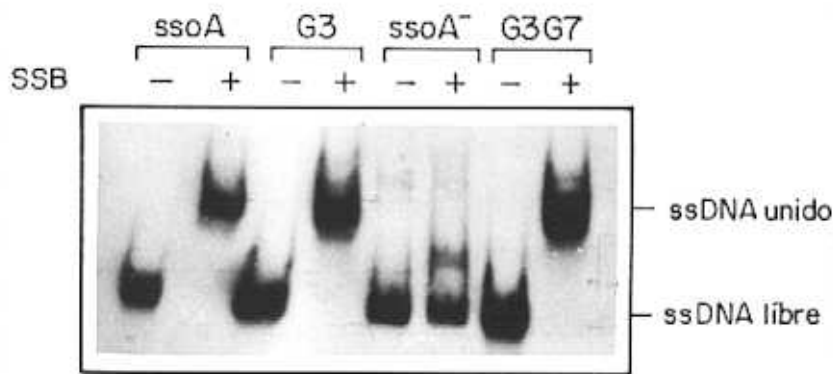
Los ensayos de transcripción *in vitro* realizados con los fragmentos ssDNA que contenían las diferentes mutaciones en el *ss0A* de pLS1 se llevaron a cabo de forma análoga a la expuesta anteriormente. En estos casos, los resultados coincidieron con los datos obtenidos en los experimentos de retardo en gel (ver Fig. 42). Sólo los sustratos ssDNA que presentaban mutaciones en la región CS-6 del *ss0A* (CM, G1, G3 y G4) permitieron la síntesis de pequeñas moléculas de RNA (Fig. 43), mientras que en los ensayos realizados con los fragmentos ssDNA que presentaban la región RS<sub>B</sub> alterada (G5, G6, G7 y G3G7), no se obtuvieron productos significativos de esta reacción (en autorradiografías sobreexpuestas tan solo puede observarse una banda muy débil cuyo tamaño coincide con el de la banda generada a partir del fragmento *ss0A*; en el caso de G6 y G7 se ve también una débil banda de 21 nt; Fig. 43C). Este comportamiento sería esperable, dada la falta de interacción detectada entre la RNAP y los fragmentos ssDNA conteniendo este último tipo de mutación. El patrón de bandas observado, tras la síntesis de RNA a partir de los fragmentos ssDNA con la región CS-6 alterada, dependía del tipo de mutación y fue diferente al obtenido cuando se utilizó el sustrato con la secuencia *ss0A* silvestre. Mientras que en los ensayos realizados con los fragmentos de ssDNA que llevaban la mutación CM se continúa viendo el producto mayoritario de RNA de 21 nt a la vez que otra banda de 22 nt, igualmente intensa, los productos obtenidos con los sustratos ssDNA conteniendo las mutaciones G1, G3 y G4 son bastante más dispares. En las reacciones con los fragmentos con la mutación G1 se ven tres bandas de intensidad similar (24, 25 y 26 nt), en G3 los productos de 24 y 25 son los más aparentes, así como un transcrito mayor de unos 60 nt, que también aparece en G4. En este

último caso, los RNAs son de tamaños diversos y las bandas mayoritarias (21, 22, 33 y 34 nt) son poco intensas (Fig. 43B). La variedad de productos sintetizados a partir de estos sustratos, podría estar asociada a una función de la región CS-6 durante el proceso de terminación de la síntesis del RNA cebador de la cadena complementaria de pLS1.

## 5.2. Efecto de la proteína SSB en la síntesis *in vitro* de RNA a partir del *ssOA* de pLS1

Dado que se había comprobado que la presencia de SSB era necesaria para que se pueda sintetizar de forma específica el RNA cebador de la cadena retrasada en colifagos de cadena sencilla (Zechel y cols., 1975; Arai y Kornberg, 1979; Sun y Godson, 1993), se decidió analizar el efecto de esta proteína en la síntesis del pRNA a partir del *ssOA* de pLS1. Para ello, se procedió según el esquema de trabajo detallado anteriormente para la síntesis *in vitro* de RNA apegando, donde se indica, la cantidad calculada de SSB para saturar los 0.1 pmoles de sustrato ssDNA utilizados en cada reacción. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 43. Aquí se ve que, independientemente del fragmento ssDNA empleado como sustrato de la reacción, la adición de SSB no modifica en absoluto el patrón de bandas (síntesis de RNA) obtenido en ausencia de esta proteína. Este hecho sugiere que en el caso de pLS1 no parece ser necesaria la estructuración del origen de replicación de la cadena retrasada por parte de SSB, para conseguir, *in vitro*, la síntesis específica de RNA cebadores de la replicación, como se había visto en los colifagos de cadena sencilla (ver Introducción). Sin embargo, cabía la posibilidad de que en las condiciones empleadas en estos ensayos, SSB no se estuviera uniendo a los sustratos ssDNA y por eso no se hubieran registrado diferencias en el patrón de síntesis de estos pequeños transcritos. Para comprobarlo, se realizó un experimento de retardo en gel empleando las mismas proporciones moleculares de ssDNA y SSB que para el ensayo de transcripción *in vitro*. En este caso, los fragmentos ssDNA se marcaron en sus extremos 5' con  $^{32}\text{P}$  (ver Métodos) para poder visualizarlos y se incubaron 30,000 cpm de ssDNA (unos 3 ng) con la cantidad de SSB (16.13 pmoles) correspondiente para saturar dicho sustrato. Cada reacción de unión se llevó a cabo en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ , en el mismo tampón empleado en los ensayos de transcripción y siguiendo el procedimiento detallado anteriormente para los mismos. Los

resultados presentados en la Figura 44 indican que SSB se une efectivamente a estos sustratos en las condiciones ensayadas, confirmando así la prescindibilidad *in vitro* de SSB en la síntesis específica de pRNAs a partir del *ssoA* de pLS1. Los mismos resultados de retardo se obtuvieron para los fragmentos con las demás mutaciones (CM, G1, G4 - G7; no se muestra). La formación de un complejo de unión más pequeño así como de menor afinidad entre SSB y el fragmento *ssoA*, indica que podría existir cierta especificidad de orientación de esta secuencia para la interacción SSB-ssDNA.



**Figura 44.** Unión de SSB a fragmentos ssDNA. Se analizó el retraso en la migración de los fragmentos ssDNA (3 ng) conteniendo la secuencia *ssoA* de pLS1 (*ssoA*), la secuencia complementaria de ésta (*ssoA*<sup>-</sup>) y las mutaciones G3 y G3G7, como consecuencia de la unión de SSB (0.6 µg), agregado en cantidad suficiente como para saturar el sustrato. Las muestras se incubaron 20 min a 30 °C y se corrieron en un gel nativo de PAA (40:1) 3.5%.

## 6. MUTACIONES EN LA DNA POLIMERASA I DE *S. pneumoniae* AFECTAN LA REPLICACIÓN A PARTIR DEL *ssoA* DE pLS1

La DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (Spn PolI) está codificada por el gen *polA* de esta bacteria y pertenece a la familia A de polimerasas, en donde también se incluyen la DNA polimerasa I de *E. coli* (Eco PolI) y la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq Pol) (López y cols., 1989; Ito y Braithwaire, 1991). Estas tres enzimas poseen un dominio polimerasa encargado de catalizar la incorporación de dNTPs durante la síntesis de DNA (fragmentos de Okazaki, reparación del DNA, etc) y un dominio exonucleasa 5' → 3', cuya

función principal consiste en eliminar los pequeños fragmentos de RNA que ofician de cebadores durante la replicación cromosómica. Tanto Taq Pol, como Spn PolI carecen de la actividad correctora 3' → 5' detectada en Eco PolI (Díaz y cols., 1992a; Kornberg y Baker, 1992). Aunque la actividad exonucleasa 5' → 3' de Spn PolI es esencial para la viabilidad celular en *S. pneumoniae* (Díaz y cols., 1992b), se han conseguido estirpes mutantes, en donde esta función se encuentra disminuida. Además, se han generado mutantes que carecen del dominio polimerasa de este enzima, sin que ésto haya supuesto un efecto demasiado grave para la célula (Díaz y cols., 1992a).

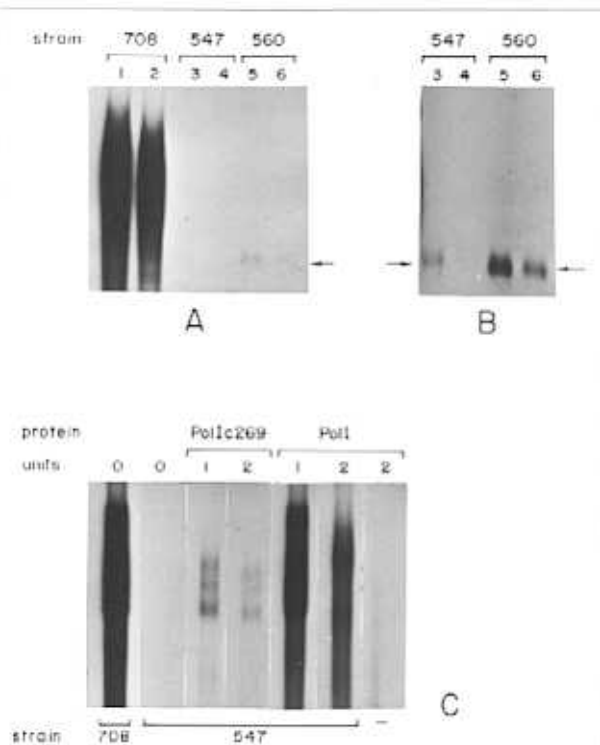
En un trabajo previo, Díaz y cols. (1994) habían demostrado la necesidad de la actividad polimerasa de Spn PolI en la replicación y establecimiento de plásmidos con el replicón de pLS1. Aquí se había visto que la transferencia de plásmidos como pLS1 o pLS5 a estirpes mutantes de *S. pneumoniae* que carecían de la actividad polimerasa de Spn PolI, experimentaba un descenso notable (aproximadamente 100 veces menos) respecto a los resultados de transformación plasmídica obtenidos con la cepa silvestre. También se observó una marcada inestabilidad segregacional de estos replicones ( $Lex = 0.1$ , para pLS1), así como una elevada acumulación intracelular de formas ssDNA (hasta 10 veces más que la acumulada en la estirpe silvestre) del plásmido pLS86 (un derivado de pLS1 que contiene un inserto de 5.2 kb del cromosoma de *S. pneumoniae*; López y cols., 1984), en las estirpes carentes de la actividad polimerasa de Spn PolI. Cuando se estudiaron los productos replicativos de este plásmido en dichos huéspedes, se encontraron además, dos puntos de discontinuidad en la síntesis de las cadenas líder y retrasada próximos a las secuencias *dso* y *ssdA* del mismo. Este hecho había sido interpretado por los autores, como una posible función de la actividad polimerasa de Spn PolI en el inicio de la replicación a partir del *dso*, así como al comienzo y/o al final de la replicación a partir del *ssdA*. Se había postulado además, que la actividad exonucleasa 5' → 3' era la encargada de asistir la terminación de la síntesis de la cadena complementaria mediante la eliminación del pRNA. Sin embargo, se había considerado más probable que fuese la DNA polimerasa III (Spn PolIII) la que realmente llevase a cabo el proceso íntegro, desde el principio, de síntesis de ambas cadenas plasmídicas, y que los efectos observados en las etapas iniciales de la replicación de estos plásmidos, en los huéspedes carentes de actividad polimerasa de Spn PolI, fueran causadas por el secuestro del holoenzima PolIII o de alguno de sus componentes, para cumplir las

funciones que normalmente lleva a cabo la PolII durante la replicación cromosómica (Díaz, 1993). Es decir, que PolIII o alguno de sus ensamblajes probablemente sustituirían en los mutantes *polA* al dominio polimerasa de Spn PolII, en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la replicación cromosómica y este hecho supondría una elevada utilización de PolIII, produciéndose una descoordinación entre las iniciaciones de la replicación de las dos hebras de DNA del plásmido y la posterior elengación por PolIII, aumentando la vida media de las moléculas que contienen un "nick" en el *dso* y las formas ssDNA plasmídicas que no han iniciado la síntesis de la cadena retrasada, dando lugar a su detección en los extractos celulares de DNA total (Díaz, 1993).

Con el fin de profundizar en la función que tendría Spn PolII en la síntesis de la cadena retrasada de pLS1, se realizaron ensayos de replicación *in vitro* utilizando extractos acelulares procedentes de dos estirpes de *S. pneumoniae* donde se había mutado el gen *polA*: MP547 y MP560. La primera de estas estirpes expresa un derivado de Spn PolII (PolIn351a) que carece de la actividad polimerasa (por inserción del gen *cat* de pC194 en el sitio *HindIII*, coordinada 1052, del gen *polA*; Díaz y cols., 1992b) y posee la actividad exonucleasa 5' → 3' disminuída en un 15%. La segunda presenta dos genes *polA* mutantes, uno integrado ectópicamente en el locus *malM* del cromosoma bacteriano, que codifica el derivado PolIn351b con actividad únicamente exonucleasa 5' → 3' (por delección del dominio polimerasa) y otro, presente en el locus *polA* que expresa el polipéptido PolIc269, con actividad solamente polimerasa (por delección del dominio exonucleasa), aunque disminuida al 20% (Díaz y cols., 1992b). Los extractos de ambas estirpes, así como el de la cepa silvestre (*S. pneumoniae* 708) se realizaron el mismo día, para evitar cualquier diferencia en las condiciones de ensayo o en la manipulación de uno respecto a los otros. La cantidad de sustrato monocatenario empleado (ssDNA aislado de pA-PLS1ssoA) fue la misma que se utilizó para los experimentos de replicación *in vitro* anteriores (150 ng). Se probaron dos concentraciones de extracto diferente (8 y 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de MP547 y MP560. Como control se llevó un ensayo realizado con el extracto silvestre (8 y 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), del cual ya se conocía el resultado replicativo (ver Fig. 35). Al cabo de 60 min de incubación, el DNA obtenido como producto de cada reacción se purificó y corrió en un gel de agarosa 0.8% durante 12 hs a 2.5 V/cm sin digestión enzimática previa, ya se quería comparar niveles de replicación total y aún no se sabía si el sistema de replicación de los mutantes permitiría la conversión

completa ss → dsDNA de al menos una parte del sustrato. Los resultados (Fig. 45A) pusieron de manifiesto la incapacidad presentada por los extractos de las estirpes mutantes para iniciar la síntesis de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1. Sin embargo, se pudo apreciar una pequeña diferencia en cuanto al nivel de replicación alcanzado por cada uno de los mutantes. Mientras que en los ensayos realizados con extractos procedentes de MP547 no se consiguió un grado detectable de replicación de la cadena retrasada, el nivel de incorporación de dNTPs promovido por MP560 fue un poco mayor, aunque muy por debajo del alcanzado por la estirpe silvestre (Fig. 45B). Esta mejor eficacia de síntesis de la cadena retrasada podía deberse al pequeño porcentaje de actividad polimerasa de PolIc269 (20% del enzima silvestre) presente en MP560, en cuanto que el derivado de Spn PolI presente en la estirpe MP547 (PolIn351a) no posee tal actividad.

Para verificar si este defecto se debía a la falta de los niveles apropiados de Spn PolI o solamente de su dominio polimerasa, se tomó el extracto que conseguía el menor grado de conversión del ssDNA de pA-pLS1ssoA (MP547; Fig. 45B) y se complementó con el dominio polimerasa de Spn PolI (PolIc269) o con el enzima completo (PolI) purificadas. Ambas proteínas se purificaron en el laboratorio de la Dra. P. López siguiendo el procedimiento descrito por Pons y cols., (1991). Para conseguir las condiciones de complementación del extracto celular más parecidas a la fisiológica, es decir, las unidades enzimáticas de Spn PolI que habrían en 240  $\mu\text{g}$  de extracto silvestre (esta cantidad corresponde al total de proteínas utilizadas por reacción), se calculó que era necesario aproximadamente 1 unidad de cada proteína (5.9  $\text{u}/\mu\text{g}$  para PolI y 8.3  $\text{u}/\mu\text{g}$  para PolIc269). Los cálculos realizados se basaron en los datos provistos por López y cols., (1989), en donde se había estimado el número de moléculas de Spn PolI por célula, en aproximadamente 500. Teniendo en cuenta que la cantidad (en gramos) de proteínas totales por célula es igual a  $1.2 \times 10^{-13}$  y que el peso molecular de Spn PolI predicho de acuerdo a su secuencia nucleotídica es 99.5 kDa, se pudo calcular la cantidad de esta enzima (en  $\mu\text{g}$ ) que estaría presente en los 240  $\mu\text{g}$  de extracto proteico empleados. Con este dato, y dado que se había conseguido una concentración de 65  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de Spn PolI purificada, que correspondía a 0.38  $\text{u}/\mu\text{l}$  (M. Amblar, comunicación personal), se obtuvo el valor final de las unidades de enzima necesarias para complementar cada extracto.



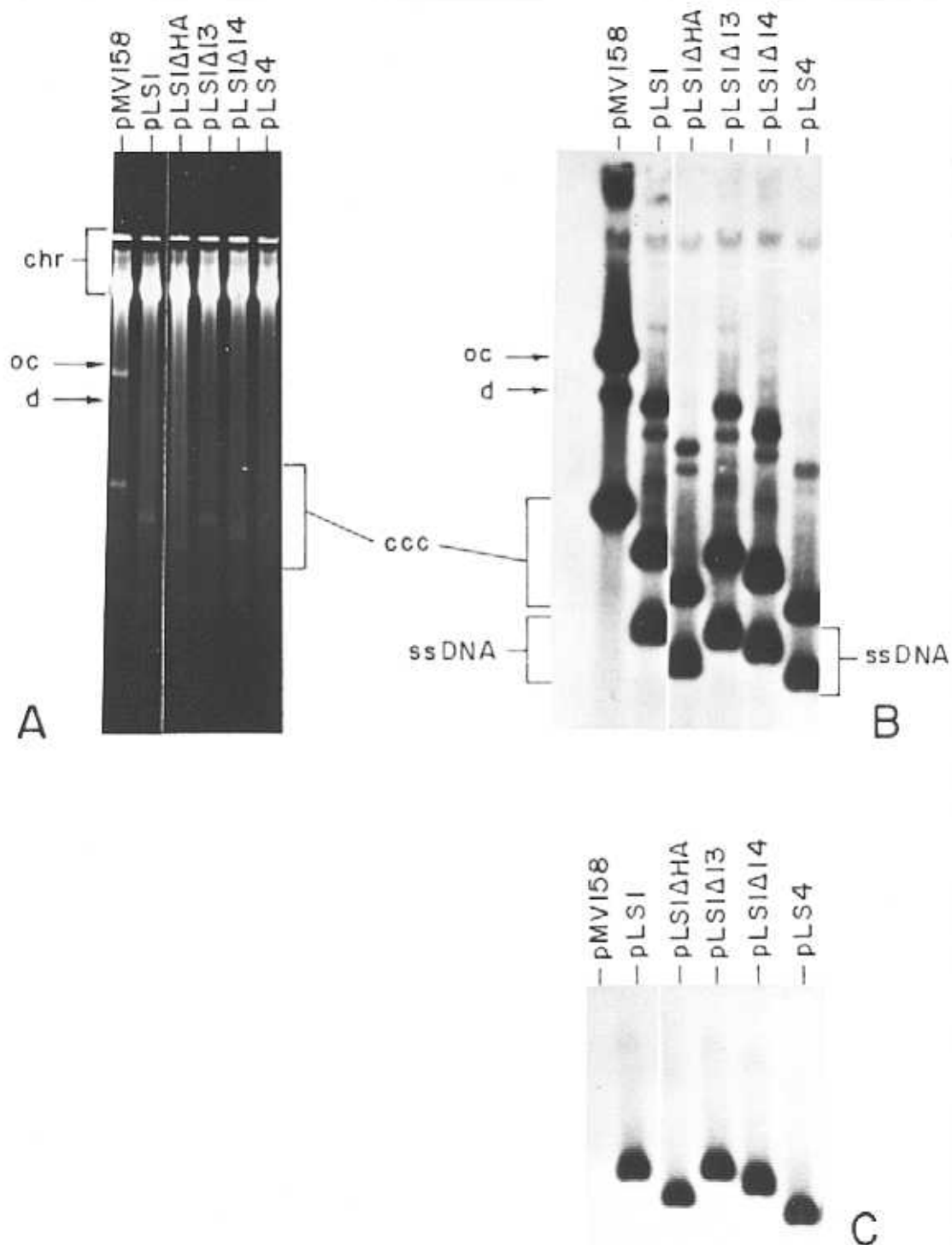
**Figura 45. Replicación *in vitro* a partir del *ssoA* de pLS1 en distintos sistemas de *S. pneumoniae*. A. Efecto de mutaciones en Spn Poll para la síntesis de la cadena retrasada de pLS1. Básicamente se siguió el procedimiento general de replicación empleado anteriormente, utilizando 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (calles 1, 3 y 5) y 16  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (calles 2, 4 y 6) de extractos preparados a partir de las estirpes silvestre (708) o mutadas MP547 (547) y MP560 (560) de *S. pneumoniae*. La estirpe MP547 carece de la actividad polimerásica de Spn Poll y posee la actividad exonucleasa 5'  $\rightarrow$  3' disminuída en un 15%. La estirpe MP560 presenta un 20% de actividad polimerasa de este enzima y niveles silvestres de actividad exonucleásica. Como sustrato se emplearon 150 ng del ssDNA aislado de pA-pLS1ssoA. El DNA se purificó de la mezcla de reacción y se sometió a electroforesis sin digestión enzimática previa, en un gel de agarosa 0.8%. Las flechas señalan la posición de los productos de replicación obtenidos con los extractos de las estirpes mutadas. B. Se presenta una parte de la autorradiografía sobreexpuesta del gel anterior. C. Complementación con Poll y Pollc269. Los ensayos de replicación con los extractos de las estirpes salvaje (708) y mutante (547) de *S. pneumoniae* (8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se realizaron utilizando el ssDNA de pA-pLS1ssoA y se continuó el mismo procedimiento anterior. En los casos donde se indica, se complementó el extracto con 1 o 2 unidades del dominio polimerasa de la Poll purificado (Pollc269) o con el enzima completo (Poll, dominios polimerasa + exonucleasa 5'  $\rightarrow$  3').**

Las variaciones en el procedimiento general de replicación *in vitro*, empleando el sistema de *S. pneumoniae*, fueron las siguientes: antes de comenzar las reacciones, se calentó el sustrato ssDNA a 90 °C durante 3 min para eliminar la asociación de posibles cebadores de la replicación que pudiesen haber sido copurificados con el ssDNA; el extracto, el tampón

de reacción y la PolI o PolIc269 se incubaron durante 5 min en hielo; luego se añadió el [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (10  $\mu$ Ci) y por último, el ssDNA. Se mezcló suavemente y se incubó durante 60 min a 32 °C, purificándose a continuación el producto DNA, el cual se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.8%. Los resultados del autorradiograma de dicho gel se presentan en la Figura 45C. Cuando se complementaron 240  $\mu$ g de extracto procedente de MP547 con 1 unidad del dominio polimerasa de Spn PolI (PolIc269) o con el enzima completo (PolI), se consiguieron los mejores niveles de replicación, ya que si se utilizaban 2 unidades, los niveles bajaban considerablemente. La adición de PolIc269 a la reacción incrementa bastante los niveles de incorporación de dNTPs respecto a la reacción sin complementar (calles 2 y 3, Fig. 45C), pero cuando se agregó PolI, el grado de replicación obtenido fue muy superior y equiparable al conseguido por la estirpe silvestre, indicando que ambas actividades enzimáticas (polimerasa y exonucleasa) son necesarias para obtener los mejores índices replicativos. Los primeros datos coinciden con los observados previamente *in vivo* en *S. pneumoniae* (Díaz y cols., 1994) y los segundos, ponen de manifiesto la participación directa del enzima PolI completo en la iniciación de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1, además de otros factores del huésped como por ejemplo la RNAP, dado que si no se agrega extracto proteico a la reacción, la PolI pura es incapaz de iniciar por sí sola la síntesis de esta cadena sobre un sustrato ssDNA conteniendo este origen de replicación (calle 7, Fig. 45C).

## 7. FUNCIÓN DEL *ssoA* DE pLS1 EN *B. subtilis*

Al iniciar este trabajo, se sabía que, contrariamente con lo que sucede en *S. pneumoniae*, el *ssoA* de pLS1 es poco o nada funcional en otros huéspedes como *B. subtilis* y *E. coli* (del Solar y cols., 1987a). En *B. subtilis*, la cantidad de ssDNA acumulado tanto por pLS1 como por pLS4 ( $\Delta$ *ssoA*) en cultivos creciendo exponencialmente, es alta y parecía ser prácticamente la misma en ambos casos (del Solar y cols., 1987a; Fig. 46B y C). Sin embargo, cuando se cuantificó el contenido en formas ss y dsDNA de cada plásmido, presentes en muestras de DNA total procedentes de extractos de células que contenían dichos replicones y se calculó la relación ss/dsDNA en cada caso, se pudo valorar una pequeña pero significativa diferencia entre ambos, siendo esta relación para pLS4 1.5 veces más alta que



**Figura 46.** Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pMV158 y sus derivados en *B. subtilis*. El DNA total procedente de células que contienen los plásmidos indicados se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y se visualizó mediante tinción con EtBr (A). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa con (B) o sin (C) desnaturalización previa. Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Se indican las formas de DNA plasmídico monomérico monocatenario (ssDNA) y bicatenario: oc y ccc. En este huésped se hacen evidentes unas bandas por debajo de los oc que corresponden a formas diméricas del plásmido (d). chr: DNA cromosómico.

la de pLS1 (Tabla 8). Estos resultados permiten concluir entonces, la existencia de una funcionalidad mínima del *ssoA* de pLS1 en *B. subtilis*. Por otro lado, el nivel de ssDNA de pMV158 acumulado en este huésped es prácticamente nulo, indicando que en el fragmento *EcoRI* B delecionado para dar lugar a su derivado pLS1 (ver Fig. 11), se podría encontrar una señal muy eficiente de conversión ss → dsDNA (Fig. 46). Al analizar la cantidad de ssDNA intracelular acumulado por pLS1Δ13 y pLS1Δ14 en *B. subtilis*, no nos sorprendió observar que los niveles ss/dsDNA de ambos replicones presentan un valor intermedio entre los calculados para pLS1 y pLS4. Por otro lado, el grado de acumulación de ssDNA de pLS1ΔHA es a penas perceptiblemente mayor que el de pLS4, aunque curiosamente, muestra un grado de inestabilidad segregacional semejante al presentado por pLS1Δ13 y pLS1Δ14 (Fig. 47; Tabla 8). La inestabilidad de estos dos últimos plásmidos, así como la de pLS4 podría deberse a la deleción parcial o total del *ssoA*, como habíamos visto que sucede en pneumococos, mientras que la inestabilidad de pLS1ΔHA podría estar asociada a la secuencia nucleotídica presente en el fragmento *HindIII* (3279) - *AflIII* (4022) de pLS1, delecionado en este plásmido (ver Fig. 14).

En pUB110 se habían descrito cuatro zonas, denominadas BA (BA1, BA2, BA3 y BA4) que incluían puntos de unión del plásmido a la membrana de *B. subtilis* y eran necesarias para la replicación normal del mismo. Además, se había visto que algunas de estas regiones BA contienen una secuencia de 7 nucleótidos (5'-TTGCTGA-3'), la cual se encuentra repetida siete veces en el genoma plasmídico, distribuída de la siguiente forma: una en la región BA 1, dos en BA 3, tres próximas a los extremos de BA 3 y una fuera de las regiones BA. La deleción de uno de los dos heptanucleótidos repetidos en BA 3 impedía su actuación como región de anclaje plasmídico a la membrana bacteriana (Tanaka y Sueoka., 1983; McKenzie y cols., 1986). En el fragmento *HindIII* - *AflIII* de pLS1 se encuentra una secuencia idéntica a los heptanucleótidos presentes en pUB110. Esta secuencia está repetida tres veces dentro de dicho fragmento. Ésto podría estar indicando que la estabilidad segregacional de pLS1 observada en este huésped se deba, en parte, a la presencia de estas secuencias nucleotídicas, mientras que la inestabilidad detectada en pLS1ΔHA podría estar relacionada con la carencia de las mismas.

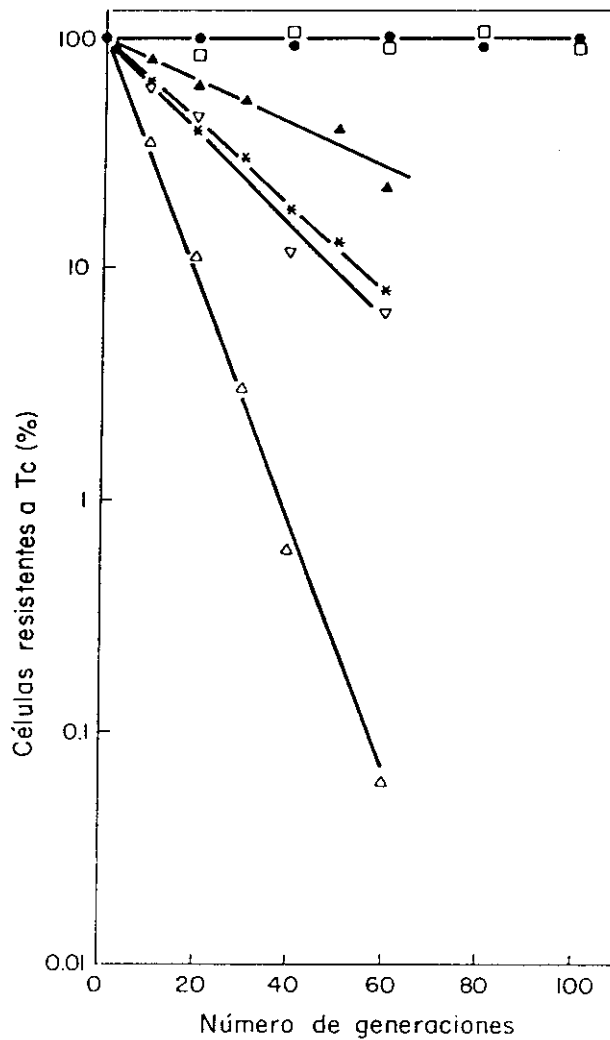


Figura 47. Estabilidad segregacional de los derivados delecionados de pLS1 en *B. subtilis*. Los cultivos de esta bacteria conteniendo plásmidos se crecieron en medio líquido sin antibiótico durante las generaciones indicadas. Mediante recuento en placas se calcularon los porcentajes de células resistentes a Tc y se representaron en función del número de generaciones en ausencia de presión selectiva. Como control se analizó simultáneamente la estabilidad de pMV158, pLS1 y pLS4. Símbolos: pMV158 (●), pLS1 (▲), pLS1Δ13 (\*), pLS1Δ14 (▼), pLS1ΔHA (□), pLS4 (○).

En ningún caso parece haber una relación causal entre el número de copias de los plásmidos estudiados (Tabla 8) y su estabilidad segregacional, ya que tanto pLS1 como sus derivados mantienen un mismo valor de copias promedio en esta población (alrededor de 4 copias/equivalente cromosómico). Por otro lado, si los heptanucleótidos repetidos, presentes en el fragmento *Hind*III - *Afl*III de pLS1 estaban relacionados de alguna forma con la estabilidad del plásmido en este huésped, queda claro que por sí solas, estas secuencias no son suficientes para determinar dicha característica fenotípica, ya que los plásmidos pLS1Δ13

y pLS1Δ14 poseen el heptanucleótido repetido tres veces en su genoma, pero siguen siendo inestables en esta población. Es posible entonces, que tanto estas secuencias, como la integridad de la señal *ssoA*, estén implicadas de una forma conjunta en el mantenimiento estable de estos replicones, ya que pLS4, que carece de ambas regiones, es de todos, el plásmido que se pierde con mayor rapidez en la población estudiada (esta cuestión se tratará con más detalle en la Discusión).

**Tabla 8.** Número de copias, relación molecular ss/dsDNA y estabilidad de pMV158 y sus derivados en *B. subtilis*

Plásmido	Número de copias <sup>a</sup>	ss/dsDNA	Lex <sup>b</sup>
pMV158	7 ± 3	< 0.001	< 0.004
pLS1	4 ± 1	0.67 ± 0.09	< 0.004
pLS4	4 ± 1	1.02 ± 0.05	0.1
pLS1ΔHA	4 ± 1	1.14 ± 0.10	0.045
pLS1Δ13	4 ± 1	0.87 ± 0.02	0.02
pLS1Δ14	4 ± 1	0.75 ± 0.07	0.042

(a) Medido como dsDNA (ccc + oc)

(b) Frecuencia de pérdida plasmídica por generación (para su cálculo, ver Métodos)

## 8. El *ssoU* DE pMV158

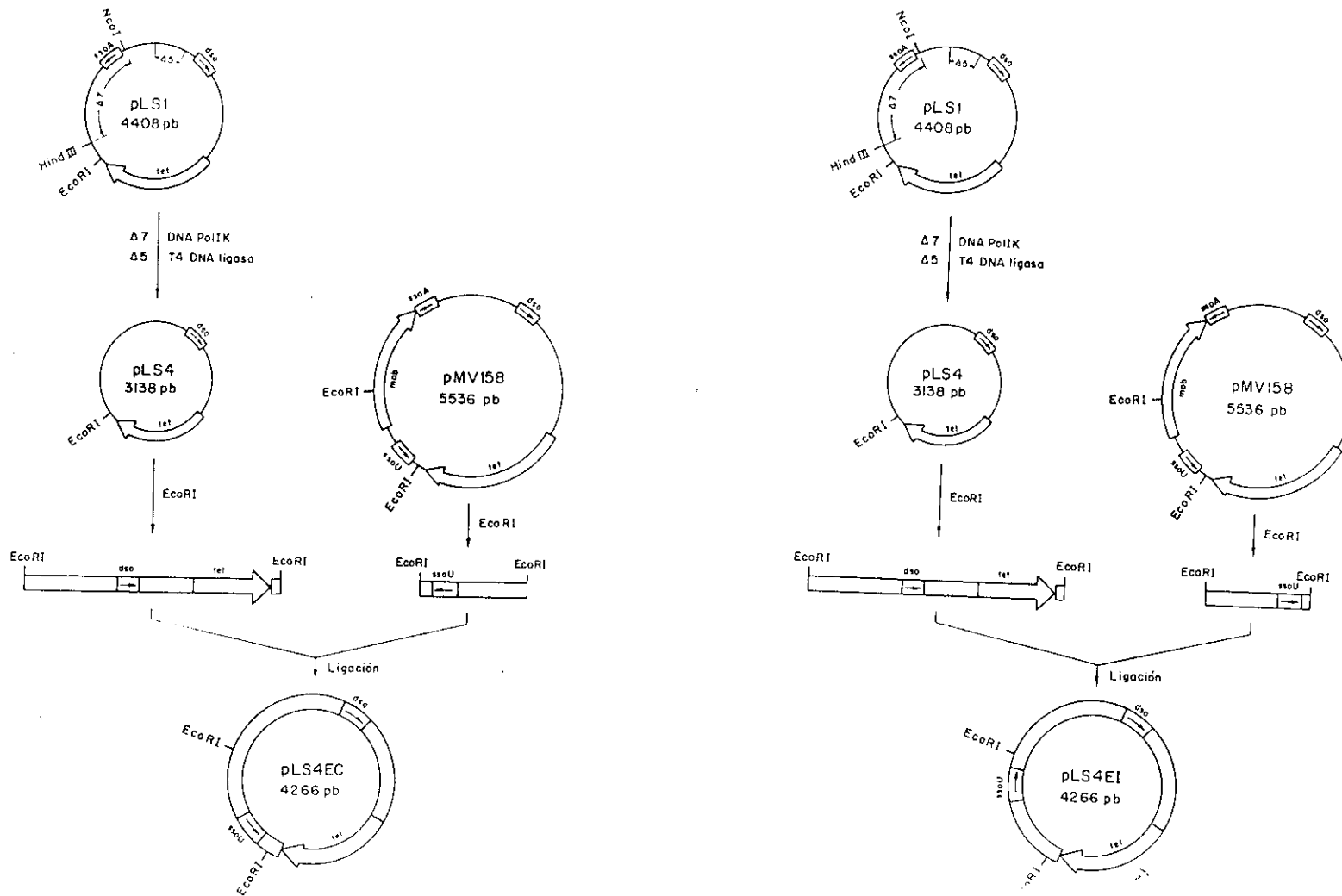
El *ssoU* de pUB110 había sido definido en un fragmento de 277 pb comprendido entre las coordenadas 1523 y 1246 de dicho plásmido (Boe y cols., 1989; ver Fig. 3). Esta región presenta un grado de identidad del 97% con una secuencia presente entre los nucleótidos 3228 y 3500 de pMV158 (Priebe y Lacks, 1989; ver Apéndice). Con el fin de determinar si esta secuencia actuaba como señal de iniciación de la cadena retrasada en pMV158 al igual que su homóloga lo hacía en pUB110, se construyeron dos plásmidos derivados del primero que sólo contuvieran el putativo *ssoU* clonado en las dos orientaciones posibles. Para ello,

se insertó el fragmento *EcoRI* B de pMV158 (coordenadas 3170 a 4298) en el único sitio *EcoRI* (3170) de pLS4. Este fragmento de 1128 pb, ausente en pLS1, comprende además del *ssoU*, la región promotora y parte del gen *mobM* de pMV158 (ver Fig. 11). El derivado de pLS4 que contenía esta secuencia clonada en la misma orientación que su plásmido parental se denominó pLS4EC y el que la tenía en la orientación inversa, pLS4EI (Fig. 48). Estas construcciones se utilizaron para analizar el comportamiento de este *ssoU* en diferentes huéspedes, así como para realizar un estudio comparativo entre el funcionamiento de los dos tipos de *sso* presentes en pMV158.

### 8.1. Análisis comparativo entre la función del *ssoA* y *ssoU* de pMV158 en diferentes bacterias

El primer huésped en donde se ensayó la funcionalidad del *ssoU* de pMV158 fue *S. pneumoniae*. Para ello, se transformaron células competentes de esta bacteria con el DNA de los plásmidos pLS4EC y pLS4EI y los clones seleccionados se crecieron en medio líquido con Tc para estudiar su contenido plasmídico. Una muestra del DNA total procedente de los extractos realizados con cada cultivo, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, en donde las diferentes formas plasmídicas se detectaron mediante hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Como control, se llevaron muestras de DNA total procedentes de extractos de pneumococos conteniendo los plásmidos pMV158, pLS1 y pLS4.

Ya habíamos comentado que pMV158 (*ssoA* + *ssoU*) y pLS1 (*ssoA*) acumulan la misma cantidad de ssDNA en este huésped y que se segregan de forma estable en esta población bacteriana durante al menos 60 generaciones. Esta equidad fenotípica había sido interpretada como la posible ausencia de función del *ssoU* en *S. pneumoniae* o, que este origen fuera dispensable cuando el *ssoA* se encontrara presente en el mismo replicón (del Solar, 1991; del Solar y cols., 1993a). Sin embargo, cuando se analizó el contenido de ssDNA plasmídico en las preparaciones que contenían las nuevas construcciones, se vio que pLS4EC era tan eficiente como pLS1 en la conversión ss → dsDNA, dado que ambos plásmidos acumularon un nivel similar y muy bajo de formas monocatenarias (Fig. 49). Ésto



**Figura 48. Construcción de los plásmidos pLS4EC y pLS4EI.** Se digirieron 1  $\mu$ g del DNA de pLS4 y 3  $\mu$ g de pMV158 con *EcoRI*. Los productos de este último se corrieron en un gel preparativo de agarosa 1%, a partir del cual se purificó el fragmento pequeño (1128 pb). Éste y el DNA de pLS4 digerido se ligaron en una proporción 1:1 en moléculas. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *S. pneumoniae*, desde donde se aislaron los recombinantes. Se muestra la dirección de replicación a partir de los orígenes correspondientes (recuadro blanco) y de la transcripción de los genes (flechas anchas). Se indican los sitios de restricción más relevantes.

indica en primer lugar, que la secuencia homóloga al *ssuU* de pUB110 presenta en pMV158 también una homología funcional, ya que actúa como origen de replicación de la cadena retrasada. En segundo lugar, quedaba demostrado que el *ssuU* de pMV158 funciona en *S. pneumoniae*, de forma independiente y con la misma eficiencia que la del *ssuA*. La presencia del *ssuU* en pLS4 conseguía además, reestablecer su número de copias al valor original de su parental pLS1 y estabilizarlo en la población bacteriana (Tabla 9). Por el contrario, pLS4EI se comporta prácticamente igual que pLS4 en cuanto a estas tres variables, indicando que, al igual que en pUB110, el *ssuU* de pMV158 funciona sólo en una orientación adecuada para su replicación.

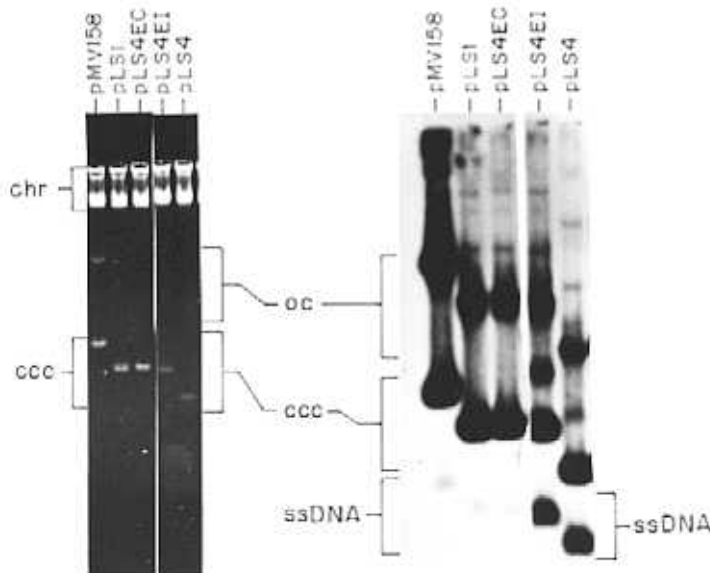


Figura 49. Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pLS4EC y pLS4EI en *S. pneumoniae*. El DNA total procedente de extractos de células de pneumococos que contienen los plásmidos indicados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% teñido con EtBr (A). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa con desnaturalización previa (B). Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Se señalan las formas de DNA monomérico monocatenario (ssDNA) y bicatenario: oc y ccc. chr: DNA cromosómico.

A continuación, se analizó el contenido intracelular de las formas ssDNA generadas por los plásmidos pLS4EC y pLS4EI en *B. subtilis* y en *S. aureus*. Para ello, se procedió igual que en el caso anterior. En los capítulos previos habíamos visto que, *in vivo*, el *ssuA* de pMV158 actúa de forma poco eficiente como señal de iniciación de la cadena retrasada del plásmido en ambos huéspedes y que existían evidencias que indicaban una mejor

actuación del *ssoU* de pMV158 en *B. subtilis*. Este último supuesto se confirmó con los resultados conseguidos en la Figura 50A. Aquí se vio que la cantidad de formas ssDNA acumuladas por pLS4EC es indetectable en dicho huésped. Además, la relación ss/dsDNA es idéntica a la calculada para pMV158 (Tabla 9), indicando que el *ssoU* de este plásmido es una señal mucho mejor reconocida por esta bacteria que el *ssoA*. El *ssoU* clonado en pLS4 consiguió reestablecer la estabilidad segregacional perdida de dicho plásmido en este huésped, mientras que pLS4EI mantuvo un comportamiento análogo, en cuanto a estas dos características fenotípicas, que el de su parental pLS4. Por otro lado, el mismo análisis realizado en *S. aureus*, puso de manifiesto una serie de resultados similares a los previamente comentados. Cuando se calculó la proporción de DNA monocatenario generado por pLS4EC y pLS4EI en extractos celulares de estafilococos, se vio que, al igual que lo que sucedía en *B. subtilis*, sólo el primero de estos plásmidos se asemejó a pMV158, mientras que el segundo presentó una relación ss/dsDNA igual que la de pLS4 (Fig. 50B; Tabla 9). Estos datos permiten concluir que, tanto en *B. subtilis* como en *S. aureus*, la señal de conversión principal del ssDNA de pMV158 es el *ssoU* y por lo tanto, su función no se restringe a un solo huésped como sucede con el *ssoA* del mismo plásmido.

**Tabla 9.** Número de copias, relación molecular ss/dsDNA y estabilidad de pMV158 y sus derivados en distintos huéspedes

Plásmido	<i>S. pneumoniae</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>S. aureus</i>		
	N.copias	ss/dsDNA	Lex	N.copias	ss/dsDNA	Lex	N.copias	ss/dsDNA	Lex
pMV158	36 ± 6	0.005	< 0.004	7 ± 3	< 0.001	< 0.004	7 ± 3	< 0.001	< 0.004
pLS1	22 ± 2	0.0065	< 0.004	4 ± 1	0.67	< 0.004	4 ± 2	0.5	0.025
pLS4	11 ± 3	0.34	0.1	4 ± 1	1.02	0.1	ND <sup>c</sup>	ND	ND
pLS4EC	20 ± 4	0.007	< 0.004	5 ± 1	< 0.001	< 0.004	5 ± 3	< 0.001	< 0.004
pLS4EI	12 ± 4	0.30	0.1	4 ± 1	0.9	0.05	4 ± 2	0.5	ND

(a) Medido como dsDNA (ccc + cc)

(b) Frecuencia de pérdida plasmídica por generación (para su cálculo, ver Métodos)

(c) No determinado

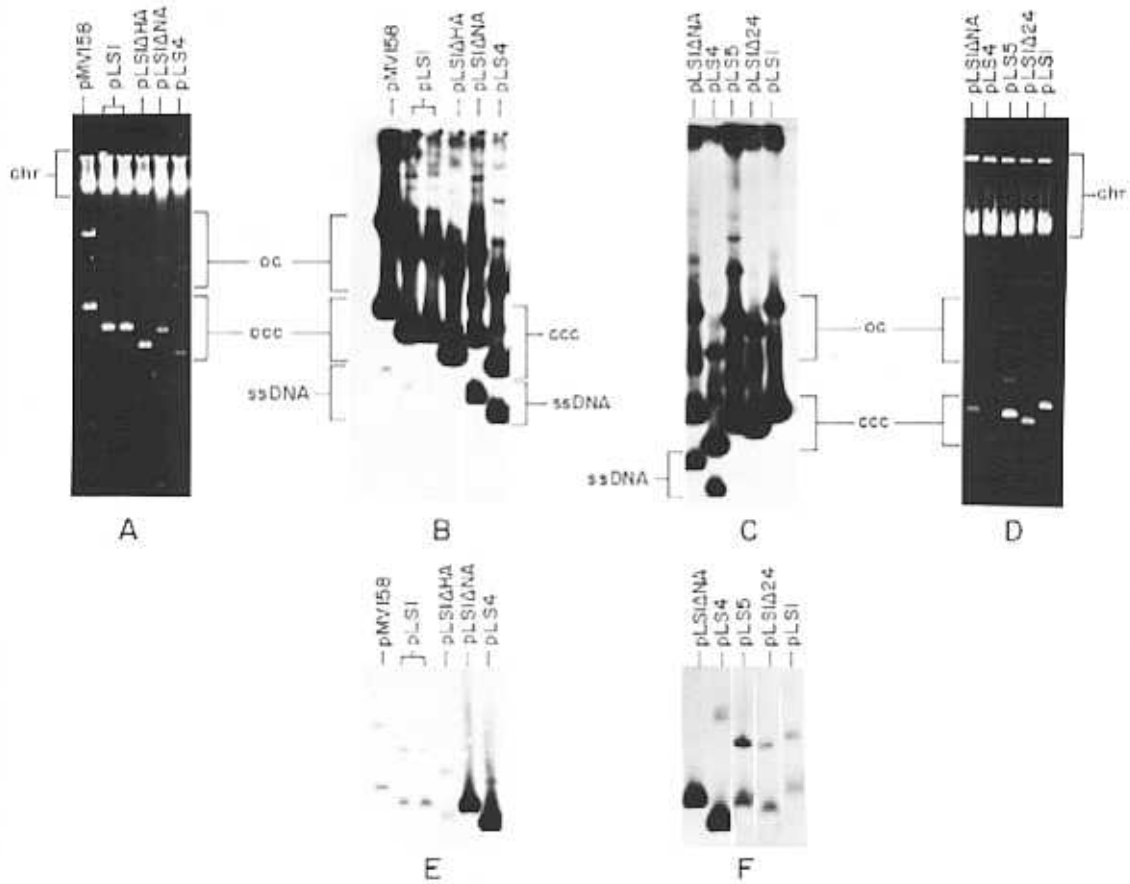


Figura 15. Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pLS1 y sus derivados en *S. pneumoniae*. El DNA total procedente de extractos crudos de células de pneumococos conteniendo los plásmidos indicados se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.7%, el cual se reveló por tinción con EtBr (A y D). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa con (B y C) o sin (E y F) desnaturalización previa; aquí se muestra la parte del gel que contiene el ssDNA plasmídico. Las formas plasmídicas transferidas se detectaron por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Los autorradiogramas E y F han sido sobreexposados para revelar las débiles bandas correspondientes al DNA monocatenario (ssDNA) generado por los plásmidos pMV158, pLS1, pLS1ΔHA, pLS5 y pLS1Δ24. Se indican las formas de DNA plasmídico monomérico bicatenario: oc (circulares abiertas, que probablemente se solapan o estén muy cercanas a formas diméricas minoritarias del mismo) y ccc (circulares covalentemente cerradas, superenrolladas). chr: DNA cromosómico.

Estos resultados permiten deducir una implicación importante de la secuencia y/o estructura secundaria del  $RS_B$  en la funcionalidad del *ssdA* de pLS1. Sin embargo, estos datos no descartan que lo realmente necesario sea una estructura global específica de este origen de replicación, más allá de una secuencia o estructura localizada. La predicción del plegamiento más estable de la región *AflIII* - *NcoI* de estos dos plásmidos, evidenció una clara alteración de la totalidad de la horquilla y un aumento de las zonas desapareadas, aunque la región CS-6 se mantiene en un entorno similar que en el plásmido silvestre (Fig. 18).

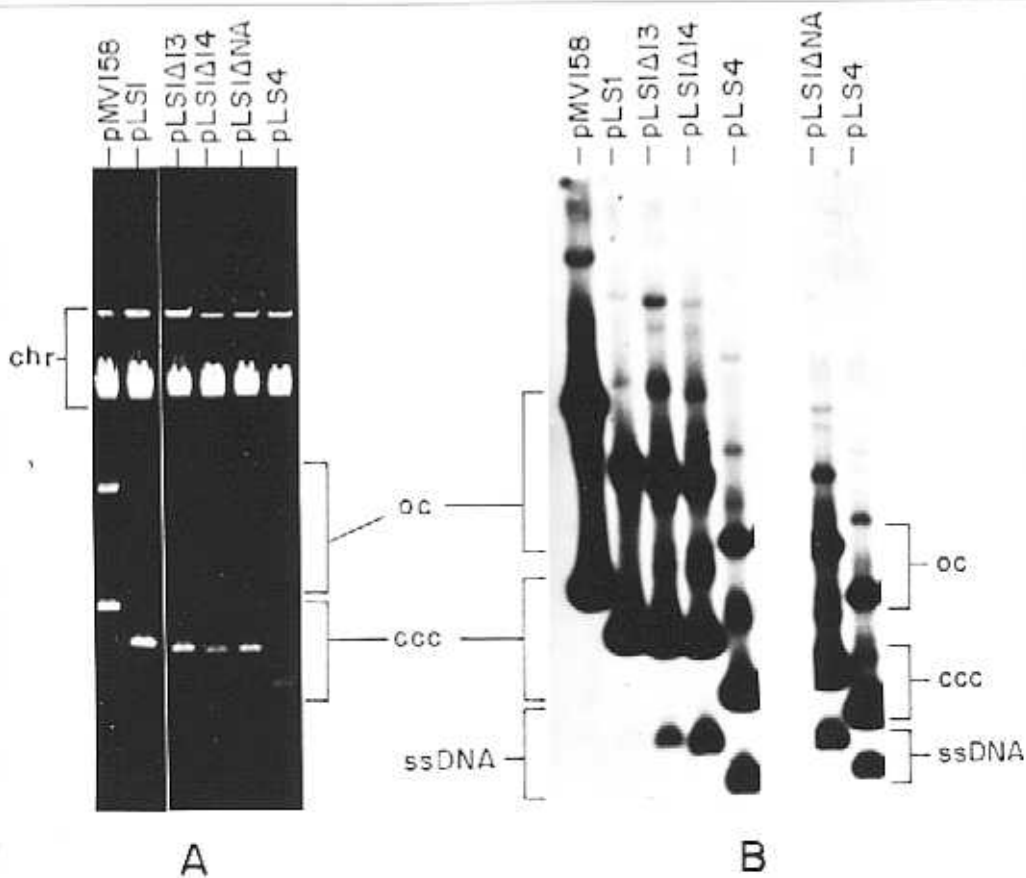


Figura 17. Número de copias y acumulación intracelular de ssDNA de pLS1Δ13 y pLS1Δ14 en *S. pneumoniae*. Preparaciones de DNA total de células de pneumococos que contienen los plásmidos indicados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y se reveló por tinción con EtBr (A). El DNA, desnaturalizado previamente, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (B) y se detectó por hibridación con una sonda de pLS1 marcada radiactivamente. Se indican las formas de DNA plasmídico bicatenario: oc (circulares abiertas) y ccc (circulares covalentemente cerradas, superenrolladas) y las de DNA monocatenario (ssDNA). chr: DNA cromosómico.

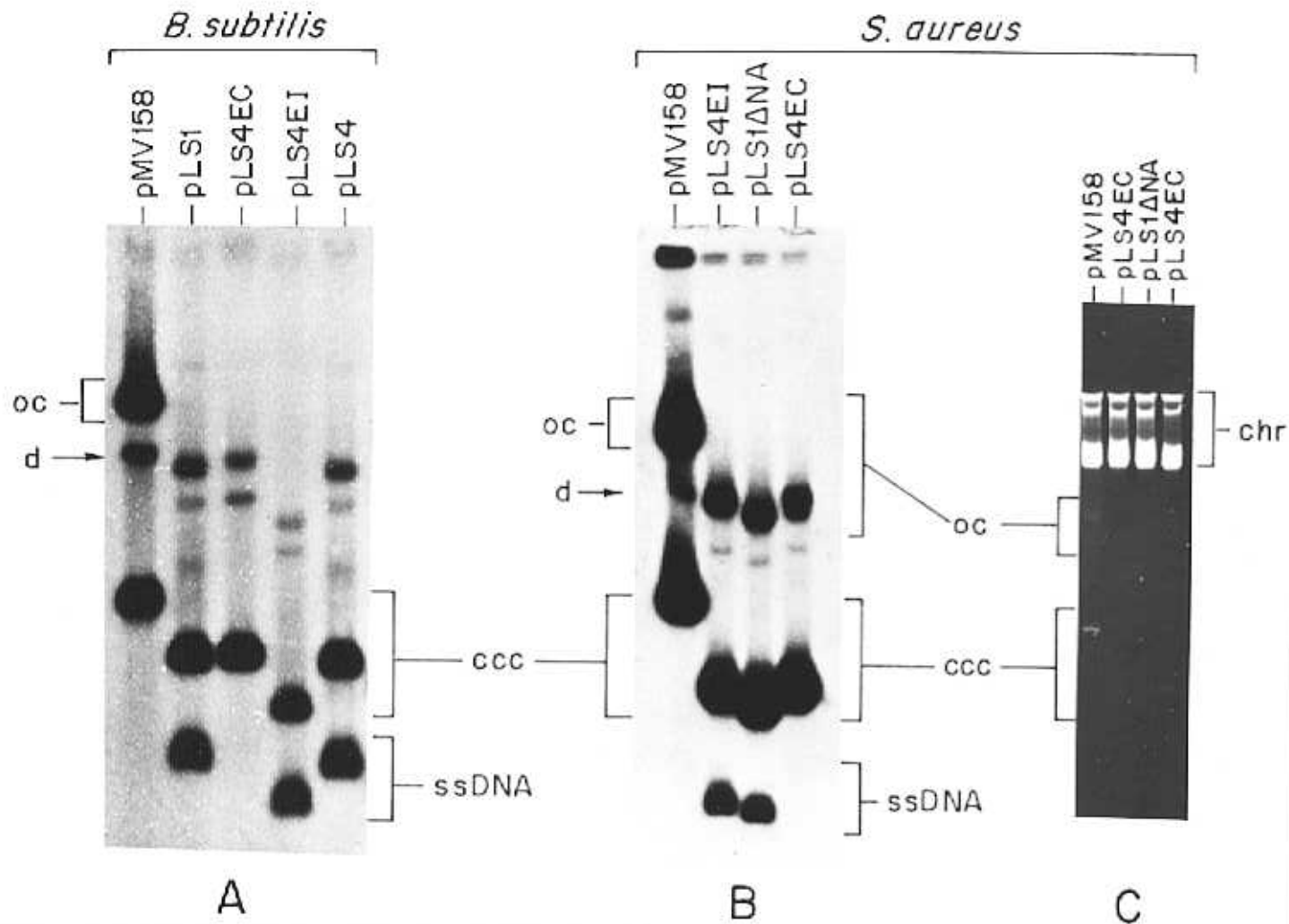
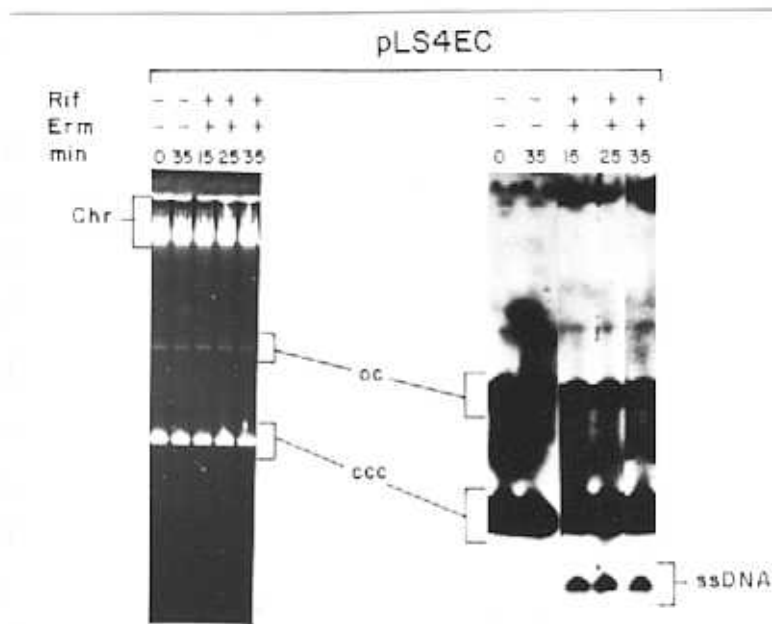


Figura 50. Acumulación de ssDNA de pLS4EC y pLS4EI en *B. subtilis* y *S. aureus*. El DNA total de cultivos de *B. subtilis* y estafilococos que contienen los plásmidos indicados se corrió en un gel de agarosa 0.7% teñido con EtBr (C). El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se procedió de la misma forma anterior para visualizar las formas plasmídicas transferidas (A y B). En ambos huéspedes pueden verse por debajo de las formas oc (circulares abiertas), formas diméricas bicatenarias del plásmido (d), ccc: monómeros circulares superenrollados. chr: DNA cromosómico.

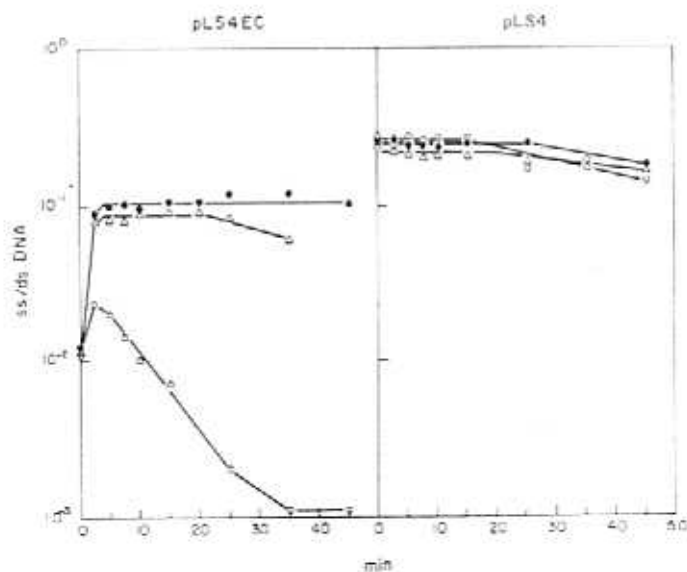
## 8.2. La RNAP inicia la replicación a partir del *ssoU*

En estudios anteriores se había visto que la RNAP de *B. subtilis* era la responsable de iniciar la síntesis de la cadena retrasada a partir del *ssoU* de pUB110 (Boe y cols., 1989). Por ello, se suponía que la replicación a partir del *ssoU* de pMV158 contaría con un mecanismo similar, incluso en otros huéspedes. Para comprobarlo se analizó el efecto de la inhibición de la RNAP en *S. pneumoniae* con rifampicina (Rif) durante la replicación de pLS4EC. El procedimiento empleado fue el mismo que se utilizó para estudiar el mecanismo de iniciación a partir del *ssoA*. En este caso también se inhibió la síntesis proteica con Erm, con el fin de mantener una cantidad de DNA plasmídico constante previniendo próximas rondas de replicación a partir del *dso*.

Los resultados obtenidos (Fig. 51A) indicaron que la RNAP de pneumococos también está implicada en la síntesis del RNA cebador de la cadena complementaria de este plásmido, ya que en las muestras tratadas con ambos antibióticos la cantidad de formas ssDNA de pLS4EC experimentó un rápido ascenso, así como la relación ss/dsDNA del mismo (Fig. 51B). Por otro lado, ya habíamos visto que el tratamiento con Rif de las muestras que contenían pLS4 no provocaba ningún cambio significativo en la acumulación de las formas ssDNA del plásmido, poniendo de manifiesto que la RNAP de *S. pneumoniae* reconoce de forma específica, tanto el *ssoA* como el *ssoU* de pMV158. La adición conjunta de Rif y Erm a los cultivos en crecimiento exponencial conteniendo pLS4EC, produjo un incremento más alto en la proporción de ssDNA plasmídico acumulado en estas células, que el conseguido tras el tratamiento sólo con Rif (Fig. 51B). Aunque esta diferencia fue muy baja, puede que fuera causada por una actividad residual de la proteína RepB, presente todavía en el cultivo después de la adición de Erm. Estas moléculas proteicas podrían iniciar la replicación a partir del *dso* incrementando así el nivel de ssDNA generado por el plásmido, que a su vez no podría ser convertido a dsDNA debido a la presencia de Rif en el medio.



A



B

Figura 51. Efecto de la rifampicina en la conversión  $ss \rightarrow dsDNA$  a partir del  $ssO$  de pMV158 en *S. pneumoniae*. A. Un cultivo en crecimiento exponencial de pneumococos que contiene el plásmido pLS4EC fue tratado (+) o no (-) con rifampicina (Rif) y eritromicina (Erm). A los tiempos indicados (min) se tomaron muestras del mismo y se analizó el contenido en DNA plasmídico. B. Se cuantificó el contenido en  $ss$  y  $dsDNA$  (oc + ccc) de pLS4EC, graficándose la relación  $ss/dsDNA$  en función del tiempo de tratamiento con uno o ambos antibióticos juntos. También se representa la relación  $ss/dsDNA$  de pLS4 en función del tiempo de tratamiento con los antibióticos indicados. Símbolos: Rif (○), Erm (□), Rif + Erm (●).

### 8.3. Iniciación de la replicación a partir del *ssoU*

El sitio concreto del *ssoU* de pMV158 a partir del cual la síntesis de la cadena retrasada tiene lugar durante la replicación del plásmido, se determinó de la misma forma que para el *ssoA*, siguiendo el esquema de trabajo presentado en la Figura 30. Dado que el *ssoU* constituía una señal perfectamente reconocible en estafilococos y que se disponía de extractos proteicos de esta bacteria, se utilizó el sistema de *S. aureus* para realizar los ensayos de replicación *in vitro*. Para conseguir un sustrato de DNA monocatenario que llevase el *ssoU* de este plásmido, se clonó el fragmento *EcoRI* B de pMV158 en el único sitio *EcoRI* del fagémido pALTER-1, presente en la región de clonaje múltiple. Este fragmento podía insertarse en una u otra orientación en el vector. Mediante digestión con *DraI*, se seleccionó el recombinante que tenía el *ssoU* correctamente ubicado, de tal forma que se encontrara en el ssDNA generado a partir del mismo, tras la superinfección con el fago "helper" RK408 (ver Métodos). El fagémido recombinante resultante se denominó pA-pMV158ssoU.

En primer lugar, se determinó la concentración de extracto proteico necesaria para conseguir los mejores niveles replicativos. Para ello, se estudió el grado de incorporación del [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP presente en el tampón de reacción, durante la síntesis de la cadena complementaria a partir de 150 ng del ssDNA de pA-pMV158ssoU, cuando se emplearon 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto y un tiempo de incubación de 60 min. Los mejores resultados se obtuvieron con 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteínas del extracto (Fig. 52). Estas condiciones permitían a su vez que la síntesis de la cadena complementaria a partir de este sustrato se completara en buena parte, dado que se observó una sola banda, intensa y bastante definida, tras la digestión de los productos de la reacción con *HindIII*.

Como habíamos explicado anteriormente, era preciso conseguir las condiciones en que la mayor parte de las moléculas ssDNA estuvieran parcialmente bicatenarias, para poder realizar el ensayo que nos permitiría determinar el sitio de inicio de la cadena retrasada desde el *ssoU*. Para ello, se analizó el grado de replicación conseguido a diferentes tiempos utilizando el mismo sustrato ssDNA y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto en cada reacción. Los resultados obtenidos (Fig. 53) indicaron que a los 10 min ya existía una alta proporción de este tipo de

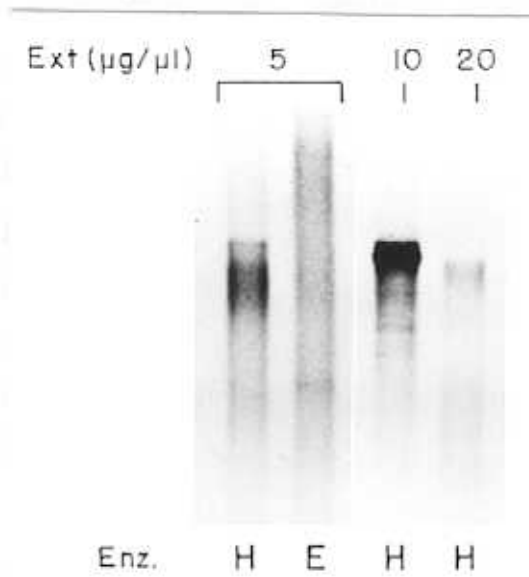


Figura 52. Replicación *in vitro* a partir del *ssuU* de pMV158. Se utilizó el sistema de replicación de *S. aureus* y se emplearon como sustrato 150 ng del ssDNA de pA-pMV158*ssuU* con las concentraciones de extracto proteico (Ext) indicadas. El DNA producto de cada reacción se purificó y digirió con *HindIII* (H) o *EcoRV* (E). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 0.8%. Se presenta el autorradiograma del gel secado al vacío.

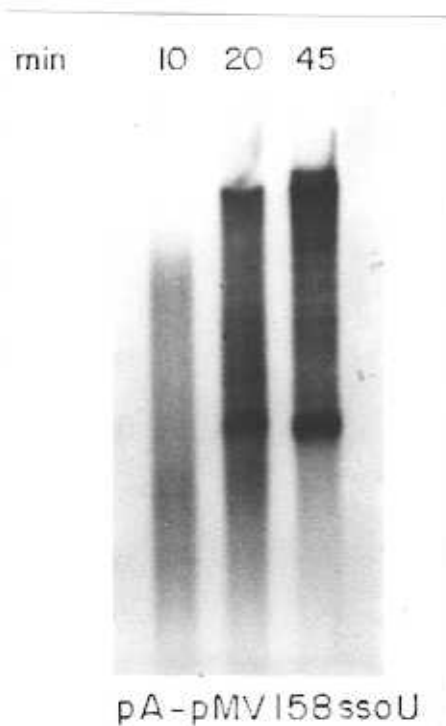
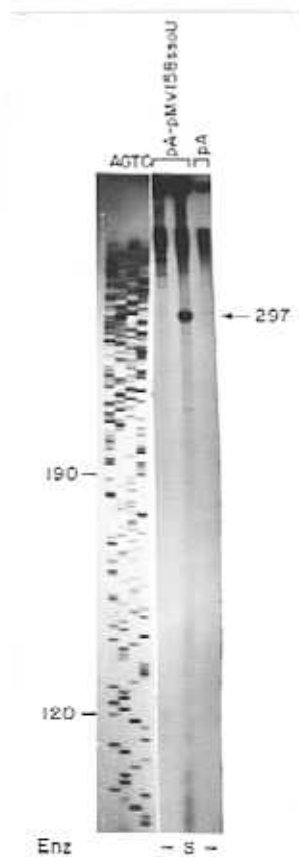


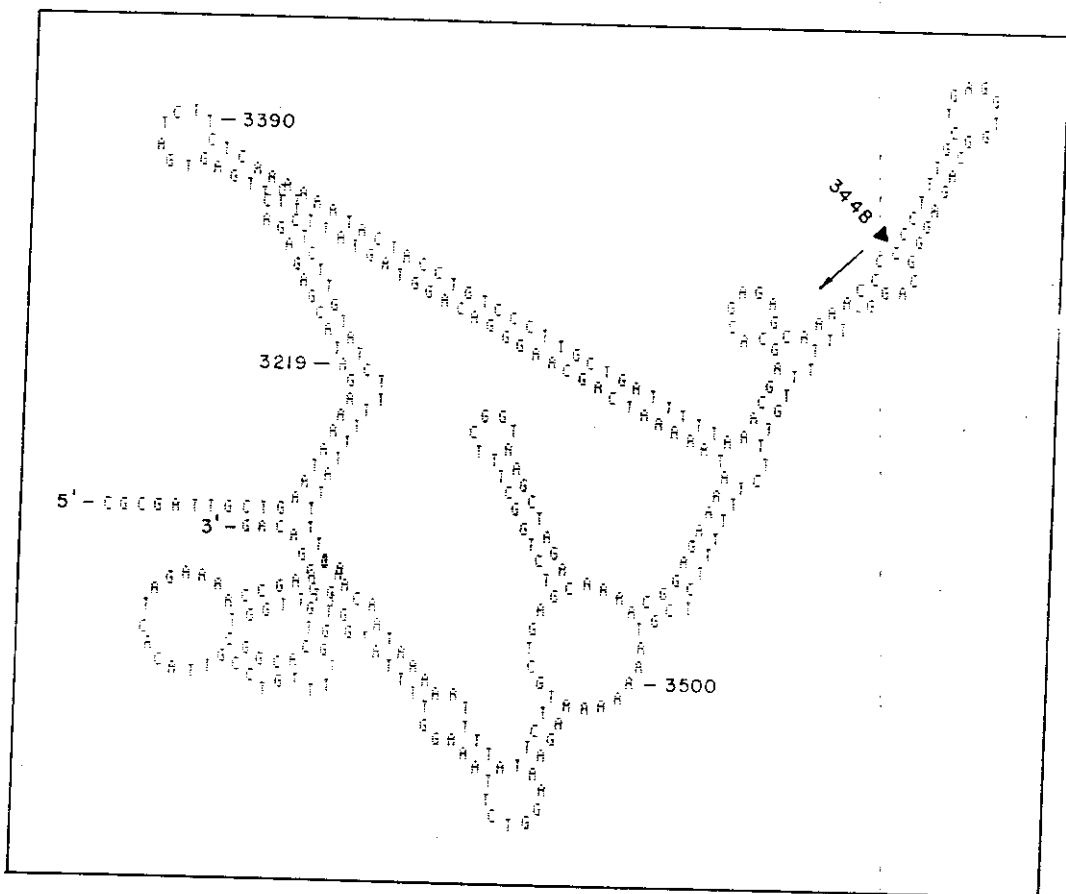
Figura 53. Replicación a partir del *ssuU* de pMV158 a diferentes tiempos. Se empleó el sistema de replicación *in vitro* de *S. aureus* partiendo de un volumen de reacción de 90 µl y la cantidad de ssDNA (aislado de pA-pMV158*ssuU*) correspondiente a los 3 ensayos presentados (450 ng). Se usaron 10 µg/µl de extracto y a los tiempos indicados se retiraron muestras de 30 µl. El DNA purificado de cada reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.8% sin digestión enzimática previa.

moléculas parcialmente duplicadas, tomándose este tiempo para realizar los ensayos posteriores, ilustrados en el esquema de la Figura 30. Tras 10 min de reacción, se digirió con el enzima *Sma*I la mitad del producto DNA generado como resultado de la síntesis *in vitro* de la cadena complementaria a partir del ssDNA de M13-pMV158ssoU. La otra mitad del DNA se llevó como control, sin digerir. Ambas muestras se resuspendieron en 6  $\mu$ l de tampón de carga y se sometieron a electroforesis en un gel de secuencia, previa desnaturalización por calentamiento de las mismas. La autorradiografía del gel correspondiente reveló la existencia de un único punto de iniciación de la cadena retrasada sintetizada a partir del *ssoU* de pMV158, ya que se vio únicamente una banda de 297 nt, presente sólo en la muestra digerida (Fig. 54).



**Figura 54.** Sitio de iniciación de la cadena complementaria desde el *ssoU* de pMV158. El ssDNA que contiene el *ssoU* de pMV158 (pA-pMV158ssoU) se utilizó como sustrato de replicación de la cadena retrasada en el sistema de replicación anterior. A los 10 min se paró la reacción y la mitad del producto DNA purificado se digirió con *Sma*I. Ambas muestras, con (S) o sin (-) tratamiento enzimático se desnaturalizaron por calentamiento y se corrieron en un gel de 6% PAA/8 M urea. Como control de peso molecular se llevó una secuencia de pLS1 (AGTC). Se indica con una flecha el tamaño en nucleótidos de la banda obtenida, que contiene el extremo 5' de la cadena retrasada plasmídica. Como control negativo se llevó el mismo ensayo realizado con el ssDNA aislado del vector pALTER-1 (pA).

El sitio desde donde se inicia la síntesis de DNA, a partir del *ssuU*, se mapeó en la posición 3448 de la secuencia de pMV158 (Fig. 55) y coincide con los resultados publicados poco antes para el inicio de la cadena retrasada a partir del *ssuU* de pUB110 en este huésped (Dempsey y cols., 1995). Junto con los anteriores, este dato indica que existe una correspondencia funcional exacta entre el *ssuU* de ambos plásmidos. Por otro lado, la especificidad más marcada en el inicio de esta cadena a partir del *ssuU* (un único sitio de iniciación) respecto a la observada desde el *ssuA* de pMV158 (varios puntos de iniciación), podría explicar la mayor eficiencia de replicación de la cadena retrasada detectada *in vivo* en los plásmidos que llevan el *ssuU* (pMV158, pLS4EC), respecto a los que sólo llevan la señal *ssuA* (pLS1), en *S. aureus*.



**Figura 55.** Estructura secundaria predicha del *ssuU* de pMV158 y punto de iniciación de la cadena retrasada. Se presenta el plegamiento intracatenario más estable predicho por ordenador de la cadena (+) de pMV158, entre las coordenadas 3200 a 3550. Se indica el sitio desde donde se inicia la síntesis de la cadena retrasada a partir de este origen (triángulo negro) y algunas coordenadas plasmídicas.

## **DISCUSIÓN**

---

El trabajo realizado en esta Tesis se ha centrado, principalmente, en la caracterización física y funcional de los orígenes de replicación de la cadena retrasada (*ssmA* y *ssmU*) del plásmido de amplio espectro de huésped pMV158. En primer lugar, se acotó *in vivo* la función de uno de estos orígenes, el *ssmA*, en un fragmento de 199 pb del plásmido, comprobándose además, su actividad en diferentes huéspedes. Del mismo modo, se estableció de forma experimental, la función del otro origen de cadena sencilla, el *ssmU*, en varios hospedadores bacterianos. Se determinaron los puntos desde donde se inicia la síntesis de la cadena retrasada a partir de ambos orígenes de replicación y se analizó la influencia de mutaciones en las regiones conservadas del *ssmA* en la eficiencia de replicación (*in vivo* e *in vitro*) y especificidad de inicio de esta cadena (*in vitro*). Para ello, se puso a punto un sistema de replicación que utiliza extractos acelulares de pneumococos, así como también se consiguieron las condiciones necesarias para la replicación a partir de estos orígenes en el sistema de *S. aureus* descrito por Birch y Khan (1992). Se pudieron determinar algunos de los factores del huésped implicados en la conversión de ss → dsDNA plasmídico y al nivel en que éstos actúan. Se ideó además, un sistema de transcripción *in vitro*, que permitió la síntesis de RNA cebadores a partir de sustratos de DNA monocatenario del plásmido pMV158 que contenían la señal *ssmA* o derivadas de ésta. Por último y en base a los resultados obtenidos, se propondrá un modelo de replicación de la cadena retrasada a partir del *ssmA*, donde se tendrán en cuenta las secuencias nucleotídicas específicas del plásmido para que la replicación de esta cadena tenga lugar y los factores del huésped implicados en dicho proceso.

## 1. FUNCIÓN DE LOS *ssm* DE pMV158 EN EL RANGO DE HUÉSPED PLASMÍDICO

pMV158 se distingue de otros plásmidos naturales que también replican vía RC, por poseer dos orígenes de replicación de cadena sencilla (*ssm*) distintos, presentes en la hebra codificante del plásmido, que es la que se "pela" durante el proceso replicativo del mismo. Estos *ssm* pertenecen a los tipos *pala* ó *ssmA* (Novick, 1989) y BA3 ó *ssmU* (van der Lelie y cols., 1989), según la clasificación realizada en base a la secuencia nucleotídica de los *ssm* de varios plásmidos. Señales de iniciación de la cadena complementaria homólogas al *ssmA*

de pMV158 se encuentran en plásmidos de estafilococos como pE194, pC194, pC221, pOX6 y pS194 (Fig. 2; Novick, 1989) y señales del tipo *ssoU* se han descrito para el plásmido pUB110 de *S. aureus* (Viret y Alonso, 1988; Boe y cols., 1989) y para el plásmido pTB913, aislado de una especie termofílica de *Bacillus* (van der Lelie y cols., 1989). Ambos tipos de *sso* se caracterizan por ubicarse en zonas no codificantes del genoma plasmídico y constan de secuencias palindrómicas imperfectas, que posibilitan la formación de estructuras secundarias tipo tallo-lazo cuando el DNA se encuentra en su forma monocatenaria (ssDNA). En ningún caso se ha descrito la participación de proteínas codificadas por el plásmido para el proceso de replicación de la cadena retrasada, siendo éste por lo tanto, enteramente dependiente de la maquinaria enzimática del huésped.

El *ssoU* de pMV158 se definió experimentalmente entre las coordenadas 3170 y 4298 del plásmido (Fig. 11). Este origen de replicación presenta un grado de homología mayor del 99% con las secuencias nucleotídicas del *ssoU* de pUB110 y de pTB913 (Priebe y Lacks, 1989; van der Lelie y cols., 1989) y constituye para pMV158, una señal muy eficiente en el proceso de conversión de ssDNA a dsDNA plasmídico en bacterias gram(+) no relacionadas, como *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Fig. 49 y 50) y *L. lactis* (Meijer y cols., 1995b). En dichos huéspedes, la cantidad de formas ssDNA acumuladas por pMV158 y derivados de éste que sólo contienen la señal *ssoU*, es prácticamente indetectable. Esto mismo se ha visto que sucede para pUB110 en *S. aureus* (Boe y cols., 1989) y durante la replicación de este plásmido y pTB913 en *B. subtilis* y *L. lactis* (van der Lelie y cols., 1989), indicando que en las bacterias mencionadas existe un mecanismo de conversión ss → dsDNA muy eficiente a partir del *ssoU* de estos tres replicones, donde probablemente la síntesis de la cadena retrasada se inicie antes de que la replicación desde el *dso* se haya completado (Viret y Alonso, 1987). Por otro lado, la presencia del *ssoU* de pMV158 es capaz de estabilizar plásmidos derivados del mismo, que son segregacionalmente inestables en *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *S. aureus*, como ocurre con pLS4 ( $\Delta ssoU$ ,  $\Delta ssoA$ ). En cualquier caso, la estabilidad segregacional de un plásmido con replicación RC parece estar vinculada, principalmente, a su número de copias y a su distribución en la población bacteriana, puesto que se supone que en la mayoría de ellos, el reparto plasmídico durante la división celular se realiza al azar. Dado que el *ssoU* de pMV158 clonado en pLS4, es capaz de aumentar dos veces su número de copias en pneumococos (Tabla 9), es posible que

ésta sea la causa de la estabilización del plásmido resultante (pLS4EC) en dicho huésped. Sin embargo, no sucede lo mismo con los otros sistemas bacterianos, es decir, que la delección de los *sso* de pMV158 para dar lugar al plásmido pLS4, no conlleva la disminución de su número de copias en *B. subtilis* y *S. aureus* y pese a ello, este replicón es sumamente inestable (Tabla 9). Se ha propuesto que la presencia intracelular de un alto contenido en formas ssDNA podría tener un efecto tóxico para el huésped, causando el enlentecimiento del crecimiento celular. Ésto traería como consecuencia que la subpoblación bacteriana que carezca del mismo se divida relativamente más rápido y vaya tomando la población. Por lo tanto, en cada generación se cuantificaría un porcentaje cada vez menor de células con plásmido (Gruss y cols., 1987; Viret y Alonso, 1987). Si éste fuera el caso para pLS4 (puesto que acumula un alto grado de formas ssDNA en los huéspedes ensayados), se podría suponer que la presencia del *ssoU* de pMV158 consigue estabilizarlo, dado que al actuar como una señal muy eficaz de conversión del ssDNA plasmídico, estaría eliminando la acumulación de formas ssDNA, responsables de tal inestabilización. Se podría sugerir entonces, que la presencia de una señal del tipo *ssoU* en pMV158, representa una ventaja replicativa importante para el plásmido a la hora de colonizar un nuevo huésped. Dado que la conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA durante el mecanismo de replicación RC depende de la interacción entre el *sso* con enzimas de la bacteria, la eficiencia con que esta señal es reconocida podría determinar, en parte, el rango de huésped de un plásmido. Así pues, la presencia de una señal como el *ssoU*, que es eficientemente reconocida por un considerable número de géneros bacterianos, explicaría, al menos en parte, la capacidad de pMV158 para establecerse en un amplio espectro de huéspedes.

Entre los plásmidos conocidos que llevan la señal *ssoU* se ha descrito una secuencia, localizada inmediatamente por detrás de este origen, homóloga a la región  $RS_A$  definida por Novick y cols. (1984a) para los plásmidos pT181 y pE194 (van der Lelie y cols., 1989). Esta región se había visto implicada en la formación de cointegrados entre ambos replicones, como consecuencia de un proceso de recombinación específica en los sitios  $RS_A$ , llevado a cabo por un sistema general de recombinación de la bacteria huésped (Novick y cols., 1984a). Debido al alto potencial recombinogénico de los intermediarios replicativos ssDNA (Michel y Ehrlich, 1986), sería posible que ocurrieran intercambios y/o incorporación de bloques de secuencias funcionalmente relacionadas entre plásmidos distintos (van der Lelie

y cols., 1989). La presencia del *ssoU* en pMV158 podría ser un ejemplo de esta situación, explicando de alguna forma la existencia de dos tipos de *sso* en el mismo replicón y la presencia de orígenes de replicación de hebra sencilla análogos en plásmidos pertenecientes a distintas familias como pUB110 y pMV158 (Tabla 2). Coincidiendo con esta hipótesis, se ha visto que la divergencia en cuanto a la secuencia nucleotídica de los plásmidos que contienen el tipo de señal *ssoU*, ocurre justamente después de la región  $RS_A$ . Sin embargo, no se cuenta con ninguna evidencia experimental que implique esta región en la formación de cointegrados entre estos replicones (van der Lelie y cols., 1989). Otra posible explicación a la existencia de dos tipos de *sso* en pMV158 estaría relacionada con la estructura genética del plásmido. La señal *ssoU* está localizada "corriente arriba" del gen *mobM* (Priebe y Lacks, 1989), el cual codifica para una proteína de movilización que interviene en la transferencia conjugativa del mismo (Guzmán y Espinosa, 1997). Dado que la dirección de transferencia del DNA durante este proceso introduce en primer lugar la señal *ssoU*, podría ser que este origen fuera el preferentemente utilizado cuando pMV158 es movilizado a otras bacterias, mientras que en su hospedador original, el *ssoA* sería el encargado de la replicación vegetativa del plásmido.

El *ssoA* de pMV158 había sido definido experimentalmente en el fragmento de DNA de 942 pb, delecionado en pLS4 (del Solar y cols., 1987a). En este trabajo conseguimos acotar dicho origen de replicación en un fragmento más pequeño, de 199 pb, comprendido entre los sitios *AflI* y *NcoI* (coordenadas 5150 y 5349 de pMV158), que incluye la secuencia palindrómica capaz de generar una estructura tipo tallo-lazo en el ssDNA y las secuencias conservadas entre los *sso* del tipo *ssoA* de distintos plásmidos analizados por Novick (1989). Previamente se habían definido regiones *sso* de tamaños similares, para los plásmidos pT181 (Birch y Khan, 1992) y pUB110 (Viret y Alonso, 1988; Boe y cols., 1989). Las regiones conservadas presentes en el *ssoA* de pMV158 constan de: i) una secuencia de 14 nt (5'-TTTATGCCGAGAAA-3') denominada  $RS_B$ , descrita inicialmente como una zona donde tenían lugar eventos de recombinación y formación de cointegrados entre plásmidos no homólogos (Novick y cols., 1984a; Projan y cols., 1985) y vinculada posteriormente a la función del origen de hebra sencilla de estos replicones (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a), localizada en la base del tallo, hacia el extremo 5' de la estructura secundaria formada en el origen, ii) una secuencia de 9 nt (5'-TGGAATAAA-3') que aparee en gran

parte con la primera y que se encuentra hacia el extremo 3' de la horquilla, y iii) una secuencia de 6 pb (5'-TAGCGT-3') que denominamos CS-6, ubicada en el lazo de la horquilla formada en la región del origen de algunos de los plásmidos con un *sso* del tipo *ssoA* como pC194 y pC221 (Fig. 2). Este hexanucleótido se encuentra además, en otros plásmidos con replicación RC, como pWV01 de *L. lactis* y pIJ101 de *Streptomyces lividans*, ubicado en el lazo de una región estructurada del ssDNA, que parece estar involucrada en el proceso de conversión ss → dsDNA en cada uno de estos replicones (Leenhouts y cols., 1991; Zaman y cols., 1993). En pWV01 se han encontrado, además, unos pocos nucleótidos comunes a los presentes en el tallo de los orígenes de replicación del tipo *ssoA*. Tal vez, a estas homologías se deba la existencia de cierta funcionalidad del *ssoA* de pMV158 observada por Meijer y cols. (1995b) en lactobacilos, indicando que estas secuencias podrían ser reconocidas por los mismos factores de este huésped en ambos plásmidos. Por otro lado, se ha encontrado una secuencia altamente homóloga a CS-6 en el *sso* del fago M13, ubicada también en el lazo de una de las horquilla de este origen (del Solar y cols., 1987a). Además de la consenso CS-6, existe un número significativo de nucleótidos conservados entre el *sso* de M13 y el *ssoA* de pMV158. Como se sabe que la replicación a partir del *dso* de este plásmido tiene lugar en *E. coli*, tanto *in vivo* como *in vitro* (del Solar y cols., 1987a; 1987b), los mismos autores propusieron que esta peculiaridad presentada por un plásmido de bacterias gram(+) para replicar en una bacteria gram(-) podría estar favorecida por la homología existente entre su *ssoA* y el *sso* de un fago de esta bacteria, sugerente de la funcionalidad de este origen plasmídico en *E. coli*. Sin embargo, hoy se sabe que la eficiencia del *ssoA* de pMV158 en dicho huésped es muy baja, ya que el nivel de acumulación intracelular de formas ssDNA de un derivado de pMV158 conteniendo sólo el *ssoA* (pLS1) y uno que carece de ambos orígenes (pLS1ΔNA) es prácticamente el mismo (Hernández-Arriaga, sin publicar). Siguiendo el mismo tipo de análisis, se había visto, además, que el *ssoU* de pMV158 es bastante más eficiente que el *ssoA* en la conversión ss → dsDNA del plásmido en *E. coli* (del Solar, 1991), confirmando una vez más, el grado de adaptabilidad de la primera de estas señales a huéspedes no relacionados entre sí.

La delección del fragmento *EcoRI* B de pMV158, que contiene el *ssoU* plasmídico, dando lugar al plásmido pLS1, no tiene una mayor influencia en cuanto a la generación de intermediarios replicativos ssDNA en *S. pneumoniae*, indicando que el *ssoA* de este plásmido

funciona perfectamente en esta bacteria. La delección completa de dicho origen produce, en pneumococos, una clara reducción del número de copias plasmídico y una gran acumulación de intermediarios de cadena sencilla (Fig. 15). En *B. subtilis*, el fenotipo presentado por ambos plásmidos, con (pLS1) y sin (pLS1 $\Delta$ NA) *ssoA* es prácticamente el mismo (Fig. 46), indicando que en este huésped el *ssoA* de pLS1 es muy poco funcional. De la misma forma, Gruss y cols. (1987) habían encontrado que los elementos *ssoA* de los plásmidos de *S. aureus* parecen carecer de función en *B. subtilis*, donde se acumula una gran cantidad de formas plasmídicas monocatenarias, independientemente de la presencia de estas señales. Dado que no se ha descrito ningún plásmido de *B. subtilis* que contenga un origen de cadena sencilla del tipo *ssoA*, no es de extrañar que esta señal no sea eficientemente reconocida en dicha bacteria, mientras que todos los *sso* de plásmidos procedentes de este huésped presentan el tipo de señal *ssoT* (Seery y Devine, 1993; Meijer y cols., 1995c) que no posee homología alguna con la secuencia *ssoA*. En este trabajo conseguimos establecer plásmidos con el replicón de pMV158 en un nuevo hospedador, *S. aureus*, incrementando así su rango de huésped. Pese a la similitud existente entre la secuencia *ssoA* de pLS1 y las correspondientes señales de los plásmidos de estafilococos, la eficiencia de conversión *in vivo* de las formas ssDNA a dsDNA de pLS1 en esta bacteria, es casi tan baja como la que presenta pLS1 $\Delta$ NA (Fig. 34). Se sabe que, de forma recíproca, el *ssoA* de pC194 es muy poco funcional en *S. pneumoniae* (del Solar y cols., 1987a), mientras que actúa muy eficientemente como señal de conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA del plásmido, en *S. aureus*, desde donde pC194 fue aislado originalmente (Horinouchi y Weisblum, 1982b). Por otro lado, fracasaron varios intentos de transformar células de pneumococos con el DNA del plásmido pE194 de *S. aureus*. Este plásmido pertenece a la familia de pMV158, es decir, que ambos replicones presentan homología en sus secuencias de DNA relativo a las funciones de síntesis de la cadena líder (proteína Rep y *dso*) así como al control de la replicación. Pese a ello, existen datos obtenidos en nuestro laboratorio, que sugieren que el fracaso en dicho establecimiento proviene de la incapacidad para replicar a partir del *dso*. Los resultados presentados en la Figura 35 indican que el *ssoA* de pE194, también homólogo al de pLS1, es reconocido como señal de conversión del ssDNA plasmídico en el sistema de replicación *in vitro* de *S. pneumoniae*, aunque el nivel de síntesis de la cadena retrasada alcanzado por este plásmido es bajo si se lo compara con el obtenido a partir del *ssoA* de pLS1. Esto sugiere que, aunque no se pudo medir el grado de acumulación de ssDNA de pE194 en células de pneumococos,

pC194	2206	cgca	TTTATGCCGAGAAAA	AttTaTT	-gtg	cg	ttga	GAagaac	CCTTAAc	-TAaAC	-ttg	cag	acg	AatG	-tcggc	-aTAGCGt							
POX6	4	acgca	TTTATGCCGAGAAAA	AttTaTT	-gtg	cg	ttga	GAagaac	CCTTAAc	-TAaAC	-ttg	cag	acg	AatG	-tcggc	-aTAGCGt							
pS194	2825	gctt	TTTATGCCGAGAAAA	AttTaTT	tata--	ttga	GAag	taCCTTAAc	-TAaAC	-ttg	cag	acg	AatG	-tc	-gc	-aTAGCGa							
pC221	636	gca	TTTATGCCGAGAAAA	tcTaTT	tg---	tcgat	GA	gag-cCCTTAA	-tTA	gACT	aaag	cgcc	AgcG	-gtc	cag	-aTAGCGt							
pE194	637	ct	TTTATGCCGAGAAAA	-cTtTT	tg---	cg	tgTGA	cag-tCCTTAA	aaTA	TA	ACT	tag	ag	cgta	AgcG	aaag	ta-gTAGCGa						
pLS1	4083	actga	TTTATGCCG	GAAA-gc	TaTT	tg	aca	ataagc	Ag	tg-	ac	ag	ag	ta	cg	ctAgg	ac	gtg	cc	gag	ccG	aaag	gcttTAGCGt

gAGc	TATt	Aagc	Cgac	CatTc	Gaca	AGtIt	TgGGa	TTgTTAA	GG	-g	ttC	cg	GgcTCA	acgt	caAt	Aaag	caga	AATTGGAATAAA	ga	2042			
gAGc	TATt	Aagc	Cgac	CatTc	Gaca	AGtIt	TgGGa	TTgTTAA	GG	-g	ttC	cg	GgcTCA	acgt	caAt	Aaag	c---	AATTGGAATAAA	agc	166			
gAG-	TATt	Agcc	Cgac	CatTc	Gaca	AGtIt	TgGGt	TTgTTAA	GG	-g	taC	aga	GgcTCA	atg	taaAt	Aaag	c---	AATTGGAATAAA	agc	2982			
cAGc	TATc	Aatt	Cgac	CgaTg	Gac-	AGcIt	TaGGa	TTaTTAA	GG	ag	cgC	--a	GaaTC	A	tcggc	-Aa	Atag	agg-	AATTGGAATAAA	agc	793		
cAGc	TATt	Aa--	Cttt	CggTt	Gcaa	AGcTc	TaGGa	TTtTTAA	GG	-c	gCag	GcaTCA	c	acgc	-Aa	A--a	agga	AATTGGAATAAA	atg	794			
-----	tt	Cgg	acGg	aca	--	cgg	aca	agg	acgg	caG	t	cact	ggt	ta	T	gtt	gtc	-Aa	Atag	acca---	TGGAATAAA	aa	4233

Figura 56. Alineamiento de varias secuencias *ssaA*. Se compara la homología en la secuencia de DNA de varios *ssaA*. Los primeros cinco plásmidos fueron aislados de *S. aureus*, mientras que pLS1 es un plásmido de estreptococos. Con color amarillo se indican los nucleótidos idénticos entre las seis secuencias. Con color azul se indican los nucleótidos que sólo son homólogos para los plásmidos de estafilococos y difieren para pLS1.

es bastante probable que éste sea tan alto como el observado para pC194, indicando que, *in vivo*, el *ssmA* de pE194 tampoco sería reconocido eficazmente en *S. pneumoniae*.

Resumiendo, los datos que existen hasta el momento plantean que, a pesar de que solamente en bacterias como *S. aureus* y *S. agalactiae* se han encontrado plásmidos conteniendo un origen de tipo *ssmA* perfectamente funcional en el huésped desde el cual el plásmido ha sido aislado, la señal *ssmA* presente en los plásmidos de estreptococos, no es reconocida eficientemente en *S. aureus* y de forma recíproca, los orígenes de cadena sencilla de tipo *ssmA* presentes en plásmidos de estafilococos, no actúan de modo eficaz en *S. pneumoniae*. La dependencia de cada uno de estos huéspedes para el buen funcionamiento de las señales de este tipo podría indicar la participación de factores específicos de cada bacteria en el proceso de replicación de la cadena retrasada de estos plásmidos. Si se observa la Figura 56, se puede apreciar que la secuencia nucleotídica de los *ssmA* de los plásmidos procedentes de *S. aureus* está bastante más conservada entre sí, que respecto a la secuencia del *ssmA* del plásmido de estreptococos pLS1. Concretamente, aparte de las regiones RS<sub>B</sub> y CS-6, son muy pocas y dispersas las zonas en común que tiene pLS1 con los plásmidos de estafilococos, mientras que éstos, además de las regiones conservadas RS<sub>B</sub> y CS-6, poseen un grado de homología considerable en el resto de sus secuencias *ssmA*. Dado que el o los factores específicos de cada huésped deberían reconocer regiones comunes en las señales *ssmA*, sería probable que, por ejemplo, las regiones conservadas entre los *ssmA* de los plásmidos de *S. aureus* (no comunes a las de pLS1) estuvieran implicadas en el reconocimiento de dichos factores, en este huésped. Del mismo modo, podrían ser reconocidas ciertas secuencias del *ssmA* de pLS1 (no comunes a las de los plásmidos de estafilococos) sólo por factores de estreptococos (*S. agalactiae* y *S. pneumoniae*). Ésto explicaría por qué, a pesar de pertenecer a la misma clase de orígenes de cadena sencilla, el *ssmA* de pC194 y de pE194 no son eficientemente reconocidos en pneumococos, siendo perfectamente funcionales en estafilococos y por qué el *ssmA* de pLS1 no es eficiente en estafilococos, mientras que sí lo es en *S. pneumoniae*. Dado que no se dispone de la secuencia nucleotídica de señales de conversión ss → dsDNA de otros plásmidos de estreptococos, no hemos podido establecer homologías entre éstas y el *ssmA* de pLS1 para poder buscar elementos comunes entre ellas que permitan basar esta hipótesis. Sin embargo, en esta señal existe una serie de secuencias directamente repetidas (a1-a2, b1-b3 en Fig. 40) muy sugerentes, que no se encuentran en

los plásmidos de *S. aureus* y que podrían estar implicadas en la interacción de los factores específicos de estreptococos con el DNA plasmídico.

Por otro lado, las regiones compartidas por todos los plásmidos que contienen el tipo de origen *ssoA* (RS<sub>B</sub> y CS-6) podrían estar vinculadas a la unión de factores más conservados entre las diferentes bacterias, fundamentales para la función de este origen, como por ejemplo, la RNAP. En este trabajo, hemos visto la participación de este enzima en el inicio del proceso de conversión ss → dsDNA a partir del *ssoA* de pLS1 tanto en *S. pneumoniae* como en *S. aureus* (Figs. 24 y 29). Es decir, que a pesar de las diferencias registradas en cuanto a la eficiencia de este origen en cada huésped, existen en ambos, elementos comunes en el mecanismo de iniciación de la cadena retrasada plasmídica. Ésto podría explicar el hecho de que plásmidos provenientes de diferentes bacterias puedan replicar en huéspedes distintos al original.

Hemos llevado a cabo una serie de ensayos de replicación *in vitro* a partir del *ssoA* de pLS1 utilizando extractos proteicos de estafilococos, que permitieron determinar la especificidad de síntesis de la cadena complementaria en dicho huésped. Se vio que, al menos una parte importante de la cadena retrasada de pLS1 inicia su síntesis a partir de varios puntos específicos dentro del *ssoA*, que mapean entre las coordenadas 4141 y 4158 del plásmido, en una región próxima a la secuencia CS-6 (Fig. 40). Así pues, los factores específicos de cada huésped bacteriano podrían estar encargados de potenciar la unión o función del enzima encargado de sintetizar el "primer" para dar comienzo a la síntesis de la cadena retrasada (RNAP) o de los enzimas implicados en la polimerización de la hebra complementaria (DNA polimerasas), haciendo más eficiente el proceso de replicación. Si estos factores no se encontrasen en el huésped ensayado, entonces la iniciación de la cadena retrasada podría seguir siendo específica, pero la replicación sería mucho menos eficiente. Sin embargo, lo que ocurre para pLS1 en *S. aureus* no sucede para pE194 en *S. pneumoniae*. En este trabajo hemos desarrollado un sistema de replicación *in vitro* que emplea extractos de pneumococos y que permitió establecer los puntos de iniciación de la cadena complementaria de algunos plásmidos. En este sistema, la cadena retrasada de pLS1 se inicia de forma específica y tiene lugar a partir de cuatro puntos principales dentro de su *ssoA* (coordenadas 4111, 4125, 4132 y 4156 de pLS1), mientras que en el caso de pE194, no

parece que la síntesis de la cadena complementaria se inicie de forma específica en esta bacteria, pese a que la eficiencia de conversión de ssDNA a dsDNA registrada a partir del *ssOA* de pE194 es relativamente alta en el mismo sistema. Estos hechos, relacionados con los resultados obtenidos *in vivo* con respecto al grado de acumulación de formas de ssDNA plasmídico, nos permitieron introducir algunos conceptos nuevos a la hora de evaluar la funcionalidad de un origen concreto de replicación de hebra sencilla, en un huésped distinto al original. En primer lugar, la forma de determinar la actividad de un *ssO* plasmídico, midiendo la proporción intracelular de ssDNA acumulado *in vivo* y compararla con el grado de acumulación de ssDNA generado por un derivado de dicho plásmido que carezca de tal origen (este es el método comúnmente utilizado para definir cualquier tipo de *ssO* en un determinado huésped; Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a; Viret y Alonso, 1988; van del Lelie y cols., 1989; Seery y Devine, 1993; Kramer y cols., 1995; Meijer y cols., 1995a; 1995b), no indica, en el caso de que ambos generen el mismo nivel de intermediarios de replicación ssDNA, que este origen no sea funcional en la bacteria ensayada, como ocurre para pLS1 (*ssOA*) en huéspedes como *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. En este caso, se podría interpretar que la "falta de actividad" del *ssOA* de pLS1 en dichos huéspedes, sea en realidad (como ocurre en estafilococos) la existencia de síntesis específica pero menos eficiente de la cadena complementaria a partir de su *ssOA*. Ésto podría deberse, probablemente, a la falta de posibles "potenciadores de replicación" específicos de pneumococos, necesarios para conseguir un buen índice replicativo en una bacteria distinta a ella.

Por otro lado, aunque no se tengan evidencias en cuanto a la eficiencia y especificidad de síntesis de DNA a partir del *ssOA* de pLS1 en *B. subtilis* en un sistema *in vitro*, como del que se dispone para *S. pneumoniae* y *S. aureus*, hemos conseguido promover la síntesis específica de RNA cebadores de la cadena reatrasada, utilizando un sistema de transcripción *in vitro* que emplea la RNAP purificada de *B. subtilis*. Dado que la única forma que tienen las DNA polimerasas bacterianas para sintetizar esta cadena es mediante la extensión de un "primer", la existencia de estos RNA de tamaños concretos (Fig. 43) serían indicativos de puntos específicos de iniciación de la cadena complementaria en *B. subtilis*. Otra vez nos encontraríamos con un caso de baja eficiencia en la conversión de ss → dsDNA plasmídico *in vivo* y evidencias de un alto grado de especificidad en el inicio de la síntesis de la cadena complementaria del plásmido. Ésto nos permite introducir un segundo concepto relativo a

esta etapa de la replicación RC: la eficiencia y especificidad de inicio de la cadena retrasada no están relacionadas, ni una es la consecuencia de la otra. Queda claro que una muy baja eficiencia de conversión de las formas ssDNA a dsDNA del plásmido *in vivo* puede corresponderse con un alto grado de especificidad de inicio en la síntesis de la cadena complementaria registrada *in vitro*, indicando que, aunque la funcionalidad del *ssO* de dicho plásmido sea baja, puede ser, sin embargo, específicamente reconocido por la maquinaria enzimática bacteriana. Por otro lado, hemos visto que la introducción de determinadas mutaciones en el origen de cadena sencilla de pLS1 disminuyen en gran medida la iniciación específica de esta cadena y, sin embargo, la eficiencia de conversión ss → dsDNA (que sería inespecífica) en estafilococos, a partir de estos *ssOA* alterados, es igual a la del plásmido silvestre, *in vivo* (Fig. 34).

A lo largo de este trabajo, así como de otra serie de ellos (Boe y cols., 1989; Oskam y cols., 1992; del Solar y cols., 1993a; Meijer y cols., 1995a; 1995b; Seegers y cols., 1995), se ha visto una relación poco clara entre el número de copias plasmídico, la presencia del origen de replicación de hebra sencilla, el grado de acumulación de formas ssDNA y la estabilidad segregacional de plásmidos con replicación RC, en distintos huéspedes. Nuestros datos apuntan a la existencia de una función de estabilidad asociada, física pero no funcionalmente, al *ssOA* de pLS1 capaz de actuar en distintos huéspedes como *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *L. lactis*. Es decir, que la sola presencia de la región que comprende a este origen (independientemente de su grado de funcionalidad), sería suficiente para garantizar un reparto equitativo de las réplicas plasmídicas, en cada una de estas poblaciones bacterianas, durante la división celular. Los datos en que basamos dicha afirmación pueden resumirse en las siguientes observaciones: i) el plásmido derivado de pLS1, pLS1G6, que posee una mutación en la región *ssOA* conduciendo a una inactivación casi total de este origen (y por consiguiente al acúmulo de un alto grado de formas ssDNA plasmídicas en pneumococos), mantiene un número de copias similar al del plásmido original y es segregacionalmente estable en *S. pneumoniae*, ii) si se aumenta dos veces el número de copias de pLS4 (mediante mutaciones en el sistema de control de replicación del plásmido), consiguiéndose así el mismo valor que pLS1, el plásmido resultante (pLS7) sigue siendo igualmente inestable en este huésped (del Solar y cols., 1993a), iii) en *B. subtilis*, el plásmido pLS1 y derivados de éste con deleciones parciales (pLS1Δ13, pLS1Δ14) o totales

(pLS1ΔNA, pLS4) de la señal *ssmA*, poseen el mismo número de copias y acumulan prácticamente la misma cantidad de ssDNA, sin embargo, sólo pLS1 es mantenido de forma estable, iv) un plásmido derivado de pMV158, que sólo contiene la señal *ssmA* (pMV-U<sup>+</sup>A<sup>+</sup>), idéntico a pLS1, y que acumula un alto grado de formas ssDNA, es segregacionalmente estable en *L. lactis*, mientras que otro, que carece de este origen de cadena sencilla (pMV-U<sup>-</sup>A<sup>-</sup>) es totalmente inestable en la misma población, pese a no existir una variación significativa en el número de copias de ambos replicones (Meijer y cols., 1995b).

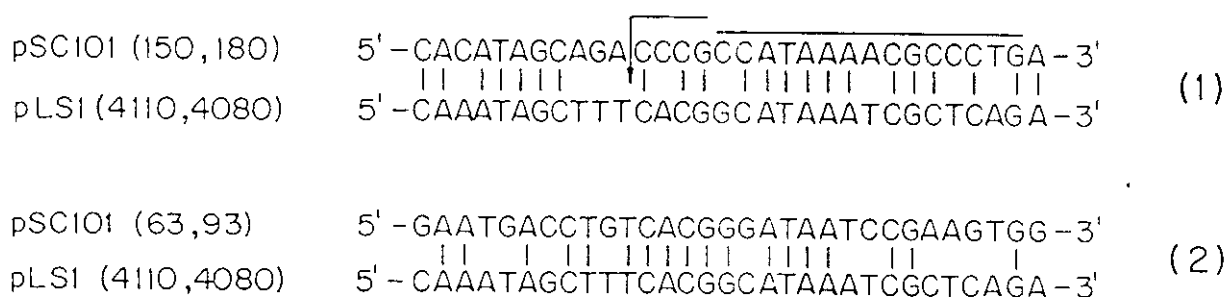
En condiciones normales, y en general, los sistemas que controlan el número de copias plasmídico determinan una tasa de replicación promedio de 1 por copia y por ciclo celular, siendo capaces de corregir desviaciones que lo alejen de este promedio, consiguiéndose así un número constante de plásmidos por célula ( $n$ ). Si se trata de un sistema de control eficiente, capaz de mantener un número de copias exactamente igual a  $2n$  en cada célula al momento de dividirse, y considerando que cada molécula plasmídica tiene la misma oportunidad de segregarse hacia una u otra célula hija, la probabilidad de pérdida del plásmido calculada teóricamente ( $L_{th}$ ) durante la división celular está definida por la ecuación binomial planteada por Summers (1991):  $L_{th} = (1/2)^{2n}$ . Tasas de pérdida experimentales ( $L_{ex}$ ) mayores que  $L_{th}$  podrían ser la consecuencia de un ineficiente control de la replicación y/o cierta clase de compartimentación plasmídica en la célula, que dificulte un reparto libre al azar. Éste parece ser el caso de los plásmidos pLS1Δ13, pLS1Δ14, pLS1ΔNA y pLS4. Estos derivados de pLS1, que contienen deleciones parciales o totales de la señal *ssmA*, presentan en *S. pneumoniae*, unas 10 copias por equivalente cromosómico, que según la ecuación mencionada, le garantizaría un valor aproximado de  $L_{th} = 10^{-6}$ . Sin embargo, el valor  $L_{ex}$  calculado en cada caso (Fig. 19; Tabla 5), es bastante más alto que el esperado. En base a estos datos, y dado que además, la acumulación de ssDNA parece no tener efecto en cuanto a la estabilización de plásmidos en ninguno de los tres huéspedes analizados (Tabla 8), proponemos que la secuencia *ssmA* constituye, al igual que el *ssmU*, aunque en otro sentido, un "elemento de promiscuidad" importante a la hora de colonizar un nuevo huésped. Un dato que apoyaría esta hipótesis, es la capacidad que tienen algunos plásmidos, como ciertos derivados de pC194, para mantenerse de forma estable en *S. pneumoniae*, pese a que su señal *ssmA* es muy poco funcional en este huésped (Ballester y cols., 1989; del Solar y cols., 1993a). Sin embargo, en contra se podría argumentar que la presencia de la secuencia *ssmA*

de pE194 no le garantiza al plásmido un reparto equitativo durante la división celular en *B. subtilis* (Novick y cols., 1984a).

Aunque aún no hay pruebas contundentes sobre la existencia de funciones de estabilidad o de partición en plásmidos con replicación RC, se sabe que la delección de algunas regiones, como la secuencia BA4 de pUB110 (contigua a la región BA3) conduce a la inestabilidad segregacional del plásmido sin que se observe un efecto significativo en sus capacidades replicativas (Bron y cols., 1988). A pesar de que en muchos casos, la conversión ineficiente del ssDNA plasmídico causa la inestabilidad segregacional del mismo (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1987a; Chang y cols., 1987; Viret y Alonso, 1988; Devine y cols., 1989; Boe y cols., 1989; Bron y cols., 1991), este trabajo nos ha permitido concluir que la presencia de un *sso* (in)eficiente, no implica siempre que el plásmido deba ser (in)estable. Por ejemplo, la secuencia *ssoU* de pMV158 constituye una muy buena señal de conversión ss → dsDNA para un derivado de éste que carece del *ssoA* (pMV-U<sup>+</sup>A<sup>-</sup>), sin embargo es incapaz de estabilizar segregacionalmente dicho plásmido en una población de *L. lactis* (Meijer y cols., 1995b).

Miller y cols. (1983) encontraron que la secuencia RS<sub>B</sub> de varios plásmidos de estafilococos presentan un grado de homología considerable con una porción de la región *par* de pSC101, lo que permitió sugerir a Novick y cols. (1984a) la implicación de esta zona del *ssoA* en la partición plasmídica. Nosotros encontramos dos secuencias que incluyen el RS<sub>B</sub> de pLS1 (coordenadas 4080 a 4110 de pLS1), que presentan más de un 55% de homología con la secuencia *par* de pSC101. La más baja de estas homologías (18/31 nucleótidos idénticos; Fig. 57, 1) corresponde a la región de pSC101 previamente propuesta por Novick y cols. (1984a). En esta zona también se localiza la secuencia repetida a de pSC101, requerida para su replicación normal (Manen y cols., 1990). La más alta de las homologías (22/31 nucleótidos idénticos; Fig. 57, 2) comprende la región de unión de la DNA girasa de *E. coli* a la secuencia *par* de pSC101 (Whale y Kornberg, 1988). Ésto podría indicar que existe una secuencia de unión a la DNA girasa asociada al *ssoA* de pLS1. Sin embargo, los resultados obtenidos de una serie de experimentos donde se inhibió este enzima con ácido oxolínico y/o ácido nalidíxico, no evidenciaron la existencia de una interacción evidente entre la DNA girasa y el DNA de pLS1 en *S. pneumoniae* (resultados no incluidos en la Tesis).

Contamos, sin embargo, con un dato interesante: el plásmido pLS1G3G7, que posee una serie de sustituciones en los nucleótidos conservados del RS<sub>B</sub>, que eliminan la función del *ssrA* de pLS1 en pneumococos, es algo inestable ( $Lex = 0.02$ ) en esta población. Este hecho, podría indicar que existen ciertos elementos en la secuencia del RS<sub>B</sub> de pLS1 que estarían implicados en la interacción con algún factor del huésped, distinto a los que intervienen en el proceso de replicación, que facilitarían la segregación plasmídica durante la división celular. De esta forma, la existencia de dos señales *ssr* en pMV158 que le confieren ventajas replicativas y de estabilidad segregacional al plásmido en distintos huéspedes, le supondría una mayor flexibilidad en la colonización de nuevas bacterias y ésto podría explicar su carácter "promiscuo".



**Figura 57. Homologías entre la secuencia RS<sub>B</sub> de pLS1 y la región *par* de pSC101.** Las coordenadas en ambos plásmidos corresponden a las descritas por Lacks y cols. (1986) para pLS1 y Miller y cols. (1983) para pSC101. Se buscó la máxima homología para el alineamiento sin permitir huecos. En la homología 1, la flecha indica el comienzo de la zona del DNA protegida por la DNA girasa de *E. coli* en experimentos de protección frente al ataque nucleolítico del DNA (Wahle y Kornberg, 1988), y se soberrraya la secuencia repetida "a" involucrada en la partición del plásmido (Manen y cols., 1990). La homología 2 es similar a la previamente publicada por Novick y cols. (1984) para la región RS<sub>B</sub> de varios plásmidos de estafilococos.

Una observación general para los plásmidos que replican por el mecanismo RC, es que la delección de sus señales *sso* no conduce a la inviabilidad replicativa de los mismos. Ésto significa que las formas ssDNA del plásmido pueden continuar siendo convertidas a dsDNA por vías alternativas, independientes del *sso*, que son generalmente poco eficientes y no dependen de RNAP (Kramer y cols., 1995). Para pMV158 se han descrito dos posibles formas alternativas de iniciar la síntesis de la cadena retrasada en ausencia de las secuencias *ssoA* y *ssoU*. La primera fue propuesta por del Solar y cols. (1987a), en donde la síntesis de esta hebra partiría desde una secuencia palindrómica con cierta homología al *ssoA*, presente en el gen *tetL* (coordenadas 2368 a 2467 de pLS1). En este caso, no se ha propuesto un mecanismo que se ajuste a los datos presentes, sin embargo, un dato a favor lo constituye el no haber sido posible obtener células de pneumococos transformadas con el DNA de un derivado de pMV158 que, además de carecer de sus *sso*, se le haya sustituido el gen *tetL* por el *cat* de pC194 (M. Espinosa, comunicación personal). Por otro lado, Meijer y cols. (1996) propusieron un mecanismo alternativo, más complejo, de iniciación de la cadena complementaria de pMV158 en *B. subtilis*, que involucra los dos ctRNA sintetizados por el plásmido (RNA I y RNA II; Fig. 11) y la proteína RecA bacteriana. En este caso, los ctRNA servirían de "primer" de esta cadena y requerirían de RecA para formar el complejo de iniciación. Sin embargo, este sistema no abarcaría el conjunto de vías alternativas de síntesis de la cadena retrasada, ya que un derivado de pMV158 que carece de sus *sso* continúa replicando en cepas mutantes *recA*<sup>-</sup> (Meijer y cols., 1996). Además, no se ha encontrado diferencias en cuanto al grado de acumulación de formas ssDNA de pLS4 ( $\Delta ssoA$ ,  $\Delta$ RNA I) y un derivado de éste que, además, carece de RNA II (pLS4m) en *S. pneumoniae* (resultados no incluidos en la Tesis).

## 2. FUNCIÓN DE LAS REGIONES CONSERVADAS DEL *ssoA*

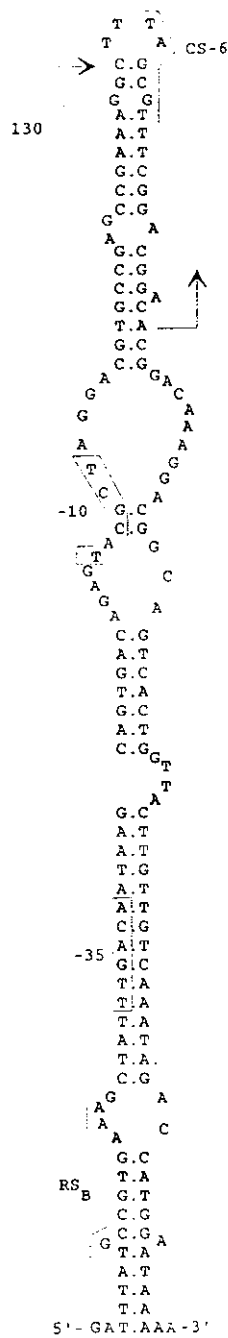
Habíamos comentado anteriormente que las regiones conservadas entre los *ssoA* de diferentes plásmidos (RS<sub>B</sub> y CS-6) podrían estar implicadas en el reconocimiento por factores comunes y más conservados entre las distintas bacterias. Como habíamos adelantado, se comprobó la actuación de la RNAP de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *B. subtilis* en el inicio de la síntesis de la cadena complementaria a partir del *ssoA* de pLS1 mediante experimentos de

inhibición del enzima con rifampicina *in vivo* e *in vitro* o, directamente, mediante síntesis de RNA desde este origen (Fig. 43). Por otro lado, se había comprobado la participación de la RNAP de estafilococos en el inicio de la síntesis de la cadena complementaria a partir del *ssol* de pT181, pE194 y pSN2 (Dempsey y cols., 1995) y pC194 (Boe y cols., 1989). Se sabe, además, que la funcionalidad del *ssol* de todos estos plásmidos depende de su orientación respecto a la del *dso* en el genoma plasmídico (Gruss y cols., 1987; del Solar y cols., 1993a; Dempsey y cols., 1995; Fig. 36), lo que pone de manifiesto la importancia de las secuencias conservadas que se encuentran desapareadas en la estructura del origen. Con el fin de determinar el significado funcional de dichas secuencias, se realizó un análisis de mutagénesis dirigida a ambas regiones conservadas, lo que permitió establecer el sitio en donde se podría unir la RNAP y la región del *ssol* que actuaría como terminador de la síntesis de los RNA cebadores. Hasta ahora no se disponía de ningún análisis exhaustivo sobre los orígenes de replicación de cadena sencilla de plásmidos, por lo tanto, en este trabajo se engloba el primer estudio minucioso realizado de los requerimientos estructurales y de secuencia para la función de estas señales plasmídicas. Análisis del efecto de mutaciones en la zona del *ssol*, así como de los requerimientos enzimáticos necesarios para la síntesis de la cadena retrasada, habían sido realizados para el estudio de la replicación de fagos de cadena sencilla de *E. coli* (Hiasa y cols., 1989). Ésto permitió la determinación, clasificación y profundización de los diferentes mecanismos de síntesis de RNA cebadores conocidos hoy en día (Kornberg y Baker, 1992).

Hasta ahora, sólo se suponía la presencia de RNA cebadores de la cadena retrasada de plásmidos con replicación RC, pero no se tenían evidencias directas de que se sintetizara un "primer" desde los orígenes de cadena sencilla de estos replicones. Todos los datos que se tenían constituían pruebas indirectas de la generación de estos RNA (obtenidos en experimentos de inhibición de la RNAP con rifampicina o ausencia de rNTPs en el tampón de replicación). Por lo tanto, es de destacar, también, la importancia de nuestro trabajo en cuanto al diseño de los experimentos de transcripción *in vitro*, para sintetizar pequeñas moléculas de RNA a partir de sustratos de DNA monocatenario. Estos experimentos nos permitieron definir el tamaño y especificidad de síntesis de los transcritos sintetizados a partir del *ssol* de pLS1. Experimentos parecidos solamente se habían llevado a cabo para la determinación de los "primer" necesarios en la síntesis de la cadena complementaria de

colifagos (Kodaira y cols., 1992; Higashitani y cols., 1993).

Proponemos que la región  $RS_B$ , presente en el *ssoA* de pLS1, está implicada en la interacción de la RNAP bacteriana con el DNA plasmídico y que para ello es necesario que tanto los nucleótidos conservados de la región desapareada como la estructura local de esta región permanezcan inalterados. Ésto se basa en que la sustitución de los nucleótidos conservados y/o la distorsión de la estructura del origen en esta zona derivan en: i) incapacidad para que la RNAP de *B. subtilis* se una a un fragmento ssDNA conteniendo esta señal alterada, ii) incapacidad para que este enzima sintetice RNA cebadores a partir de este mismo sustrato, iii) incremento *in vivo* de las formas ssDNA plasmídica en pneumococos, iv) baja eficiencia en la síntesis de la cadena retrasada, registrada *in vitro*, tanto en *S. aureus* como en *S. pneumoniae*, y v) iniciación inespecífica de la cadena complementaria de estos plásmidos, en ambos huéspedes. Es lógico pensar, que todas estas consecuencias derivadas de la alteración de la región  $RS_B$ , sean simplemente causadas por la primera, es decir, por la falta de interacción directa entre la RNAP y el *ssoA*. Estos datos plantean la posibilidad de que exista una unión específica del enzima a la zona del origen que contiene el  $RS_B$ . Sin embargo, aún no tenemos datos suficientes como para descartar la posibilidad de que la RNAP se una a otra región del origen y que las mutaciones generadas en el  $RS_B$  impidan (por ejemplo, mediante actuación a distancia) la interacción proteína-DNA. Este supuesto no parece ser el que verdaderamente esté actuando, ya que se cuenta con más datos que favorecen la primera de las hipótesis planteadas. Estos datos están relacionados con los puntos de iniciación de la cadena retrasada mapeados en los experimentos de replicación *in vitro*. Tanto en el sistema de *S. aureus* como en el de *S. pneumoniae* la síntesis de la cadena retrasada de pLS1 (sitios de transición RNA-DNA) tiene lugar en una zona próxima a CS-6 (ver Fig. 40). Dado que el tamaño del "primer" mayoritario sintetizado a partir del *ssoA* de pLS1 es de aproximadamente 21 nt (Fig. 43), la RNAP bacteriana tendría que haberse unido a una región del DNA que estuviese a unos 21 nt por detrás de estos sitios de iniciación de la cadena complementaria, más la distancia correspondiente, en nucleótidos, de una región promotora clásica (entre 35 y 36 pb), siempre y cuando este enzima interaccione con una zona característica, como sería de esperar. Dado que la RNAP utiliza como molde la hebra de DNA opuesta a la que se une, se buscó una región en donde este enzima pudiera interaccionar con el *ssoA* y que coincidiera con los resultados obtenidos. Es bien sabido que



**Figura 58. Posible sitio de unión de la RNAP al *ssrA* de pLS1.** Se representa el plegamiento intracatenario de la hebra (+) del DNA de pLS1 predicho por ordenador para la región del *ssrA*. Se enmarcan las posibles secuencias -10 y -35 que pudiesen servir como sitio de unión de la RNAP. Una vez unida, el enzima sintetizaría un pequeño transcrito de 21 nt a partir de la A ubicada en la coordenada 4176 de pLS1, cuya síntesis terminaría unos nucleótidos después de haber pasado la región CS-6 (coordenada 4156; los límites de este pRNA se señalan con dos flechas). A continuación ocurriría la transición RNA-DNA. Se señala la posición en esta secuencia (130) a partir de la cual tiene lugar la incorporación de dNTPs a la cadena complementaria en el sistema de *S. pneumoniae*. Este punto corresponde a la banda de 130 nt obtenida en los experimentos de mapeo de los sitios de iniciación de la cadena complementaria del plásmido.

la función principal de la RNAP en la célula es la transcripción de genes codificados por el DNA. También se sabe que existen varios tipos de secuencias promotoras con las que este enzima puede interaccionar y así promover la síntesis del RNA, cuyo reconocimiento específico depende principalmente del factor sigma ( $\sigma$ ) que lleve asociado el holoenzima (Helmann y Chamberlin, 1988). El factor  $\sigma$  más abundante en *E. coli* es  $\sigma^{70}$  (Collado-Vides y cols., 1991). Este factor, formando parte del holoenzima, reconoce una clase de promotores que se caracterizan por poseer dos regiones consenso centradas en las posiciones -10 y -35 respecto al sitio de iniciación de la transcripción. La mayoría de los promotores pertenecen a esta clase y las secuencias consenso reconocidas son 5'-TATAAT-3' en la región -10 y 5'-TTGACA-3' en la región -35 (McClure, 1985; Lisser y Margalit, 1993) siendo importante que estén espaciadas unos  $17 \pm 1$  pares de bases. Desde la región -10 a la posición +1 (primer rNTP incorporado en la cadena de RNA) hay 6 pb más, consiguiéndose así una distancia total, desde el punto +1 a la región -35 del promotor, de unos 34 a 36 pb. *B. subtilis* posee una subunidad  $\sigma$  muy similar a la  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, es la llamada  $\sigma^A$ , o  $\sigma$  vegetativa (Haldenwang, 1995), mayoritaria en condiciones normales de crecimiento. Las secuencias consenso que reconoce en las zonas -10 y -35 son idénticas a las reconocidas por la subunidad homóloga de *E. coli* (Helmann, 1995). Por otro lado, se sabe que tanto en *S. aureus* como en *S. pneumoniae*, la mayoría de los promotores presentan también este tipo de secuencias consenso, que son reconocidas por la RNAP bacteriana.

En las proximidades de la región  $RS_B$  de pLS1 se encuentra una secuencia -35 idéntica a la consenso definida para estos promotores (Fig. 58). Diecisiete nucleótidos "corriente arriba" de ésta se encuentra una secuencia nucleotídica que guarda cierta homología con la región -10 (5'-TAcgcT-3'). Seis nucleótidos más hacia el extremo 5' del origen, podría encontrarse el punto +1 del "primer" (A, localizada en la coordenada 4177 de pLS1). Si se cuentan desde allí 21 nt en la misma dirección sobre la secuencia del *ssxA*, nos encontramos con los puntos de iniciación de la síntesis del DNA de la cadena complementaria mapeados en los experimentos *in vitro*. Este hecho, nos permitió establecer un modelo para la interacción de la RNAP en el *ssxA* de pLS1 (Fig. 58). Dado que este es un enzima de gran tamaño y se sabe que ocupa regiones de DNA adyacentes a las secuencias -10 y -35 de los promotores estudiados, se podría pensar que las secuencias desapareadas del  $RS_B$ , así como la estructura local de la horquilla en esa región, juegan un papel importante en el

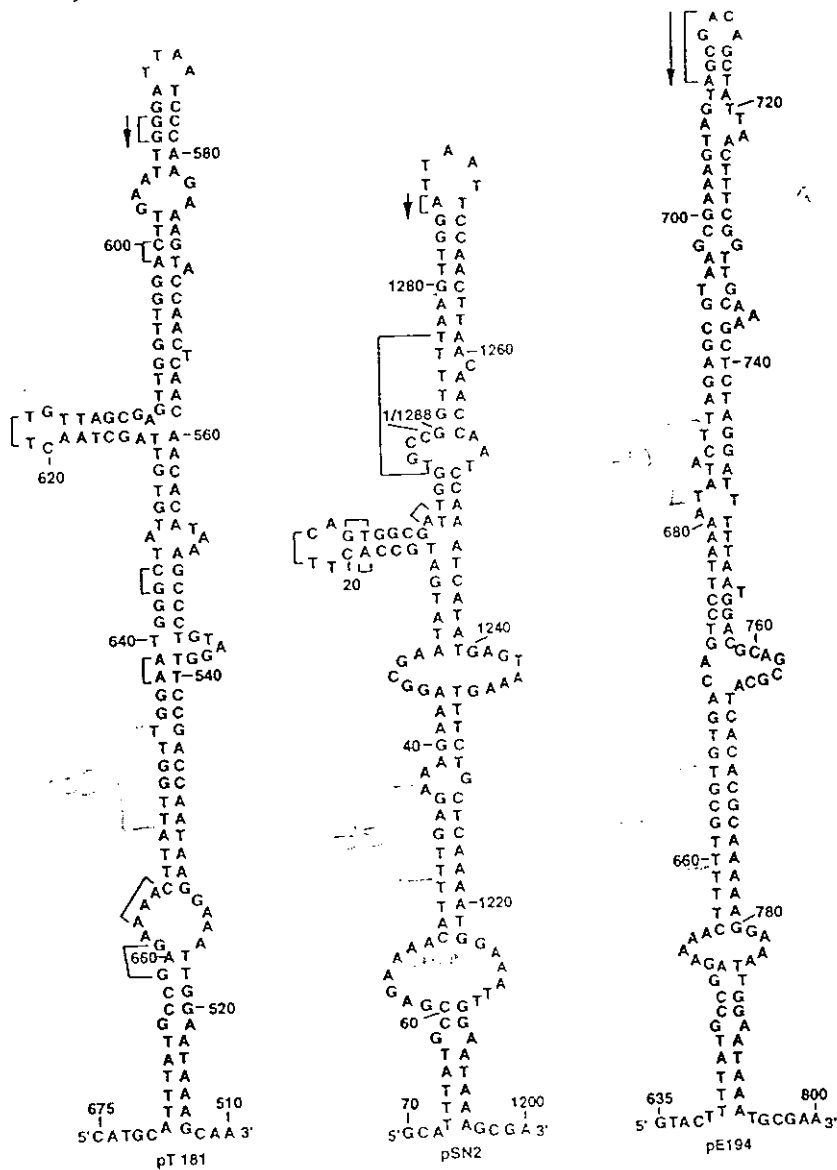
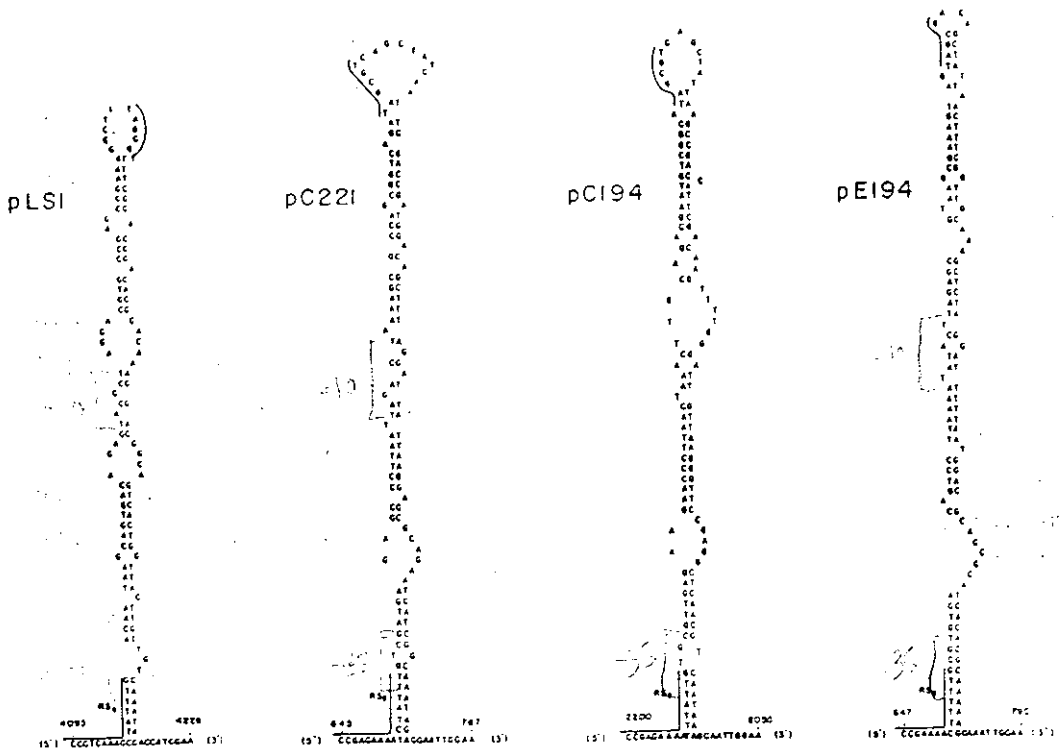


Figura 59. Sitios de transición RNA-DNA durante la síntesis de la cadena complementaria de varios plásmidos. Se presenta la estructura secundaria predicha por ordenador para la región del *ssaA* de pT181, pSN2 y pE194. Las coordenadas en cada secuencia corresponden a las publicadas por Khan y Novick (1982) y Horinouchi y Weisblum (1982a). Los corchetes indican los puntos mayoritarios para la iniciación de la cadena retrasada mapeados en experimentos de replicación *in vitro* en *S. aureus*. Se señala la dirección de la síntesis de DNA a partir de los primeros puntos de iniciación mapeados (flechas). Figura tomada de Dempsey y cols. (1995). Se indican las posibles secuencias -10 y -35 que puedan actuar como sitios de unión de la RNAP, propuestas en nuestro trabajo.

reconocimiento y unión del enzima al DNA. Es de destacar, la importancia que tiene la presencia de una región parcialmente apareada en el tallo de la estructura secundaria del *ssO4* de pLS1 (conteniendo los nucleótidos conservados del  $RS_B$ ), ya que si se induce el apareamiento completo o el desapareamiento general de esta región, la RNAP no se une al origen (Fig. 42). Existen promotores que contienen secuencias anteriores a la región -35 que afectan al proceso de unión del enzima al DNA, así como a la isomerización del DNA a complejo abierto (Bracco y cols., 1989; Buckle y cols., 1991). De esta forma, se podría explicar por qué alteraciones en la zona del  $RS_B$  tienen consecuencias drásticas en la unión de la RNAP y funcionalidad de este origen de replicación en todos los huéspedes ensayados. Como elemento a favor de esta hipótesis, podrían citarse los resultados obtenidos por Dempsey y cols. (1995), quienes determinaron los puntos de iniciación de la cadena complementaria (incorporación del primer dNTP) a partir del *ssO4* de los plásmidos pT181, pSN2 y pE194 de estafilococos (Fig. 59). En estos plásmidos, la cadena retrasada se inicia en varios sitios del *ssO4* que se mapearon muy cerca y hacia la izquierda del lazo de la horquilla del origen, al igual que sucede en pLS1. Si se observa la estructura secundaria del *ssO4* de estos plásmidos, se verá la gran similitud existente entre ellos y el de pLS1, así como la disposición común de la región  $RS_B$  en la base del tallo de la horquilla formada. En estas representaciones se puede ver una pequeña burbuja desapareada y conservada en todas ellas incluida en la región  $RS_B$ . Próxima a ella se encuentra, en todos estos plásmidos, una secuencia con cierto grado de homología a una región promotora -35 (Fig. 59). Si se continúa unos 17 o 18 nt en dirección al lazo de estas horquillas, se puede encontrar en el *ssO4* de pE194, una secuencia altamente homóloga con una región -10, o escasamente homóloga a ella para el resto de los plásmidos.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para pLS1 y los publicados para pT181, pSN2 y pE194 relativos a los puntos de iniciación de la cadena complementaria, determinados a partir de sus respectivos orígenes de replicación, se podría plantear que en estos últimos replicones, i) la RNAP también se une al DNA en una posible secuencia promotora, para lo cual la correcta disposición de la región  $RS_B$  sería fundamental, y ii) que también se sintetizan RNA cebadores de unos 20 a 30 nt de longitud, que podrán ser utilizados por las DNA polimerasas del huésped, para sintetizar la cadena retrasada de cada plásmido. Si esto fuera cierto, el mecanismo de unión de la RNAP al *ssO4* de pT181, pSN2

y pE194 coincidiría con el modelo propuesto para pLS1. Esta misma disposición y estructura general del origen, así como la ubicación de la región CS-6 en el lazo de la misma, había sido propuesta ya, para los plásmidos pC221, pC194, pE194 y pLS1 (del Solar y cols., 1987a; Fig. 60). En estos casos, de haberse continuado la estructuración de esta secuencia un poco más por debajo de las representadas, se hubiera conseguido una disposición de cada *ssmA* más parecida a las que aparecen dibujadas en la Figura 59. A pesar de que no se dispongan de datos relativos a los puntos de iniciación de la cadena complementaria en pC221 y pC194, se podría proponer, en base a la homología de secuencia y estructura de todos estos orígenes, así como de la presencia de posibles secuencias promotoras en los *ssmA* de estos plásmidos (Fig. 60), ubicados en posiciones análogas a la de los anteriores, que presenten un mecanismo de iniciación específico y similar al de pLS1.



**Figura 60. Estructura secundaria propuesta para el *ssmA* de pLS1, pE194, pC221 y pC194.** Las configuraciones han sido generadas mediante análisis por computador y posterior refinamiento a mano. Se han subrayado las secuencias conservadas en la base izquierda del tallo ( $RS_B$ ) y en el lazo (secuencias homólogas a CS-6) de ambas estructuras. Las coordenadas mostradas corresponden a las publicadas por Projan y cols. (1985) y Horinouchi y Weisblum (1982a; 1982b). Figura tomada de del Solar y cols. (1987a). Se agregaron las posibles secuencias -10 y -35 que puedan actuar como sitios de unión de la RNAP.

Sin embargo, hay una serie de datos que cuestionan esta propuesta, es decir, que la región  $RS_B$  sea la señal que determine la unión de la RNAP bacteriana al origen de hebra sencilla. En primer lugar, el plásmido pUB112 aislado de *S. aureus*, cuyo *ss**A* se ha incluido dentro del tipo *ss**A* de orígenes de replicación, no presenta ninguna secuencia homóloga a  $RS_B$  (Novick, 1989; Fig 2), aunque posee una zona con cierta homología a las secuencias que aparean con ella hacia el extremo 3' de la horquilla, y a las regiones promotoras -10 y -35, en una región análoga a la de los plásmidos anteriores, que podrían estar implicada en la unión de la RNAP. Esto indicaría que la región  $RS_B$  no es indispensable en todos los plásmidos para el buen funcionamiento de esta clase de orígenes. Es posible, sin embargo, que el *ss**A* de pUB112 goce de una disposición espacial particular que facilite la interacción del enzima con el DNA plasmídico y le permita prescindir de regiones que para otros plásmidos son fundamentales. Un ejemplo similar lo constituye la señal *ss**U*. En este caso, resulta curioso que, a pesar de que el inicio de la replicación a partir de este origen depende también de la RNAP del huésped (Fig. 51; Dempsey y cols., 1995), no existan regiones homólogas entre ambas señales de replicación. Cabría esperar que por lo menos presentase una zona parecida al  $RS_B$  del *ss**A* y/o una región homóloga a las secuencias consenso -10 y -35 de promotores clásicos. Sin embargo, no parece que la señal *ss**U* posea alguna de estas características, que además corresponda con los resultados de iniciación obtenidos *in vitro*, es decir, un único punto de iniciación de la cadena retrasada (incorporación del primer dNTP) ubicado en las coordenadas 3448 de pMV158 (Fig. 54) y 1299 de pUB110 (Dempsey y cols., 1995).

En segundo lugar, los numerosos sitios de iniciación de la cadena complementaria (entre 5 y 22 sitios principales) registrados *in vitro* para los plásmidos pT181, pSN2, pE194 (Fig. 59) y pLS1 (Fig. 40), donde a su vez se mapearon puntos de iniciación diferentes según el sistema de replicación empleado (*S. aureus* o *S. pneumoniae*). Como estos puntos corresponden a los sitios donde tiene lugar la transición de RNA a DNA de la cadena retrasada, los resultados sugieren que dicha transición ocurre en múltiples posiciones para los orígenes del tipo *ss**A*. Dempsey y cols. (1995) propusieron que ésto podría deberse a la síntesis de RNA cebadores de un tamaño fijo, iniciados en varias posiciones del *ss**A* o alternativamente, que la RNAP iniciara la síntesis de estos "primer" desde una única posición "corriente arriba" del lazo central de la estructura del origen y sintetice moléculas de RNA

de diferentes tamaños. Ambas posibilidades explicarían la existencia de puntos de transición en varios sitios del DNA plasmídico. Dado que las moléculas de RNA generadas en los experimentos de transcripción *in vitro* presentan principalmente un tamaño fijo, de 21 nt, es probable que sea la primera de estas propuestas la que verdaderamente tenga lugar en estos plásmidos. Ésto indica que la RNAP tendría que unirse a distintas posiciones del *ssmA* para poder cumplir ambos requisitos: síntesis de un "primer" de un tamaño concreto y múltiples puntos de transición RNA-DNA durante la replicación de la cadena retrasada. Un hecho a tener en cuenta, y que podría explicar esta situación, es que para la determinación del tamaño de los RNA sintetizados *in vitro* se empleó la RNAP de *B. subtilis*, mientras que los sitios de incorporación del primer dNTP a la cadena complementaria de estos plásmidos se consiguieron utilizando extractos proteicos de estafilococos o de pneumococos. Dado que los puntos de iniciación de la cadena retrasada determinados *in vitro* para pLS1 en *S. aureus* difieren respecto a los obtenidos en *S. pneumoniae*, también es posible que la iniciación de esta cadena sea distinta en *B. subtilis*. Si, por ejemplo, esta transición tuviera lugar principalmente en un punto del *ssmA*, como sucede para la replicación a partir del *ssmU* en estafilococos, entonces la unión de la RNAP tendría que suceder en una posición fija de este origen. Luego, es posible que la RNAP de *S. aureus* y *S. pneumoniae* dieran lugar a "primers" de diferentes tamaños, que pudieran explicar el anclaje de la RNAP a un único sitio del *ssmA* y la existencia de múltiples sitios de transición RNA-DNA.

Por otro lado, las mutaciones generadas en la otra región conservada del *ssmA*, CS-6, también tienen consecuencias negativas en cuanto a la eficiencia y especificidad de inicio de la cadena retrasada de pLS1. Proponemos que la región CS-6 está implicada en la terminación de los "primer" sintetizados por la RNAP (es decir, que sea el lugar en que la RNAP se suelta del DNA y/o permita la transición hacia la síntesis de DNA), dado que las mutaciones generadas en esta región, derivan en: i) cambio del patrón de tamaños de los transcritos sintetizados a partir de estos orígenes alterados, dando lugar a moléculas de RNA más grandes que las sintetizadas a partir del *ssmA* silvestre, ii) descenso en la especificidad de inicio de la cadena retrasada en *S. aureus*, y iii) descenso en la eficiencia de síntesis de la cadena complementaria *in vivo* o *in vitro*, dependiendo del huésped. Por otro lado, sigue habiendo unión de la RNAP a los fragmentos ssDNA conteniendo estas mutaciones, con una eficiencia similar a la de los que llevan la señal silvestre. Ésto indica que la región CS-6 no

interviene en la unión de la RNAP al *ssoA*, sino que tiene que ver con la especificidad en la síntesis de los RNA cebadores de la cadena complementaria del plásmido.

Ya habíamos comentado que la secuencia CS-6, cuando se encuentra presente, se ubica en el lazo de la horquilla del *ssoA* plasmídico. Se sabe además, que varias secuencias que codifican para terminadores transcripcionales presentan estructuras secundarias y concentraciones de As en su secuencia nucleotídica (Wilson y von Hippel, 1995). En el caso de pLS1, el primero de los puntos de transición RNA-DNA está precedido por un conjunto de tres Ts alrededor de la coordenada 4152 del plásmido (Fig. 40). En el lazo de la estructura del *ssoA* de pE194 se encuentra la secuencia 5'-TAGCGa-3', que es prácticamente igual a la consenso CS-6, desde donde se mapearon los principales puntos de iniciación de la cadena retrasada en este replicón (Fig. 59). Como dichos sitios presentan una ubicación análoga a los de pLS1 (hacia la izquierda del lazo de la horquilla del origen), se podría plantear que, al igual que en el caso anterior, esta secuencia conservada también tenga que ver con el fin de la transcripción de los "primer" en pE194. Del mismo modo, se podría hacer extensiva esta propuesta a pC221, pC194 y los demás replicones que lleven la secuencia CS-6 en su origen.

Sin embargo, y contrariamente con lo que sucede en *S. aureus*, se ha visto que las mutaciones en esta región prácticamente no alteran el patrón de iniciación de la cadena retrasada de pLS1 en *S. pneumoniae* (Fig. 39), es decir, que probablemente tampoco alteren significativamente la longitud de los "primer" sintetizados a partir de este origen. Este hecho podría tener una explicación, ya que es posible que la presencia de los factores específicos que hacen que la replicación de esta cadena sea muy eficiente en pneumococos, intervengan además, en atenuar los efectos de las mutaciones en dicha región. De todas formas, se ha visto que los cambios generados en la secuencia CS-6 de pLS1 hacen menos eficiente la función del *ssoA* en este huésped, ya que estos derivados acumulan una cantidad considerablemente mayor de formas ssDNA que el plásmido sivestre, *in vivo* (Fig. 23). En conjunto, estos datos indican que, aunque la región conservada CS-6 no es imprescindible para la función del *ssoA*, parece tener cierta participación en el proceso de transición desde el RNA cebador al DNA de la cadena retrasada, al nivel de la terminación de la síntesis del "primer", al menos en huéspedes distintos al original como ocurre para pLS1 en *B. subtilis*

y *S. aureus*. En el caso de los plásmidos pT181 y pSN2, que carecen de una secuencia homóloga a CS-6, también se mapearon los sitios mayoritarios de iniciación de la cadena complementaria en una zona cercana y hacia la izquierda del lazo de la horquilla (Fig. 59). Estos plásmidos comparten una secuencia de 14 nt (5'-TGGGATTAAT(C/T)CCA-3'), localizada alrededor del punto de simetría palindrómico del *ssoA*, la cual podría tener la misma función planteada para CS-6. De todas formas, aún no existen evidencias experimentales que involucren esta segunda región, conservada en otros plásmidos con replicación RC, además de pT181 y pSN2 (Fig. 2), con la función de estos orígenes.

### 3. ROL DE Spn PolI EN LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS DERIVADOS DE pMV158

Los resultados obtenidos en este trabajo, definen la acción de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (Spn PolI) en el inicio de la replicación a partir del *ssoA* de pLS1. Hasta ahora, sólo se había visto la participación de la DNA polimerasa I del huésped en el inicio de la replicación de plásmidos con replicación tipo  $\Theta$  como ColE1 y otros miembros de la familia de pMB1. En este caso, la actividad polimerásica de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Eco PolI) es la responsable de extender el "primer" sintetizado en el *ori*, durante el proceso de síntesis de la cadena líder del plásmido (Itoh y Tomizawa, 1980). Por lo tanto, pLS1 constituye el primer caso de plásmidos con replicación RC, en donde se determina la intervención directa de la DNA polimerasa I bacteriana en su proceso replicativo. Para los colifagos de cadena sencilla, se había descrito la participación de la actividad exonucleásica 5'  $\rightarrow$  3' y polimerásica de Eco PolI durante la eliminación del RNA cebador de la cadena retrasada y sustitución del mismo por dNTPs después de que la conversión ss  $\rightarrow$  dsDNA fágica hubiera tenido lugar (Chen y Ray, 1976; DasGupta y Mitra, 1978). En ausencia de algunas de estas actividades se detectan moléculas de DNA bicatenarias incompletas, con discontinuidades próximas al origen de replicación de la hebra (+).

La Spn PolI consta de dos dominios funcionales: uno con actividad polimerásica y otro con actividad exonucleásica 5'  $\rightarrow$  3' (López y cols., 1989), y carece del dominio con actividad correctora 3'  $\rightarrow$  5' presente en Eco PolI (Díaz y cols., 1992a; Kornberg y Baker,

1992). La implicación funcional de PolII en el establecimiento y replicación de plásmidos que replican vía círculo rodante había sido evidenciada por primera vez por Díaz y cols. (1994). Estos autores analizaron el comportamiento *in vivo* de plásmidos conteniendo el replicón de pMV158 en estirpes de *S. pneumoniae* y *E. coli* donde se había mutado el gen *polA*, que codifica para este enzima. El efecto de transformar una cepa de pneumococos que contenga alterada la actividad polimerasa del enzima, con el DNA de pLS1 o derivados de éste, se manifiesta en: i) la reducción de la frecuencia de establecimiento plasmídico, ii) inestabilidad segregacional y descenso del número de copias de los plásmidos que consigan replicar en estas cepas mutantes, iii) acumulación intracelular de una cantidad hasta diez veces superior de formas ssDNA plasmídicas, y iv) discontinuidades de las cadena líder y retrasada localizadas a nivel del *dso* y *ssoA* del plásmido (Díaz y cols., 1994). Estos hechos involucran claramente la acción de la actividad polimerasa de Spn PolII en el establecimiento y replicación de estos plásmidos, tanto de la cadena líder como retrasada.

Otra manifestación de la deficiencia de esta polimerasa, en cuanto al establecimiento plasmídico, es la formación de colonias pequeñas durante la selección inicial, con antibiótico, de células transformadas. Se piensa que ésto sea el resultado de un enlentecimiento en el llenado del "pool" plasmídico en las células bacterianas, como consecuencia de los defectos en su replicación. Por otro lado, los mismos autores habían visto que la presencia de secuencias homólogas con el cromosoma de *S. pneumoniae* en estos plásmidos, obvian parcialmente el requerimiento de la actividad polimerásica de Spn PolII durante la transferencia plasmídica a estos huéspedes. Este fenómeno se explicó mediante la posible actuación de alguno de los mecanismos de facilitación cromosómica propuesto por López y cols. (1982), que permiten el establecimiento de plásmidos recombinantes en pneumococos. Estos mecanismos se basan en el modelo de transformación genética propuesto por Lacks (1968) para la integración de DNA exógeno conteniendo secuencias homólogas con el cromosoma de pneumococos. Aquí se establece que el DNA donador es incorporado en forma monocatenaria, debido a la acción de exo y endonucleasas que provocan la degradación de una de las hebras del DNA. El DNA que es incorporado, se aparea con la hebra complementaria de la región homóloga del DNA cromosómico y se produce un sobrecruzamiento recombinacional mediado por la proteína homónima a RecA de *E. coli* (Rhee y Morrison, 1988). El proceso de integración se completaría con la degradación

nucleolítica del fragmento de la hebra cromosómica desplazada y por unión, mediante la DNA ligasa, de los extremos del DNA donador al DNA cromosómico. Según este modelo de transformación, en ninguna de las etapas intervendría un proceso de síntesis reparadora del DNA. Sin embargo, en el modelo propuesto para el establecimiento de plásmidos sin homología con el cromosoma, donde es necesaria la incorporación por la bacteria de dos hebras complementarias del DNA donador para regenerar una molécula íntegra de plásmido (Saunders y Guild, 1981; López y cols, 1982), se requiere la acción de un enzima reparador que restaure la integridad de las dos hebras complementarias del DNA, ya que en la entrada del DNA plasmídico al interior celular se producen roturas que generan moléculas monocatenarias no íntegras. Estas hebras se aparearían por las zonas complementarias y generarían moléculas bicatenarias con regiones monocatenarias que serían reparadas por la actividad polimerásica de Spn PolI (Díaz, 1993). Este hecho explicaría la necesidad de este enzima durante el establecimiento de plásmidos sin homología con el cromosoma bacteriano, registrada para pLS1 y pLS5 (Díaz y cols., 1994).

Por otro lado, dado que la actividad exonucleasa 5' → 3' de Spn PolI es fundamental para la viabilidad celular (Díaz y cols., 1992b) y por lo tanto no se pudieron conseguir cepas mutantes en la misma, no se pudo establecer la función que tendría este dominio durante la replicación de plásmidos con el replicón de pMV158 en *S. pneumoniae* (Díaz y cols., 1994). Sin embargo, como se había visto que las actividades polimerásica y exonucleásica de Spn PolI son intercambiables con las correspondientes funciones de Eco PolI (Díaz y cols., 1992b), se realizaron los mismos experimentos en cepas de *E. coli* conteniendo uno u otro dominio enzimático alterado (Díaz y cols., 1994). Ésto permitió concluir a los autores que, en este huésped, cada una de las actividades enzimáticas de Eco PolI intervienen en la replicación de plásmidos con el replicón de pMV158. Para explicar los resultados que involucraban a la PolI en la replicación de estos plásmidos se habían postulado dos hipótesis. La primera (Díaz, 1993), sugería que el holoenzima PolIII inicia la replicación de las hebras líder y retrasada de pLS1. Luego, el efecto observado en la replicación del plásmido, en las estirpes bacterianas con mutaciones en el gen *polA*, serían consecuencia de la elevada utilización de PolIII (o de alguna de sus subunidades) para sustituir a PolI, en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la replicación cromosómica. Ésto derivaría en la falta de PolIII para iniciar la síntesis de ambas cadenas plasmídicas, lo que

explicaría la presencia de intermediarios de replicación que no hubiesen iniciado el proceso. La segunda, (Díaz y cols., 1994) plantea la posibilidad de que PolI inicie la replicación de ambas cadenas del DNA plasmídico y posteriormente sea PolIII la que continúe el proceso de elongación de las hebras líder y retrasada. Esta teoría explicaría, al igual que la anterior, la presencia de discontinuidades a nivel de ambos orígenes de replicación y la ineficiencia durante la conversión de ssDNA a dsDNA plasmídico, registrada *in vivo*. Ambas propuestas coinciden en que, al igual que sucede durante el proceso replicativo de M13, la actividad exonucleasa 5' → 3' del enzima sea la encargada de degradar el RNA cebador de la cadena retrasada y que la actividad polimerasa rellene con dNTP la zona resultante.

En este trabajo conseguimos precisar el nivel concreto de actuación de Spn PolI durante la replicación desde el *ssoA* de pLS1, lo que nos permitió apoyar la segunda de las dos hipótesis planteadas (ver párrafo anterior), al menos en lo que se refiere a la síntesis de la cadena retrasada del plásmido. Además, la realización de ensayos de replicación *in vitro* nos han permitido valorar la participación de los dominios polimerasa y exonucleasa de Spn PolI en este proceso. En los experimentos de síntesis *in vitro* de la cadena retrasada utilizando extractos de estirpes de *S. pneumoniae* con mutaciones en el gen *polA* que anulan la actividad polimerasa de Spn PolI (MP547) o disminuyen, tanto ésta como la exonucleasa 5' → 3' (MP560 y MP547, respectivamente) se pudo observar que cualquiera de estas alteraciones conducen a una ineficiente iniciación de la replicación a partir del *ssoA* de pLS1 (Fig. 45A). Esta deficiencia sólo se pudo corregir mediante la adición de la proteína PolI pura a la reacción, mientras que cuando se agregó solamente el dominio polimerásico del enzima (PolIc269), no se consiguió ningún cambio demasiado significativo. Ésto indica que se requiere la función del enzima completo para que la replicación de la cadena retrasada de pLS1 tenga lugar en este sistema. Se podría sugerir entonces, que la proteína PolIII del huésped, encargada de la síntesis de la hebra complementaria del ssDNA plasmídico, sería incapaz de extender el extremo 3'-OH de las moléculas de RNA cebadoras, debido posiblemente a problemas estéricos en este origen, y por lo tanto, sea necesario la participación de PolI para incorporar los primeros dNTPs a dicha cadena. A continuación, PolIII podría relevar la función de PolI y continuar la síntesis. Se ha demostrado la participación *in vivo* de PolIII en la síntesis del DNA de pT181, mediante la adición de 5-hidroxifenil azouracilo, un potente inhibidor de este enzima (Majumder y Novick, 1988).

#### 4. MODELO DE INICIACIÓN DE LA CADENA RETRASADA PARA PLÁSMIDOS CON UN ORIGEN *ss<sub>o</sub>A*

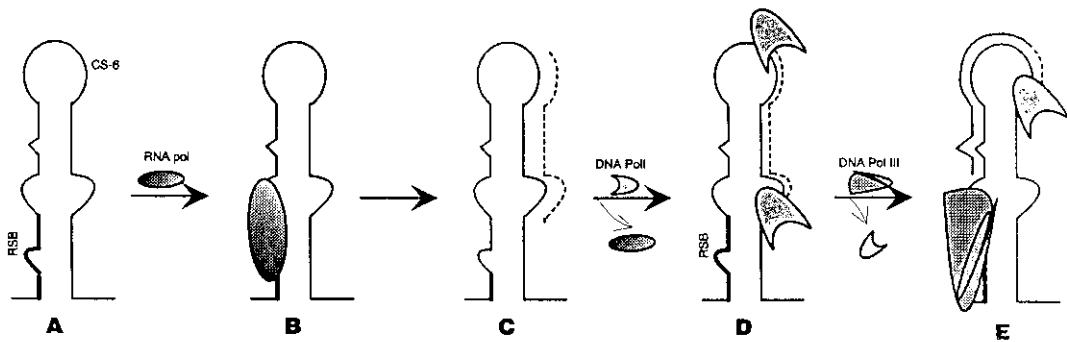
El modelo de iniciación que proponemos para la síntesis de la cadena complementaria de plásmidos con replicación RC que contengan un origen de replicación tipo *ss<sub>o</sub>A*, se basa en los resultados obtenidos para pLS1 (este trabajo) y de los obtenidos para pE194 (Dempsey y cols., 1995), reinterpretados más arriba. Según éstos, la RNAP bacteriana se uniría a una secuencia promotora próxima a la región RS<sub>B</sub> del origen y sintetizaría RNA cebadores de tamaños comprendidos entre 20 y 30 nt, dependiendo del huésped. Al igual que sucede para la replicación de colifagos de cadena sencilla y en particular para M13, fd y f1 (que presentan un mecanismo de iniciación de la cadena complementaria similar al de estos plásmidos), se requiere que el *ss<sub>o</sub>* adopte una configuración espacial determinada para que la interacción RNAP-DNA pueda tener lugar en el origen. En estos fagos, así como en el caso de G4 y øX174, se había visto la necesidad de SSB de *E.coli* para conseguir la estructuración del *ss<sub>o</sub>* y la síntesis específica de RNA cebadores de la cadena retrasada (ver Introducción). Sin embargo, nuestros resultados difieren al respecto, ya que la presencia de SSB en los ensayos de transcripción *in vitro* no favorece de forma significativa la síntesis de RNA desde el *ss<sub>o</sub>A* de pLS1. Por lo tanto, aquí la estructuración del origen no parece estar determinada por SSB, sino por la propia secuencia de DNA de dicha región.

El mecanismo mediante el cual el RNA cebador es sintetizado no está aún bien entendido y se supone que es bastante diferente al mecanismo de transcripción general. Por ejemplo, existen evidencias de que el pRNA se mantiene como un híbrido estable asociado al DNA molde (Geider y cols., 1978). En este caso, la estructura del tallo del DNA templado no compete de manera obvia con el "primer" recién sintetizado. Esto contrasta con lo que sucede normalmente después de la transcripción a partir de un promotor común en un DNA bicatenario, en donde las cadenas de DNA se reanillan una vez transcurrido el proceso y el RNA recién sintetizado es liberado.

Una vez sintetizado el o los "primer", la DNA polimerasa I del huésped sería la encargada de promover la síntesis de la hebra complementaria, mediante la extensión inicial

de estos pRNAs. Dado que en *S. pneumoniae* se necesita para ello la actuación del enzima completo (Spn PolI), habría que explicar por qué su dominio polimerasa aislado (PolIc269), cuya función en la síntesis de DNA se sabe que es muy eficiente (Pons y cols., 1991), no es capaz por sí mismo de iniciar el proceso. Podría tratarse de una cuestión de conformación enzimática, es decir, que fuese necesario que ambos dominios de Spn PolI (polimerasa y exonucleasa 5' → 3') necesiten estar acoplados para conseguir una disposición funcional que permita el reconocimiento del origen de replicación. Por otro lado, el hecho de que no se haya podido detectar la presencia de pRNAs durante la replicación *in vitro* de la cadena retrasada de los plásmidos pT181, pE194, pSN2 (en el sistema de *S. aureus*; Dempsey y cols., 1995) y pLS1 (en el sistema de *S. pneumoniae*) da lugar a una serie de especulaciones que podrían explicar esta situación. Por ejemplo, que en el proceso replicativo de la cadena retrasada de plásmidos con replicación RC, actúe más de una molécula de PolI: una de ellas podría elongar el "primer" en unos 80 a 100 nt, mientras que otra molécula reemplazaría este pRNA por DNA recién sintetizado (ésta es la hipótesis que planteamos en nuestro modelo). Alternativamente, podría existir en estos replicones, un mecanismo similar al definido para la exonucleasa 5' del fago T5 (Ceska y cols., 1996), en donde el pRNA podría deslizarse a través del arco helicoidal formado en el dominio exonucleolítico de la proteína y ser escindido simultáneamente por dicha actividad enzimática. En cualquiera de estos dos casos, los RNA cebadores habrían sido eliminados rápidamente, lo que impediría su detección en el tiempo en que se realizaron los ensayos de replicación. La síntesis de la cadena retrasada de estos plásmidos se completaría mediante la actuación de la DNA polimerasa III bacteriana y ligación de los extremos 5' y 3' de dicha cadena por la ligasa del huésped. Un esquema del modelo de iniciación de la replicación a partir del *ssrA* que proponemos, se esquematiza en la Figura 61.

Zhang y cols. (1994), habían descrito que el plásmido de amplio rango de huésped pEP2, un derivado de pNG2 aislado de *Corynebacterium diphtheriae* y transferido posteriormente a *E. coli*, cuyo mecanismo de replicación parece ser vía RC, requiere la DNA polimerasa I bacteriana para su replicación. Las evidencias con las que cuentan, es que pEP2 puede ser introducido en una cepa de *E. coli* (que contiene un alelo *polA* sensible a la temperatura), sólo a la temperatura permisiva, y el plásmido se pierde rápidamente cuando se incuba el cultivo a la temperatura no permisiva (42 °C). Los autores no habían propuesto



**Figura 61. Modelo de iniciación de la replicación a partir de orígenes del tipo *ssxA*.** Se representa esquemáticamente el *ssxA* de pLS1, indicándose las regiones conservadas RS<sub>B</sub> y CS-6 del mismo (A). Esta señal sería reconocida por la RNAP del huésped, para lo cual requiere la presencia de la región RS<sub>B</sub> intacta. La unión del enzima al DNA plasmídico sería en una zona homóloga a un promotor clásico (B). La RNAP sintetiza uno o varios "primer" tomando como molde la hebra de DNA opuesta a la que se une. A la altura de CS-6 se produce el relevo de la RNAP por una molécula de DNA polimerasa I, la cual adicionaría unos pocos dNTPs a la cadena complementaria (C). A continuación, o simultáneamente, otra molécula de DNA polimerasa I degradaría el o los pRNAs y la DNA polimerasa III bacteriana continuaría la síntesis de la hebra retrasada a partir del oligonucleótido generado por la PolI, hasta completar el proceso replicativo (D).

una explicación a este hecho, incluyéndolo como una curiosidad en la discusión de sus resultados. De acuerdo a los datos que disponemos sobre la replicación de este tipo de plásmidos, podríamos sugerir dos posibles explicaciones al respecto. La más simple, sería que a la temperatura no permisiva, se estuviese afectando la actividad de la proteína Rep del plásmido, haciéndola menos eficiente para la replicación desde el *dso*. La otra, hacia la cual nos inclinamos, estaría relacionada con el modelo de iniciación de la cadena complementaria propuesto en este trabajo, donde la falta de PolI impediría la síntesis desde el *ssso* (y/o *dso*) del plásmido. De ser así, podríamos generalizar la necesidad de PolI en el proceso replicativo de varios plásmidos con replicación RC. Sin embargo, resta aún mucho por estudiar para poder comprender el mecanismos de replicación de estos plásmidos, incluso es muy posible que se trate de mecanismos particulares (y no generales) que se lleven a cabo dependiendo del tipo de replicón y/o tipo de huésped bacteriano en donde éste se encuentre.

## **CONCLUSIONES**

---

Las conclusiones más importantes que se derivan de este trabajo, se resumen a continuación.

1. El *ss**oA* de pMV158 está limitado por las coordenadas 5150 y 5349 del plásmido. La función de este origen de replicación depende del huésped, siendo muy eficiente en la conversión ss → dsDNA en *S. pneumoniae* y poco eficiente en *B. subtilis* y *S. aureus*.

2. La RNAP bacteriana es el enzima encargado de sintetizar los RNA cebadores de la cadena retrasada a partir del *ss**oA* de pMV158. Tanto la secuencia de las bases desapareadas como la estructura local de la región RS<sub>B</sub> son necesarias para que la RNAP pueda interaccionar con el origen. Si se altera esta región mediante sustitución de nucleótidos, la afinidad del enzima por el DNA disminuye notablemente y como consecuencia los niveles de síntesis de la cadena complementaria descienden de forma considerable. La RNAP de *B. subtilis* es capaz de sintetizar pequeños transcritos de unos 20 nt a partir de este origen de replicación.

3. Si se sustituyen los nucleótidos conservados de la región CS-6, así como si se altera la estructura local del lazo formado en el *ss**oA* de pMV158, el patrón de síntesis de pRNAs cambia dependiendo del tipo de mutación introducida. Este hecho podría estar relacionado a una función de CS-6 en la terminación de la transcripción de los RNA cebadores.

4. La transición RNA → DNA durante la síntesis de la cadena retrasada del plásmido tiene lugar en diversas posiciones del *ss**oA*. Dichos puntos mapean en una región adyacente y hacia la izquierda (siguiendo la dirección de la replicación) de la secuencia CS-6, cuyas posiciones específicas dependen del huésped. Así, la síntesis de DNA de la hebra retrasada en *S. aureus* ocurre desde al menos siete puntos contiguos de dicho origen, mientras que en *S. pneumoniae*, el mismo proceso tiene lugar a partir de cuatro sitios principales ubicados más distantes entre sí. Mutaciones dirigidas a la región RS<sub>B</sub> de este origen conducen a eliminar la especificidad de inicio en la mayoría de los casos, mientras que las mutaciones dirigidas a la zona CS-6 de pMV158 sólo vuelven inespecífica la iniciación en *S. aureus*.

5. La especificidad con que tiene lugar la iniciación de la replicación de la cadena

retrasada plasmídica no está relacionada con la eficiencia de síntesis de esta cadena en el mismo huésped. Así es que, aunque la eficiencia de replicación *in vivo* a partir del *ssmA* de pMV158 es muy baja en *S. aureus*, ésta se inicia de forma específica desde puntos concretos del origen.

6. Se necesita la acción conjunta de ambos dominios de la DNA polimerasa I de *S. pneumoniae* (polimerasa y exonucleasa 5' → 3') para que pueda tener lugar la replicación a partir del *ssmA* de pMV158. Este hecho pone de manifiesto la participación del enzima completo en las etapas iniciales de síntesis de la cadena retrasada plasmídica.

7. La región que comprende al *ssmA* de pMV158 confiere estabilidad segregacional a plásmidos inestables derivados de éste, en *S. pneumoniae* y *B. subtilis*. Ésto indica que en esta zona, o asociada a ella, podrían encontrarse elementos que favorezcan la segregación plasmídica a las células hijas durante la división celular. Por lo tanto, esta señal podría considerarse como un elemento que favorece la colonización de nuevas bacterias.

8. El *ssmU* de pMV158 es muy eficiente en la conversión ss → dsDNA del plásmido en los huéspedes gram(+) ensayados, como *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Así pues, se podría considerar también esta señal de replicación como un elemento que puede favorecer la colonización de nuevas bacterias.

9. El mecanismo de iniciación de la cadena complementaria a partir del *ssmU* de pMV158 depende de la RNAP bacteriana.

10. La síntesis de la cadena retrasada (transición RNA → DNA) a partir del *ssmU* de pMV158 se inicia desde un único punto, C situada en la coordenada 3448 del plásmido. Este punto coincide con el sitio de iniciación mapeado por Dempsey y cols. (1995) a partir del *ssmU* de pUB110, indicando que, además de contar con secuencias nucleotídicas casi idénticas, existe una homología funcional exacta de ambos orígenes de replicación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Alonso, J.C., Stiege, C.A., Tailor, R.H. and Viret, J-F. (1988). Functional analysis of the *dna* (Ts) mutants of *Bacillus subtilis*: Plasmid pUB110 replication as a model system. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 482-489.
- Alonso, J.C. and Tailor, R.H. (1987). Initiation of plasmid pC194 replication and its control in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 349-352.
- Andrup, L., Damgaard, J., Wassermann, K., Boe, L., Madsen, S.M. and Hansen, F.G. (1994). Complete nucleotide sequence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3 and its correlation with biological properties. *Plasmid* **31**: 72-88.
- Arai, K-I. and Kornberg, A. (1979). A general priming system employing only *dnaB* protein and primase for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4308-4312.
- Arai, K-I. and Kornberg, A. (1981). Unique primed start of  $\phi$ X174 DNA replication and mobility of the primosome in a direction opposite chain synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 69-73.
- Baas, P.D. (1985). DNA replication of single-stranded *Escherichia coli* DNA phages. *Biochim. and Biophys. Acta* **825**: 111-139.
- Baas, P.D. and Jansz, H.S. (1988). Single-stranded DNA phage origins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **136**: 31-70.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1989). Plasmid structural instability associated with pC194 replication functions. *J. bacteriol.* **171**: 2271-2277.
- Banerjee, S.K., Luck, B.T., Kim, H.Y. and Iyer, V.N. (1992). Three clustered origins of replication in a promiscuous-plasmid replicon and their differential use in Pol A<sup>+</sup> strain and a delta Pol A strain of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 8139-8143.
- Bastia, D., Germino, J., Crosa, J.H. and Ram, J. (1981). The nucleotide sequence surrounding the replication terminus of plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2095-2099.
- Bates, E.E.M. and Gilbert, H.J. (1989). Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene* **85**: 253-258.
- Benz, E.W., Reinberg, D., Vicuna, R. and Hurwitz, J. (1980). Initiation of DNA replication by the *dnaG* protein. *J. Biol. Chem.* **255**: 1096-1106.
- Bergemann, A.D., Whitley, J.C. and Finch, L.R. (1989). Homology of mycoplasma plasmid pADB201 and staphylococcal plasmid pE194. *J. Bacteriol.* **171**: 593-595.
- Bertani, L.E. and Six, E.W. (1988). The P2-like phages and their parasite, P4. In: The bacteriophages. Calendar, R. (ed.). New York: Plenum Press, pp. 73-143.
- Birch, P. and Khan, S. (1992). Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 290-294.
- Boe, L., Gros, M.F., te Riele, H., Ehrlich, S.D. and Gruss, A.D. (1989). Replication origins of single-stranded DNA plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* **171**: 3366-3372.

- Böldicke, T.W., Lanka, E. and Staudenbauer, W.L. (1981). Rifampicin-resistant initiation of DNA synthesis on the isolated strands of ColE plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **9**: 5215-5231.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.I., Betlach, M.C., and Boyer, H.W. (1977). Origin of replication of pBR345 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5265-5269.
- Bouché, J.P., Rowen, L. and Kornberg, A. (1978). The RNA primer synthesized by primase to initiate phage G4 DNA replication. *J. Biol. Chem.* **253**: 765-769.
- Bouché, J.P., Zechel, K. and Kornberg, A. (1975). *dnaG* gene product, a rifampicin-resistant RNA polymerase initiates the conversion of a single-stranded coliphage DNA to its duplex replicative form. *J. Biol. Chem.* **250**: 5995-6001.
- Bouia, A., Bringel, F., Frey, L., Kammerer, B., Belarbi, A., Guyanvarch, A. and Hubert, J.C. (1989). Structural organization of pLP1, a cryptic plasmid of *Lactobacillus plantarum* CCM 1904. *Plasmid* **22**: 185-192.
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Dieckman, S. and Buc, H. (1989). Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 4289-4296.
- Bramhill, D. and Kornberg, A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**: 915-918.
- Brantl, S., Behnke, D. and Alonso, J.C. (1990). Molecular analysis of the replication region of the conjugative *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. Comparison with plasmids pAM $\beta$ 1 and pSM19035. *Nucl. Acids Res.* **18**: 4783-4790.
- Bron, S., Luxen, E. and Swart, P. (1988). Instability of recombinant pUB110 plasmids in *Bacillus subtilis*: plasmid-encoded stability function and effect of DNA inserts. *Plasmid* **19**: 231-241.
- Bron, S., Meijer, W., Holsappel, S. and Haima, P. (1991). Plasmid instability and molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **142**: 875-883.
- Bruand, C., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D. and Janni re, L. (1993). A fourth class of theta-replicating plasmids: The pAM $\beta$ 1 family from Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11668-11672.
- Bron, S., Bosma, P., Van Belkum, M.J. and Luxen, E. (1987). Stability function in the *Bacillus subtilis* plasmid pTA1060. *Plasmid* **18**: 8-15.
- Bruand, C., Ehrlich, S.D. and Janni re, L. (1991). Unidirectional theta replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM $\beta$ 1. *EMBO J.* **10**: 2171-2177.
- Buckle, M., Fritsch, A., Roux, P., Geiselman, J. and Buc, H. (1991). Kinetic studies on promoter-RNA polymerase complexes. *Meth. Enzymol.* **208**: 236-258.
- Burdett, V. (1980). Identification of tetracycline resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (Group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 753-760.
- Burdett, V. (1986). Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **165**:564-569.

- Ceska, T.A., Sayers, J.R., Stier, G. and Suck, D. (1996). A helical arch allowing single-stranded DNA to thread through T5 5'-exonuclease. *Nature* **382**: 90-93.
- Coffey, A., Harrington, A., Kearney, K., Daly, C. and Fitzgerald, G. (1994). Nucleotide sequence and structural organization of the small, broad-host-range plasmid pCI411 from *Leuconostoc lactis* 533. *Microbiology* **140**: 2263-2269.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. and Gralla, J.D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**: 371-394.
- Crosa, J.H. (1980). Three origins of replication are active *in vivo* in the R plasmid RSF1040. *J. Biol. Chem.* **255**: 11075-11077.
- Currier, T. and Nester, E. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* **76**: 431-441.
- Chang, P.C. and Cohen, S.N. (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science* **265**: 952-954.
- Chang, S., Chang, S. and Gray, O. (1987). Structural and genetic analysis of a *par* locus that regulates plasmid partition in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3952-3962.
- Chen, T-C. and Ray, D.S. (1976). Replication of bacteriophage M13. X. M13 replication in a mutant of *Escherichia coli* defective in the 5'→3' exonuclease associated with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **106**: 589-604.
- DasGupta, S. and Mitra, S. (1978). Structure of nascent replicative form DNA of coliphage M13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 153-157.
- DasGupta, S., Mukhopadhyay, G., Papp, P.P., Lewis, M.S. and Chatteraj, D.K. (1993). Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. *EMBO J.* **12**: 4547-4554.
- DasGupta, S., Masukata, H. and Tomizawa, J. (1987). Transcriptional activation of ColE1 DNA synthesis by displacement of the nontranscribed strand. *Cell* **51**: 1113-1122.
- de la Campa, A.G., del Solar, G. and Espinosa, M. (1990). Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant DNA regions. *J. Mol. Biol.* **213**: 247-262.
- de Rossi, E., Milano, A., Brigidi, P., Brini, F. and Riccardi, G. (1992). Structural organization of pBC1, a cryptic plasmid from *Bacillus coagulans*. *J. Bacteriol.* **174**: 638-642.
- de Vos, W.M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 281-295.
- del Solar, G. (1991). Replicación del plásmido de amplio espectro de huésped pLS1. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- del Solar, G., Kramer, M.G., Ballester, S. and Espinosa, M. (1993a). Replication of the promiscuous plasmid pLS1: a region encompassing the minus origin of replication is associated with stable plasmid inheritance. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 97-105.

- del Solar, G. and Espinosa, M. (1992). The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. *Mol. Microbiol.* **6**: 83-94.
- del Solar, G., Acebo, P. and Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Mol. Microbiol.* **18**: 913-924.
- del Solar, G., Díaz, R. and Espinosa, M. (1987b). Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 428-435.
- del Solar, G., Pérez-Martín, J. and Espinosa, M. (1990). Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from *repAB* promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J. Biol. Chem.* **265**: 12569-12575.
- del Solar, G., Puyet, A. and Espinosa, M. (1987a). Initiation signals for the conversion of single stranded to double stranded DNA forms in the streptococcal plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5561-5580.
- del Solar, G., Moscoso, M. and Espinosa, M. (1993b). *In vivo* definition of the functional origin of replication (*ori*(+)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 65-72.
- del Solar, G., Alonso, J.C., Espinosa, M. and Díaz-Orejás, R. (1996). Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol. Microbiol.* **21**: 661-666.
- Dempsey, L.A., Zhao, A.C. and Khan, S.A. (1995). Localization of the start sites of lagging strand replication of plasmids from gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 679-687.
- Devine, K.M., Hogan, S.T., Higgins, D.G. and McConnell, D.J. (1989). Replication and segregational stability of the *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bacteriol.* **171**: 1166-1172.
- Díaz, A. (1993). Localización y función de los dominios enzimáticos de la DNA polimerasa I de *Streptococcus pneumoniae*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Díaz, A., Pons, M.E., Lacks, S.A. and López, P. (1992). *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I lacks 3'→5' exonuclease activity: localization of the 5'→3' exonucleolytic domain. *J. Bacteriol.* **174**: 2014-2024.
- Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P. (1992). The 5'→3' exonuclease activity of DNA polymerase I is essential for *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 3009-3019.
- Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P. (1994). Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Microbiol.* **14**: 773-783.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Erauso, G., Marsin, S., Benbouzid-Rollet, N., Baucher, M., Barbeyron, T., Zivanovic, Y., Prieur, D. and Forterre, P. (1996). Sequence of plasmid pGT5 from the Archaeon *Pyrococcus abyssi*: Evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacteriol.* **178**: 3232-3237.

- Espinosa, M., López, P., Pérez-Ureña, M.T. and Lacks, S.A. (1982). Interspecific plasmid transfer between *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 195-201.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Flensburg, J. and Calendar, R. (1987). Bacteriophage P4 DNA replication. Nucleotide sequence of the P4 replication gene and the cis replication region. *J. Mol. Biol.* **195**: 439-445.
- García-Bustos, J.F. and Tomasz, A. (1987). Teichoic acid-containing mucopeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrates for the pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* **169**: 447-453.
- García, J.L., García, E. and López, R. (1987). Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**: 52-56.
- Geider, K., Beck., E. and Schaller, H. (1978). An RNA transcribed from DNA at the origin of phage fd single strand to replicative form conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 645-649.
- Geider, K. and Kornberg, A. (1974). Conversion of the M13 viral strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *J. Biol. Chem.* **249**: 3999-4005.
- Gielow, A., Diederich, L. and Messer, W. (1991). Characterization of a phage-plasmid hybrid (phasyl) with two independent origins of replication isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 73-79.
- Gigliani, F., Ciotta, C., del Grosso, M.F. and Battaglia, P. (1993). pR plasmid replication provides evidences that single-stranded DNA induces the SOS system *in vivo*. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 333-338.
- Gilbert, W. and Dressler, D. (1968). DNA replication: the rolling circle model. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **33**: 473-484.
- Giraldo-Suárez, R., Fernández-Tresguerres, M.E., Díaz-Orejas, R., Malki, A. and Kohiyama, M. (1993). The heat-shock DnaK protein is required for plasmid R1 replication and it is dispensable for plasmid ColE1 replication. *Nucl. Acids Res.* **21**: 5495-5499.
- Goze, A. and Ehrlich, S.D. (1980). Replication of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7333-7337.
- Greenbaum, J.H. and Marians, K.J. (1984). The interaction of *Escherichia coli* replication factor Y with complementary strand origins of DNA replication. Contact points revealed by DNase footprinting and protection from methylation. *J. Biol. Chem.* **259**: 2594-2601.
- Greenbaum, J.H. and Marians, K.J. (1985). Mutational analysis of primosome assembly sites. *J. Biol. Chem.* **260**: 12266-12272.
- Grinius, L., Dreguniene, G., Goldberg, E.B., Liao, C-H. and Projan, S.J. (1992). A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Plasmid* **27**: 119-129.
- Gruss, A.D. and Ehrlich, S.D. (1989). The family of highly interrelated single-stranded

deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**: 231-241.

Gruss, A.D., Ross, H.F. and Novick, R.P. (1987). Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2165-2169.

Guzmán, L. and Espinosa, M. (1997). The mobilization protein MobM of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the *oriT*. *J. Mol. Biol.* (en prensa)

Hanahan, D. (1983). Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Haring, V. and Scherzinger, E. (1989). In: Promiscuous plasmid of Gram-negative bacteria. Thomas, C.M. (ed.). Academic Press, London. pp. 95-124.

Helmann, J.D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ - dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucl. Acids Res.* **23**: 2351-2360.

Helmann, J.D. and Chamberlin, M.J. (1988). Structure and function of bacterial  $\sigma$  factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 839-872.

Hiasa, H., Sakai, H., Tanaka, K., Honda, Y., Komano, T. and Godson, N. (1989). Mutational analysis of the primer RNA template region in the replication origin of bacteriophage G4: priming signal recognition by *Escherichia coli* primase. *Gene* **84**: 9-16.

Higashitani, N., Higashitani, A. and Horiuchi, K. (1993). Nucleotide sequence of the primer RNA for DNA replication of filamentous bacteriophages. *J. Virol.* **67**: 2175-2181.

Hirao, I., Ishida, M., Watanabe, K. and Miura, K. (1990). Unique hairpin structures occurring at the replication origin of phage G4 DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1087**: 199-204.

Hinnebusch, J. and Tilly, K. (1993). Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol. Microbiol.* **10**: 917-922.

Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982a). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**: 804-814.

Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982b). Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**: 815-825.

Howard, L. and Gooder, H. (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **117**: 796-804.

Iordanescu, S. (1976a). Temperature-sensitive mutant of a tetracycline resistant staphylococcal plasmid. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* **35**: 257-264.

Iordanescu, S. (1976b). Three distinct plasmids originating in the same *Staphylococcus aureus* strain. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* **35**: 111-118.

- Iordanescu, S. and Basheer, R. (1991). The *Staphylococcus aureus* mutation *pcrA3* leads to the accumulation of pT181 replication initiation complexes. *J. Mol. Biol.* **221**: 1183-1189.
- Ito, J. and Braithwaire, D.K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4045-4057.
- Itoh, T. and Tomizawa, J.I. (1980). Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2450-2454.
- Janni re, L., Gruss, A. and Ehrlich, S.D. (1993). Plasmids. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria; Biochemistry, physiology and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds.) Washington: American Society for Microbiology, pp. 625-644.
- Janzen, T., Kleinschmidt, J., Neve, H. and Geis, A. (1992). Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**: 175-180.
- Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H. and Mahillon, J. (1990). *Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists of two functional cassettes commonly found in other Gram-positive organisms. *J. Bacteriol.* **172**: 3089-3099.
- Khan, S.A. and Novick, R.P. (1982). Structural analysis of plasmid pSN2 in *Staphylococcus aureus*: no involvement in enterotoxin B production. *J. Bacteriol.* **149**: 642-649.
- Kaguni, J.M. and Kornberg, A. (1982). The  $\sigma$  subunit of RNA polymerase holoenzyme confers specificity in priming M13 viral DNA replication. *J. Biol. Chem.* **257**: 5437-5443.
- Kataoka, M., Kiyose, Y.M., Michisuji, Y., Horiguchi, T., Seki, T. and Yoshida, T. (1994). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces nigrifaciens* plasmid pSN22: Genetic organization and correlation with genetic properties. *Plasmid* **32**: 55-69.
- Kelley, W.L., Patel, I. and Bastia, D. (1992). Structural and functional analysis of a replication enhancer: separation of the enhancer activity from original function by mutational dissection of the replication origin  $\gamma$  of plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5078- 5082.
- Kendell, K.J. and Cohen, S.N. (1988). Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. *J. Bacteriol.* **170**: 4643-4651.
- King, K.W. and Dybvig, K. (1992). Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. *Plasmid* **28**: 86-91.
- Kleanthous, H., Clayton, C.L. and Tabaqchali, S. (1991). Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 2377-2389.
- Klein, J., Ulrich, C. and Plapp, R. (1993). Characterization and sequence analysis of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus curvatus* LTH683, and its use for construction of new *Lactobacillus* cloning vectors. *Plasmid* **30**: 14-29.
- Kodaira, K-I., Nakano, K., Okada, S. and Taketo, A. (1992). Nucleotide sequence of the genome of the bacteriophage alpha 3: interrelationship of the genome structure and the gene products with those of the phages, phi 174, G4 and phi K. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 277-288.

- Koehler, T.M. and Thorne, C.B. (1987). *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **169**: 5271-5278.
- Kornberg, A and Baker, T.A. (1992). DNA replication. W.H.Freeman and Co. New York.
- Kramer, M.G., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995). Lagging-strand origins of the promiscuous plasmid pMV158: physical and functional characterization. *Microbiology* **141**: 655-662.
- Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H-J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**: 879-887.
- Krishnan, B.R., Fobert, R., Seitzer, V. and Iyer, V.N. (1990). Mutations within the replicon of the IncN plasmid pCU1 that affects its *Escherichia coli* *polA* independence but not its autonomous replication ability. *Gene* **91**: 1-7.
- Kuempel, P.L., Pelletier, A.J. and Hill, T.M. (1989). Tus and the terminators: the arrest of replication in prokaryotes. *Cell* **59**: 581-583.
- Kumar, C. and Novick, R.P. (1985). Plasmid pT181 replication is regulated by two small countertranscripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 638-642.
- Kushner, S.R. (1978). An improved method for the transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids, 17-23. In H.B. Boyer, S. Nicosia (ed). Genetic Engineering. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Kwak, J. and Weisblum, B. (1994). Regulation of plasmid pE194 replication: control of *cop-repF* operon transcription by Cop and *repF* translation by countertranscript RNA. *J. Bacteriol.* **176**: 5044-5051.
- Lacks, S.A. (1966). Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207-235.
- Lacks, S. (1968). Genetic regulation of maltosaccharide utilization in pneumococcus. *Genetics* **60**: 685-706.
- Lacks, S. and Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.* **114**: 153-168.
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B. and Espinosa, M. (1986). Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **192**: 753-765.
- Langeveld, S.A., van Mansfeld, A.D.M., Baas, P.D., Jansz, H.S., van Arkel, G.A. and Weisbeek, P.J. (1978). Nucleotide sequence of the origin of replication in bacteriophage øX174 RF DNA. *Nature* **271**: 417-420.
- le Gouill, C., Parent, J-L., Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1994). Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.* **219**: 164-170.
- LeBlanc, D.J., Lee, L.N. and Abu-Al-Jaibat, A. (1992). Molecular, genetic, and functional analysis

of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid* **28**: 130-145.

Lee, M.S. and Marians, K.J. (1989). The *Escherichia coli* primosome can translocate actively in either direction along a DNA strand. *J. Biol. Chem.* **264**: 14531-14542.

Leenhouts, K.J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. and Seegers, J.F.M.L. (1991). Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWV01. *Plasmid* **26**: 55-66.

Leer, R.J., van Luijk, N., Posno, M. and Pouwels, P.H. (1992). Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC8014. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 265-274.

Lisser, S. and Margalit, H. (1993). Compilation of *Escherichia coli* mRNA promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* **21**: 1507-1516.

Littlejohn, T.G., DiBernardino, D., Messerotti, L.J., Spiers, S.A. and Skurray, R.A. (1991). Structure and evolution of genes encoding antiseptic and desinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**: 59-66.

López, P., Espinosa, M., Stassi, D.L. and Lacks, S.A. (1982). Facilitation of plasmid transfer in *Streptococcus pneumoniae* by chromosomal homology. *J. Bacteriol.* **150**: 692-701.

López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1984). Physical structure and genetic expression of sulphoniamide resistance plasmid pLS80 and its derivatives in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 402-410.

López, P., Martínez, S., Díaz, A., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1989). Characterization of the *polA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and comparison of the DNA Poll it encodes to homologous enzymes from *Escherichia coli* and phage T7. *J. Biol. Chem.* **264**: 4255-4263.

MacDougall, J., Margarita, D. and Saint-Girons, I. (1992). Homology of a plasmid from the spirochete *Treponema denticola* with the single-stranded DNA plasmids. *J. Bacteriol.* **174**: 2724-2728.

Maciag, I.E., Viret, J. and Alonso, J.C. (1988). Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 232-240.

Madsen, S.M., Andrup, L. and Boe, L. (1993). Fine mapping and DNA sequence of replication functions of *Bacillus thuringiensis* plasmid pTX14-3. *Plasmid* **30**: 119-130.

Manen, D., Goebel, T. and Caro, L. (1990). The *par* region of pSC101 affects plasmid copy number as well as stability. *Mol. Microbiol.* **4**: 1839-1846.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook. (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Majumder, S. and Novick, R.P. (1988). Intermediates in plasmid pT181 DNA replication. *Nucl. Acids Res.* **16**: 2897-2912.

Marians, K.J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 673-719.

- Masai, H., Nomura, N., Kubota, Y. and Arai, K-I. (1990a). Roles of  $\phi$ X174 type primosome- and G4 type primase-dependent primings in initiation of lagging and leading strand synthesis of DNA replication. *J. Biol. Chem.* **265**: 15124-15133.
- Masai, H., Nomura, N. and Arai, K-I. (1990b). The ABC-primosome. *J. Biol. Chem.* **265**: 15134-15144.
- Masai, M. and Arai, K-I. (1989). Leading strand synthesis of R1 plasmid replication *in vitro* is primed by primase alone at a specific site downstream of *oriR* sequence. *J. Biol. Chem.* **264**: 8082-8090.
- McClure, W.R. (1985). Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 171-204.
- McDowell, D.G. and Mann, N.H. (1991). Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. *Plasmid* **25**: 113-120.
- McKenzie, T., Hoshino, T., Tanaka, T. and Sueoka, N. (1986). The nucleotide sequence of pUB110: some salient features in relation to replication and its regulation. *Plasmid* **15**: 93-103.
- McMacken, R., Ueda, K. and Kornberg, A. (1977). Migration of *Escherichia coli* *dnaB* protein on the template DNA strand as a mechanism in initiating DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4190-4194.
- McHenry, C.S. (1988). *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 519-550.
- Meijer, W.J.J., van der Lelie, D., Venema, G. and Bron, S. (1995a). Effects of the generation of single-stranded DNA on the maintenance of plasmid pMV158 and derivatives in different *Bacillus subtilis* strains. *Plasmid* **33**: 79-89.
- Meijer, W.J.J., van der Lelie, D., Venema, G. and Bron, S. (1995b). Effects of the generation of single-stranded DNA on the maintenance of plasmid pMV158 and derivatives in *Lactococcus lactis*. *Plasmid* **33**: 91-99.
- Meijer, W.J.J., Venema, G. and Bron, S. (1995c). Characterization of single strand origins of cryptic rolling-circle plasmids from *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **23**: 612-619.
- Meijer, W.J.J., Venema, G. and Bron, S. (1996). Alternative, RecA-mediated pathway for the initiation of lagging strand synthesis of the broad-host-range rolling-circle plasmid pMV158 in *Bacillus subtilis*. (enviado a publicar).
- Mencía, M. (1996). Mecanismo de activación del promotor tardío A3 por la proteína P4 del bacteriófago  $\phi$ 29 de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Mencía, M., Monsalve, M., Rojo, F. and Salas, M. (1996). Transcription activation by phage  $\phi$ 29 protein P4 is mediated by interaction with the  $\alpha$  subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6616-6620.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J.A., Bernad, A. and Salas, M. (1992). Initiation of  $\phi$ 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9579-9583.

- Meyer, T.F. and Geider, K. (1979). Bacteriophage fd gene II-protein. II. Specific cleavage and relaxation of supercoiled RF from filamentous phages. *J. Biol. Chem.* **254**: 12642-12646.
- Michel, B. and Ehrlich, S.D. (1986). Illegitimate recombination at the replication origin of the plasmid pC194. *EMBO J.* **5**: 3691-3696.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor.
- Miller, C.A., Tucker, W.T., Meacock, P.A., Gustafsson, P. and Cohen, S.N. (1983). Nucleotide sequence of the partition locus of *Escherichia coli* plasmid pSC101. *Gene* **24**: 309-315.
- Monod, M., Denoya, C. and Dubnau, D. (1986). Sequence and properties of pIM13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **167**: 138-147.
- Moreno, F., Camacho, A., Viñuela, E. and Salas, M. (1974). Suppressor-sensitive mutants and genetics map of *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\phi$ 29. *Virology* **62**: 1-16.
- Moscoso, M., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995a). Specific nicking-closing activity of the initiator of replication protein RepB of plasmid pMV158 on supercoiled or single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **270**: 3772-3779.
- Moscoso, M., del Solar, G. and Espinosa, M. (1995b). *In vitro* recognition of the replication origin of pLS1 and of plasmids of the pLS1 family by the RepB initiator protein. *J. Bacteriol.* **177**: 7041-7049.
- Mosser, J.L. and Tomasz, A. (1979). Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**: 287-298.
- Müller, A.K., Rojo, F. and Alonso, J.C. (1995). The level of the pUB110 replication initiator protein is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number. *Nucl. Acids Res.* **23**: 1894-1900.
- Murai, M., Miyashita, H., Araki, H., Seki, T. and Oshima, Y. (1987). Molecular structure of the replication origin of a *Bacillus amyloliquefaciens* plasmid pFTB14. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 92-100.
- Noirot, P., Bargonetti, J. and Novick, R.P. (1990). Initiation of rolling circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8560-8564.
- Noirot-Gros, M.F., Bidnenko, V. and Ehrlich, S.D. (1994). Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194. *EMBO J.* **13**: 4412-4420.
- Nomura, N., Low, R. and Ray, D.S. (1982). Identification of ColE1 sequences that direct single-strand to double strand conversion by a  $\phi$ X type mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3153-3157.
- Nordström, K., Molin, S. and Light, J. (1984). Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* **12**: 71-90.

- Novick, R.P. (1976). Plasmid-protein relaxation complexes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **127**: 1177-1187.
- Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**: 294-300.
- Novick, R.P., Projan, S., Rosenblum, W. and Edelman, I. (1984a). Staphylococcal plasmid cointegrates are formed by host-and phage-mediated general *rec* systems that act on short regions of homology. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 374-377.
- Novick, R.P., Adler, G.K., Projan, S.J., Carleton, S., Highlander, S.K., Gruss, A., Khan, S.A. and Iordanescu, S. (1984b). Control of pT181 replication I. The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. *EMBO J.* **3**: 2399-2405.
- Novick, R.P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 537-565.
- Ogawa, T., Arai, K. and Okazaki, T. (1983). Site selection and structure of DNA-linked RNA primers synthesized by the primosome in phage  $\phi$ X174 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **258**: 13353-13358.
- Oskam, L., Venema, G. and Bron, S. (1992). Plasmid pTB913 derivatives are segregationally stable in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. *Plasmid* **28**: 70-79.
- Pérez-Martín, J., del Solar, G., Lurz, R., de la Campa, A.G., Dobrinski, B. and Espinosa, M. (1990). Induced bending of plasmid pLS1 DNA by the plasmid-encoded protein RepA. *J. Biol. Chem.* **264**: 21334-21339.
- Perkins, D.R. and Barnum, S.R. (1992). DNA sequence and analysis of a cryptic 4.2 kb plasmid from the filamentous cyanobacterium, *Plectonema* sp. strain pCC6402. *Plasmid* **28**: 170-176.
- Pons, M.E., Díaz, A., Lacks, S.A. and López, P. (1991). The polymerase domain of *Streptococcus pneumoniae* DNA polymerase I. High expression, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **201**: 147-155.
- Priebe, S.D. and Lacks, S.A. (1989). Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* **171**: 4778-4784.
- Projan, S.J., Kornblum, J., Moghazeh, S.L., Edelman, I., Gennaro, M.L. and Novick, R.P. (1985). Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, cognate plasmid replicons from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 452-464.
- Projan, S.J., Carleton, S. and Novick, R.P. (1983). Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**: 182-190.
- Projan, S.J., Monod, M., Narayanan, C. and Dubnau, D. (1987). Replication properties of pIM13, a naturally occurring plasmid found in *Bacillus subtilis* and of its close relative pE5, a plasmid native to *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**: 5131-5135.
- Projan, S.J. and Novick, R.P. (1988). Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* **19**: 203-221.

- Puyet, A., del Solar, G. and Espinosa, M. (1988). Identification of the origin and direction of replication of the broad-host-range plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **16**: 115-133.
- Rasooly, A. and Novick, R.P. (1993). Replication-specific inactivation of the pT181 plasmid initiator protein. *Science* **262**: 1048-1050.
- Rhee, D.J. and Morrison, D.A. (1988). Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular cloning and characterization of *recP*, a gene required for genetic recombination. *J. Bacteriol.* **170**: 630-637.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 39-71.
- Sakai, H. and Godson, N. (1985). Isolation and construction of mutants of the G4 minus strand origin: analysis of their in vivo activity. *Biochim. Biophys. Acta* **826**: 230-37.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Saunders, C.W. and Guild, W.R. (1980). Properties and transforming activities of two plasmids in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **180**: 573-578.
- Saunders, C.W. and Guild, W.R. (1981). Pathway of plasmid transformation in pneumococcus: open circular and linear molecules are active. *J. Bacteriol.* **146**: 517-526.
- Saunders, K., Lucy, A. and Stanley, J. (1991). DNA forms of the geminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2325-2330.
- Schaller, H., Uhlmann, A. and Geider, K. (1976). A DNA fragment from the origin of single-strand to double-strand DNA replication of bacteriophage fd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 49-53.
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. and Otto, S. (1991). Plasmid RSF1010 DNA replication *in vitro* promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1203-1211.
- Seegers, J.F.M.L., Zhao, A.C., Meijer, W.J.J., Khan, S., Venema, G. and Bron, S. (1995). Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWV01. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 43-50.
- Seery, L.T., Nolan, N.C., Sharp, P.M. and Devine, K.M. (1993). Comparative analysis of the pC194 group of rolling circle plasmids. *Plasmid* **30**: 185-196.
- Selick, H.E., Barry, J., Cha, T-A., Munn, M., Nakanishi, M., Wong, M.L. and Alberts, B.M. (1987). In: DNA replication and recombination. McMacken, R. and Kelly, T.J. (eds). UCLA, Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 183-214.
- Seery, L. and Devine, K.M. (1993). Analysis of features contributing to activity of the single-stranded origin of *Bacillus* plasmid pBAA1. *J. Bacteriol.* **175**: 1988-1994.

- Sims, J. and Benz, E.W. Initiation of DNA replication by the *Escherichia coli* *dnaG* protein: evidence that tertiary structure is involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 900-904.
- Sims, J., Capon, D. and Dressler, D. (1979). *dnaG* (primase)-dependent origins of DNA replication: nucleotide sequences of the negative strand initiation sites of bacteriophages St-1, øK and ø3. *J. Biol. Chem.* **254**: 12615-12628.
- Skaugen, M. (1989). The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Plasmid* **22**: 175-179.
- Smith, M.D., Shoemaker, N.B., Burdett, V. and Guild, W.R. (1980). Transfer of plasmids by conjugation in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **3**: 70-79.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A. (1981). Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7028-7032.
- Staudenbauer, W.L. (1978). Structure and replication of the colicin E1 plasmid. *Currents Topics Microbiol. Immunol.* **83**: 93-156. Springer-Verlag, Berlin.
- Stayton, M.M. and Kornberg, A. (1983). Complexes of *Escherichia coli* primase with the replication origin of G4 phage DNA. *J. Biol. Chem.* **258**: 13205-13212.
- Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C. and Bisaro, D.M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8029-8033.
- Stenzel, T.T., MacAllister, T. and Bastia, D. (1991). Cooperativity at a distance promoted by the combined action of two replication initiator proteins and a DNA bending protein at the replication origin of pSC101. *Genes & Development* **5**: 1453-1463.
- Summers, D.K. (1991). The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol.* **9**: 273-278.
- Sun, W. and Godson, N.G. (1993). Binding and phasing of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein by the secondary structure of phage G4 origin of complementary DNA strand synthesis (G4ori). *J. Biol. Chem.* **268**: 8026-8039.
- Swart, J.R. and Griep, M.A. (1993). Primase from *Escherichia coli* primes single-stranded templates in the absence of single-stranded DNA-binding protein or other auxiliary proteins. *J. Biol. Chem.* **268**: 12970-12976.
- Takechi, S., Matsui, H. and Itoh, T. (1995). Primer RNA synthesis by plasmid-specified Rep protein. (no publicado).
- Tanaka, T. and Sueoka, N. (1983). Site specific *in vitro* binding of plasmid pUB110 to *Bacillus subtilis* membrane fraction. *J. Bacteriol.* **154**: 1184-1194.
- te Riele, H., Michel, B. and Ehrlich, S.D. (1986). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2541-2545.

Tabak, H.F., Griffith, J., Geider, K., Schaller, H. and Kornberg, A. (1974). Initiation of deoxyribonucleic acid synthesis: A unique location of the gap in the M13 replicative duplex synthesized *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **249**: 3049-3054.

Thomas, C.D., Balson, D.F. and Shaw, W. (1988). Identification of the tyrosine residue involved in bond formation between replication origin and initiator protein of plasmid pC221. *Biochemical Society Transactions*. **16**: 758-759. 626th Meeting, Sheffield.

Tomizawa, J., Sakakibara, Y. and Kakefuda, T. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 2260-2264.

Ueda, K., Hiasa, H., Takebe, S., Sakai, H. and Komano, T. (1992). Alternative secondary structures in the phage G4 origin of the complementary DNA strand synthesis: effects of NaCl concentration on the bleomycin-DNA interaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 394-398.

Ueda, K., Kobayashi, S., Sakai, H. and Komano, T. (1985). Cleavage of stem loop structure DNA by bleomycin: Reaction on the bacteriophage G4 origin on complementary strand synthesis. *J. Biol. Chem.* **260**: 5804-5807.

Uozuomi, T., Ozaki, A., Beppu, T. and Arima, K. (1980). New cryptic plasmid of *Bacillus subtilis* and restriction analysis of other plasmids found by general screening. *J. Bacteriol.* **142**: 315-318.

van Mansfeld, A.D., van Teeffelen, H.A., Fluit, A.C., Baas, P.D. and Janz, H.S. (1986). Two juxtaposed tyrosyl-OH groups participate in  $\phi$ X174 gene A protein catalyzed cleavage and ligation of DNA. *Nucl. Acids Res.* **14**: 4229-4238.

van der Ende, A., Teertstra, R., van der Avoort, H.G.A.M. and Weisbeek, J. (1983). Initiation signals for complementary strand DNA synthesis on single-stranded plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **11**: 4957-4975.

van der Lelie, D., Bron, S., Venema, G. and Oskam, L. (1989). Similarity of minus origins of replication and flanking open reading frames of plasmids pUB110, pTB913 and pMV158. *Nucl. Acids Res.* **17**: 7283-7294.

Vujcic, M. and Topisirovic, L. (1993). Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of *Lactobacillus plantarum* A112. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 274-280.

Viret, J.F. and Alonso, J.C. (1987). Generation of linear multigenome-length plasmid molecules in *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **15**: 6349-6367.

Viret, J.F. and Alonso, J.C. (1988). A DNA sequence outside the pUB110 minimal replicon is required for normal replication in *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **16**: 4389-4406.

Wahle, E. and Kornberg, A. (1988). The partitioning locus of plasmid pSC101 is a specific binding site for DNA gyrase. *EMBO J.* **7**: 1889-1895.

Wickner, S., Hoskins, J. and McKenney, K. (1991). Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature* **350**: 165-167.

Wickner, S. and Hurwitz, J. (1975). Association of  $\phi$ X174 DNA-dependent ATPase activity with

- an *Escherichia coli* protein, replication factor Y, required for *in vitro* synthesis of  $\phi$ X174 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3342-3346.
- Wickner, W. and Kornberg, A. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3679-3683.
- Wilson, K.S. and von Hippel, P.H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8793-8797.
- Xu, F., Pearse, L.E. and Yu, P.-K. (1991). Genetic analysis of a lactococcal plasmid replicon. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 33-39.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messig, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yasueda, H., Horii, T. and Itoh, T. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **215**: 209-216.
- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A. and Masamune, Y. (1991). Rolling-circle replication of the plasmid pKYM isolated from a Gram-negative bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10282-10286.
- Young, F.E. and Wilson, G.A. (1972). Genetics of *Bacillus subtilis* and others gram-positive sporulating bacilli. En: Spores V, pp. 77-106 (Eds. Halvorson, H.O., Hanson, R. and Campbell, L.L.). Amer. Soc. Microbiol. Washington.
- Zaman, S., Radnedge, L., Richards, H. and Ward, J.M. (1993). Analysis of the site for second-strand initiation during replication of the *Streptomyces* plasmid pIJ101. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 669-676.
- Zechel, K., Bouché, J.P. and Kornberg, A. (1975). Replication of phage G4. A novel and simple system for the initiation of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Biochem.* **250**: 4684-4689.
- Zhang, Y., Praszkie, J., Hodgson, A. and Pittard, A. (1994). Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. *J. Bacteriol.* **176**: 5718-5728.
- Ziegelin, G., Scherzinger, E., Lurz, R. and Lanka, E. (1993). Phage P4  $\alpha$ -protein is multifunctional with origin recognition, helicase and primase activities. *EMBO J.* **12**: 3703-3708.
- Zipursky, S.L. and Marians, J.K. (1980). Identification of two *Escherichia coli* factor Y effector sites near the origins of replication of the plasmids Cole1 and pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 6521-6525.
- Zipursky, S.L. and Marians, K.J. (1981). *Escherichia coli* Y sites of plasmid pBR322 can function as origins of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 6521-6524.