

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Relaxasas conjugativas de la familia MOBv

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Fernández López

Directores

Luis Fabián Lorenzo Díaz

Manuel Espinosa Padrón

Madrid, 2016



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Tesis Doctoral

RELAXASAS CONJUGATIVAS DE LA FAMILIA MOB_v

Memoria para optar al grado de Doctora con Mención Europea

presentada por

CRISTINA FERNÁNDEZ LÓPEZ

Bajo la dirección de

Dr. Luis Fabián Lorenzo Díaz

Prof. Manuel Espinosa Padrón



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Madrid, Diciembre 2015

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Cristina Fernández López bajo la dirección del Dr. Fabián Lorenzo Díaz y del Prof. Manuel Espinosa Padrón, en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con financiaciones concedidas por la Unión Europea (EU-CP223111, CAREPNEUMO) y por los Ministerios de Ciencia e Innovación (MICINN) y de Economía y Competitividad (MINECO) con un proyecto Consolider (CSD2008-00013, INTERMODS). Las asistencias a las reuniones de la Red Española de Elementos Extracromosómicos fueron financiadas por los proyectos BFU2008-00179-E/BMC (REDEEX-1) y BFU2011-14145-E (REDEEX-2) del MICINN y MINECO, respectivamente. La estancia en el laboratorio del Dr. Philippe Glaser en el Instituto Pasteur (París) se realizó con financiación concedida por la European Molecular Biology Organization (EMBO) a través de una beca de estancias breves (ASTF 242-2014).

Opta al grado de Doctor

VºBº Directores de Tesis

Cristina Fernández López

Luis Fabián Lorenzo Díaz

Manuel Espinosa Padrón

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	13
1. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL	15
2. CONJUGACIÓN BACTERIANA	16
3. ELEMENTOS CONJUGATIVOS	17
3.1. Elementos extracromosómicos	18
3.2. Elementos intracromosómicos	19
4. BASES MOLECULARES DE LA CONJUGACIÓN	20
4.1. Orígenes de transferencia y relaxasas	22
5. ELEMENTOS CONJUGATIVOS EN <i>S. agalactiae</i>	26
5.1. Elementos extracromosómicos: el plásmido pMV158	26
5.1.1. El módulo LIC	27
5.1.2. El módulo MOB	29
5.2. Elementos intracromosómicos	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
MATERIALES	43
1. ESTIRPES BACTERIANAS Y MANIPULACIÓN	43
2. MEDIOS DE CULTIVO Y SELECCIÓN	44
3. ÁCIDOS NUCLEICOS	45
3.1. Plásmidos	45
3.2. Oligonucleótidos	47
4. TAMPONES	50
5. ENZIMAS, PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS	52
6. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	54
MÉTODOS	56
1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS	56
2. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	56
2.1. Preparación de células competentes	56
2.2. Transformación	57
2.2.1. Transformación por electroporación	57
2.2.2. Transformación genética natural	58

3. PREPARACIONES DE DNA	58
3.1. Extractos crudos celulares	58
3.2. Extracción de DNA genómico	58
3.3. Extracción de DNA plasmídico	59
3.4. Obtención de fragmenos de DNA de doble cadena	59
3.4.1. Digestión con enzimas de restricción	59
3.4.2. Amplificación en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	59
3.5. Ligación de DNA	60
3.6. Construcción de plásmidos recombinantes	60
3.6.1. Vectores de expresión de la proteína MobM y sus variantes	60
3.6.2. Vector de expresión de la proteína MobSag	61
3.6.3. Plásmidos derivados de pMV158	61
3.6.3.1. pMVS y pMVSag	61
3.6.3.2. pMVT y pMVT- <i>Pfcsk</i>	62
3.6.4. Fusiones transcripcionales de <i>lacZ</i> con el promotor <i>PctII</i>	63
4. ANÁLISIS DE DNA	64
4.1. Cuantificación	64
4.2. Electroforesis	64
4.2.1. Geles de agarosa	64
4.2.2. Geles de poliacrilamida (PAA)	65
4.2.2.1. Geles PAA nativos (EMSA)	65
4.2.2.2. Geles PAA desnaturalizantes	65
4.3. Marcaje radiactivo de DNA	65
4.3.1. Marcaje en el extremo 5'	65
4.3.2. Marcaje interno	66
4.4. Secuenciación de DNA	66
4.4.1. Secuenciación manual	66
4.4.2. Secuenciación automática	67
4.4.3. Secuenciación masiva	67
5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	68
5.1. Extracción de RNA total	68
5.2. Retrotranscripción por extensión de cebador (o <i>primer extension</i>)	68
6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	69
6.1. Purificación de MobM, MobMN199, MobMN243 y MobSag	69
6.2. Purificación de His-MobMN199 y mutantes	70
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	71
7.1. Cuantificación proteica	71
7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAA)	71
7.3. Secuenciación del extremo amino-terminal (NH ₂)	71
7.4. Análisis de masas moleculares por espectrometría de masas	72
7.5. Ultracentrifugación Analítica	72
7.5.1. Velocidad de sedimentación	72
7.5.2. Equilibrio de sedimentación	73
7.6. Cromatografía de filtración en gel	73

7.7. Análisis de estructura secundaria de proteínas	74
7.7.1. Predicción de estructura secundaria de proteínas	74
7.7.2. Análisis por Dicroísmo Circular (CD)	74
7.7.3. Análisis de estabilidad térmica	75
7.8. Inmunodetección de proteínas	75
7.8.1. Anticuerpos policlonales frente a MobM (anti-MobM)	75
7.8.2. Ensayo de electrotransferencia proteica (<i>Western blot</i>)	76
8. INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA	77
8.1. Visualización de complejos nucleoproteicos pMV158-MobM por microscopía electrónica	77
8.2. Análisis de la actividad de corte de MobM y MobSag	77
8.2.1. DNA superenrollado	77
8.2.2. DNA monocatenario	78
8.3. Precipitación de complejos covalentes DNA-MobM	78
8.4. Ensayos de competición mediante movilidad diferencial en geles nativos (EMSA)	79
8.5. <i>Footprinting</i> con DNasa I sobre DNA superenrollado	79
8.6. Técnicas de cristalización	80
9. ANÁLISIS DE MOVILIZACIÓN PLASMÍDICA	81
10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICAS	82
11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	82
RESULTADOS	85
CAPÍTULO 1: Familia de plásmidos MOB_v	87
1.1. LOS PLÁSMIDOS DE LA FAMILIA MOB _{v1}	89
1.2. MÓDULO DE TRANSFERENCIA DE LOS PLÁSMIDOS MOB _{v1}	91
1.2.1. Los orígenes de transferencia MOB _{v1}	91
1.2.2. Las relaxasas MOB _{v1}	92
CAPÍTULO 2: Caracterización del dominio relaxasa de MobM	95
2.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MobMN243	97
2.2. ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE MobMN243	99
2.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RELAXASA DE MobMN243	101
2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS ESTABLES DNA-MobMN243	103
2.5. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE MobMN243	104
2.6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL CENTRO ACTIVO DE MobM	106
2.6.1. Mecanismo de reacción de MobM	107
2.6.2. Mutantes del centro activo de MobM	109
CAPÍTULO 3: Interacción de MobM con el módulo de replicación y control de pMV158	113
3.1. MAPEO DE LAS INTERACCIONES GLOBALES ENTRE MobM Y EL PLÁSMIDO pMV158	115

3.2. INTERACCIÓN <i>IN VITRO</i> ENTRE MobM Y EL PROMOTOR DEL RNAII	117
3.2.1. Unión de MobM al promotor <i>PctII</i> sobre DNA monocatenario	118
3.2.2. Unión de MobM al promotor <i>PctII</i> sobre DNA superenrollado	119
3.3. EFECTO <i>IN VIVO</i> DE LA INTERACCIÓN ENTRE MobM Y EL PROMOTOR <i>PctII</i>	121
3.3.1. Regulación transcripcional del promotor <i>PctII</i> por MobM	121
3.3.2. Control de la expresión del RNAII por MobM en <i>S. pneumoniae</i>	122
3.3.3. Niveles intracelulares de mRNAs codificados por pMV158 en respuesta a inducción de MobM	124
3.3.4. Número de copias plasmídicas en respuesta a síntesis de MobM	125
CAPÍTULO 4: Un nuevo elemento movilizable en <i>S. agalactiae</i>	127
4.1. ELEMENTO MOVILIZABLE E INTEGRATIVO <i>rpsI</i> (IME <i>rpsI</i>)	129
4.1.1. Escisión y circularización del IME <i>rpsI</i>	131
4.1.2. Transferencia por movilización de IME <i>rpsI</i>	132
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MobSag DEL IME <i>rpsI</i>	134
4.2.1. Purificación de la proteína MobSag	136
4.2.2. Análisis de la estructura secundaria de MobSag	137
4.2.3. Análisis de la actividad relaxasa de MobSag	140
4.2.4. Determinación del sitio de corte en <i>ori</i> _{IME<i>rpsI</i>}	142
DISCUSIÓN	145
Promiscuidad de los plásmidos de la familia MOB _{V1}	147
Replicación y conjugación de plásmidos MOB _{V1} bajo una perspectiva evolutiva	148
El dominio relaxasa de MobM	150
Nuevo mecanismo catalítico en las relaxasas MOB _V	152
Coordinación entre los módulos de replicación y conjugación en plásmidos movilizables RCR	154
MobSag es una nueva relaxasa de la familia MOB _V	157
Distribución y diversidad del IME <i>rpsI</i> en <i>S. agalactiae</i>	158
CONCLUSIONES	163
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXO	189
PUBLICACIONES	199

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. ICEs e IMEs integrados en el cromosoma de <i>S. agalactiae</i>	35
Tabla 2. Estirpes bacterianas usadas en este trabajo	43
Tabla 3. Medios de cultivo y selección usados en este trabajo	44
Tabla 4. Plásmidos usados en este trabajo	45
Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este trabajo	47
Tabla 6. Tampones usados en este trabajo	50
Tabla 7. Programas informáticos usados en este trabajo	54
Tabla 8. Plásmidos MOB _{V1} representativos agrupados por grupo filogenético de la relaxasa	93
Tabla 9. Estructuras resueltas de MobMN199 con distintos sustratos de DNA	107
Tabla 10. Transferencia conjugativa de los plásmidos pMVS, pMVSag y pMV158	134
Tabla 11. Contenido en estructura secundaria de MobSag	138
Tabla 12. Propiedades de MobM y sus derivados truncados	151
Tabla 13. Distribución del IME <i>ErpsI</i> en los complejos clonales de GBS	159
Tabla A1. Plásmidos de la familia MOB _{V1}	191

FIGURAS

Figura 1. Transferencia genética horizontal entre bacterias	15
Figura 2. Esquema de los principales procesos y componentes implicados en la conjugación	17
Figura 3. Esquema general de la transferencia por conjugación de elementos conjugativos extracromosómicos (plásmido; A) o intracromosómicos (ICE; B)	19
Figura 4. Mecanismo molecular de la conjugación bacteriana	21
Figura 5. Estructuras del dominio relaxasa de las proteínas TrwC y NES con sus respectivos DNAs sustrato	23
Figura 6. Mecanismo catalítico de TrwC _{R388} en el inicio de la transferencia	24
Figura 7. Familias de relaxasas	25
Figura 8. Mapa genético y funcional del plásmido pMV158	27
Figura 9. Módulo LIC y circuito de control del número de copias de pMV158	29
Figura 10. Posibles estructuras secundarias que se pueden formar en la cadena transferente del <i>oriT</i> de pMV158	30

Figura 11. La proteína MobM y su dominio relaxasa	32
Figura 12. Comparación entre las estructuras de TrwCN293 y MobMN199 indicando la posición de los extremos 3' de los respectivos DNAs empleados en la obtención de los co-cristales	33
Figura 13. Mapa cromosómico indicando la posición de ICEs e IMEs en ocho estirpes de <i>S. agalactiae</i>	34
Figura 14. Estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pMVT y pMVT- <i>Pfcsk</i>	63
Figura 15. Distribución de los plásmidos MOB _{V1} de acuerdo a su tamaño	90
Figura 16. Orígenes de transferencia representativos de los plásmidos de la familia MOB _{V1}	92
Figura 17. Filogenia de las proteínas homólogas a MobM _{pMV158}	94
Figura 18. Sobreproducción y purificación de la proteína MobMN243	98
Figura 19. Esquema de las proteínas MobM, MobMN199 y MobMN243 (A) y perfiles de elución en cromatografía en filtración en gel (B)	99
Figura 20. Estudio del estado de oligomerización de MobMN243 mediante ultracentrifugación analítica	100
Figura 21. Secuencia de DNA del <i>oriT</i> _{pMV158} y oligonucleótidos usados para la caracterización de MobMN243	101
Figura 22. Actividad de corte de MobMN199 y MobMN243	102
Figura 23. Aislamiento de complejos estables DNA-MobMN243 tras el corte del oligonucleótido IR1-12pA	104
Figura 24. Estabilidad dependiente de ligando de MobMN243 analizada mediante electroforesis SDS-PAGE	105
Figura 25. Estabilidad de MobMN243 analizada mediante espectrometría de masas (ESI-MS) antes y después de su incubación con ligando	106
Figura 26. Oligonucleótidos usados para la co-cristalización con MobMN199 (A) y estructura tridimensional de MobMN199 unida a NicO-SPO (B)	108
Figura 27. Secuencia cronológica propuesta de la reacción de corte de MobM con las estructuras cristalográficas del centro activo (a-e) y esquema del centro activo basado en las imágenes (f)	109
Figura 28. Actividad de corte (A) y formación de aductos covalentes (B) de mutantes del centro activo de His-MobMN199 sobre pMV158	111
Figura 29. Distribución de los sitios de unión de MobM sobre el plásmido pMV158 obtenidos mediante microscopía electrónica	116
Figura 30. Identificación <i>in silico</i> del sitio II de interacción entre MobM y el DNA del plásmido pMV158	117

Figura 31. Ensayo de competición por la unión de MobMN199 entre los oligonucleótidos IR3 y <i>PctII</i> o IR1+8	118
Figura 32. <i>Footprinting</i> con DNasa I de MobM unida al promotor del RNAlI (<i>PctII</i>) sobre DNA superenrollado de pAS	120
Figura 33. Análisis del efecto de MobM sobre la regulación transcripcional del promotor <i>PctII</i>	122
Figura 34. Mapa genético de parte del plásmido pMV158 y sus derivados pMVT y pMVT- <i>PfcsK</i>	123
Figura 35. <i>Western blot</i> mostrando la expresión de <i>mobM</i> inducida por fucosa	124
Figura 36. Análisis por <i>primer extension</i> sobre RNA total aislado de células de <i>S. pneumoniae</i> 708 que contenían el plásmido pMVT- <i>PfcsK</i>	125
Figura 37. Efecto de la inducción por fucosa de MobM en el número de copias plasmídicas	126
Figura 38. Organización genética del IMErpsI (9,153 pb) ubicado en el cromosoma de <i>S. agalactiae</i> HRC	131
Figura 39. Identificación de formas extracromosómicas del IMErpsI en diferentes estirpes de <i>S. agalactiae</i>	132
Figura 40. Mapa genético del plásmido pMV158 y sus derivados pMVS y pMVSag	133
Figura 41. Dominios conservados de la proteína MobSag	135
Figura 42. Cromatografía de filtración en gel de MobM y MobSag	137
Figura 43. Análisis de la estructura secundaria de MobSag	139
Figura 44. Análisis de la estabilidad térmica de MobSag	139
Figura 45. Origen de transferencia del IMErpsI (<i>oriT_{IMErpsI}</i>)	140
Figura 46. Caracterización de la actividad de corte de la proteína MobSag	142
Figura 47. Cromatogramas de la secuencia de DNA del origen de transferencia de pMVSag (<i>oriT_{IMErpsI}</i>) en muestras incubadas sin (A) y con (B) MobSag	143
Figura 48. Filogenia de las proteínas Rep (RCR) y Mob (MOB _{V1}) de plásmidos representativos	149
Figura 49. Superposición del centro activo de MobM (Nic0-SPO) con el de otras relaxasas	154
Figura 50. Integración de los circuitos de regulación del módulo de movilización y replicación-control del plásmido pMV158	155
Figura 51. Filogenia del <i>core</i> del genoma y distribución del IMErpsI en los distintos complejos clonales de GBS	160

Abreviaturas

A	Absorbancia
Ap	Ampicilina
<i>att</i>	Sitio de recombinación específica
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementario o copia
Ci	Curios
CIME	Elemento cis-movilizable e integrativo
Cm	Cloramfenicol
C-terminal	Carboxi-terminal
Cy5	Indocarbocianina-5
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
DMS	Dimetil sulfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOC	Deoxicolato
DR	Repetición directa
dsDNA	DNA de doble cadena
<i>dso</i>	Origen de replicación de cadena doble
Em	Eritromicina
EMSA	Ensayos de movilidad diferencial en geles nativos
Fus	Ácido fusídico
G+	Gram-positiva
G-	Gram-negativa
HGT	Transferencia genética horizontal
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICE	Elemento conjugativo e integrativo
IME	Elemento movilizable e integrativo
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IR	Repetición invertida
kb	Kilobase, kilopares de bases

Km	Kanamicina
kDa	Kilodalton
MLS	Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del tipo B
MS	Espectrometría de masas
m/z	Masa/carga
Neo	Neomicina
Nov	Novobiocina
N-terminal	Amino-terminal
<i>oriT</i>	Origen de transferencia
PAA	Poliacrilamida
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PEI	Poli-etilenimina
pb	Pares de bases
RCR	Replicación por Círculo Rodante
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
scDNA	DNA de cadena doble superenrollado
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
ssDNA	DNA de cadena sencilla
<i>sso</i>	Origen de replicación de cadena retrasada
ssDNA	DNA de cadena sencilla
T4CP	Proteína acopladora del sistema de secreción de tipo IV
T4SS	Sistema de secreción de tipo IV
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-diamina
UA	Ultracentrifugación analítica

RESUMEN

RELAXASAS CONJUGATIVAS DE LA FAMILIA MOB_V

INTRODUCCIÓN

La conjugación es uno de los principales mecanismos de transferencia genética horizontal entre bacterias. Este proceso consiste en el intercambio de material genético entre dos células a través de contacto físico, y por tanto, afecta a la dinámica y adaptación de los genomas a diversos nichos (Gogarten & Townsend, 2005).

La transferencia conjugativa está mediada por tres módulos: el relaxosoma (MOB), formado por el origen de transferencia (*oriT*) y un conjunto de proteínas que procesan el DNA; la proteína acopladora (T4CP) y el sistema de secreción de tipo IV (T4SS). De acuerdo con la composición de estos módulos, los elementos conjugativos pueden ser **autotransferibles** o **movilizables**. En general, éstos últimos sólo codifican el relaxosoma y únicamente se transfieren cuando co-residen en la misma célula con algún elemento autotransferible que aporte la T4CP y el T4SS (Smillie et al, 2010). Si atendemos a su ubicación en el genoma, los elementos conjugativos pueden ser **extracromosómicos** (plásmidos), con capacidad para replicar autónomamente; o **intracromosómicos** (ICEs; *Integrative and Conjugative Elements*), integrados en el cromosoma pero con capacidad para escindir. Cuando éstos últimos son movilizables se denominan IMEs (*Integrative and Mobilizable Elements*). Revisado en (Bellanger et al, 2014).

Atendiendo al relaxosoma, los elementos clave para la movilización conjugativa del DNA son la secuencia *oriT* y la proteína relaxasa. Los **oriTs** son secuencias de DNA que contienen componentes implicados en la interacción DNA-proteína (repeticiones invertidas y/o directas) y el sitio de corte para la relaxasa. Las **relaxasas** son proteínas con actividad endonucleasa/topoisomerasa que reconocen la secuencia del *oriT*, sobre el que realizan un corte específico para iniciar la conjugación (célula donadora), o una transferencia de cadenas para el cierre en la terminación (célula receptora). En las relaxasas descritas hasta ahora, ambos procesos se realizan a través de transesterificaciones catalizadas por residuos de tirosina y mediante un mecanismo que comparte similitudes con la replicación por círculo rodante (RCR). En general, su dominio de interacción con el DNA (dominio relaxasa) se localiza en la región N-terminal, mientras que la región C-terminal puede contener dominios con actividad helicasa, primasa o de interacción proteína-proteína. Revisado en (Chandler

et al, 2013). Las secuencias de las relaxasas han permitido realizar una clasificación de elementos conjugativos (familias MOB) que aporta una visión global sobre la diseminación de estos elementos mediante conjugación (Garcillán-Barcia et al, 2009). Este trabajo se ha centrado en la caracterización de dos elementos movilizables que codifican relaxasas MOB_{V1}: pMV158 e IME*rpsI*.

OBJETIVOS

1. Actualizar los plásmidos de la familia MOB_{V1}, centrándose en sus módulos de transferencia.
2. Analizar a nivel funcional y estructural el dominio relaxasa de MobM del plásmido pMV158.
3. Estudiar las interacciones globales entre MobM y DNA del plásmido pMV158.
4. Caracterizar una nueva relaxasa de la familia MOB_{V1} y el elemento integrado que la contiene.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. PLÁSMIDOS DE LA FAMILIA MOB_{V1}

La búsqueda bioinformática de plásmidos de la familia MOB_{V1} (usando su relaxasa prototipo, MobM_{pMV158}) identificó 97 relaxasas codificadas en 93 plásmidos. Todos estos plásmidos son movilizables y aislados de bacterias G+, principalmente del *phylum* Firmicutes. Aproximadamente la mitad (45%) contienen genes involucrados en resistencia a antibióticos u otros marcadores y un 80% presentan proteínas de replicación RC. En cuanto a sus módulos de transferencia, las repeticiones invertidas y sitios de corte de los *oriTs* se encuentran muy conservadas, mientras que las relaxasas presentan una baja similitud, limitada básicamente a los tres motivos característicos de la familia MOB_{V1}.

2. EL DOMINIO RELAXASA DE MobM

La purificación y caracterización de una versión truncada N-terminal de MobM que contiene su dominio relaxasa, mostró que el dominio de unión y corte sobre el DNA se localiza en los primeros 200 residuos, mientras que la región central (200-243)

es importante para el posicionamiento del DNA en el centro activo. El dominio de oligomerización se encuentra en la región C-terminal (243-494). Las estructuras cristalinas de MobM con su DNA sustrato y los ensayos funcionales con mutantes, desvelaron que el residuo catalítico de MobM es una histidina (H22). Esta es la primera vez que se describe una relaxasa que utiliza un residuo distinto al de tirosina para realizar el ataque nucleofílico sobre el DNA.

3. INTERACCIÓN DE MobM CON EL MÓDULO DE REPLICACIÓN Y CONTROL DE pMV158

Mediante microscopía electrónica se descubrió que MobM reconoce una región de pMV158 localizada dentro del módulo de replicación-control del plásmido. En concreto, en el promotor del gen del RNAlI, implicado en el circuito de control de copias del plásmido. Ensayos de EMSA y *footprinting* confirmaron que MobM se une específicamente a esta secuencia *in vitro*. Además, a través de experimentos *in vivo* se muestra que MobM tiene un efecto inhibitorio sobre la transcripción del RNAlI, reduciendo sus niveles intracelulares y favoreciendo un aumento en el número de copias plasmídicas. Este es el primer estudio que prueba la comunicación intramolecular entre los módulos de replicación-control y conjugación de un plásmido movilizable que replica mediante el mecanismo RC.

4. UN NUEVO ELEMENTO MOVILIZABLE DE *S. agalactiae*

Una búsqueda de relaxasas de la familia MOB_{V1} en cromosomas bacterianos reveló la presencia de una proteína homóloga a MobM (MobSag) dentro de un nuevo elemento movilizable (IME_{rpsI}) de *S. agalactiae*. Los resultados de este trabajo mostraron que IME_{rpsI} tiene capacidad para escindir del cromosoma y su módulo de transferencia (*oriT*_{IME_{rpsI}} y gen *mobSag*) es funcional *in vivo*. La caracterización de MobSag reveló que contiene los tres motivos característicos de la familia MOB_{V1} en su región N-terminal, donde su estructura secundaria presenta una alternancia de hélices- α y cadenas- β característica de las relaxasas conjugativas. MobSag tiene actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que es capaz de relajar DNA superenrollado de un plásmido que contiene su diana (*oriT*_{IME_{rpsI}}) y mediar la transferencia conjugativa del mismo. La actividad de corte de MobSag es dependiente de dosis de proteína y es óptima a 50°C, 20 minutos. El corte que realiza es específico de cadena (líder) y sitio (5'-GpT-3') y coincide con el predicho para los *oriT*s de la familia MOB_{V1}.

SUMMARY

CONJUGATIVE RELAXASES OF THE MOB_V FAMILY

INTRODUCTION

Conjugation is the most important mechanism involved in horizontal genetic transfer between bacteria. This process relies on the exchange of genetic material through physical contact from a donor to a recipient cell. Therefore, it is a source of diversification and adaptation of microorganisms to different niches (Gogarten & Townsend, 2005).

The conjugative transfer is carried out through three specialized modules: the relaxosome (MOB) integrated by the origin of transfer (*oriT*) and one or more proteins involved in the DNA processing, the coupling protein (T4CP), and the type IV secretion system (T4SS). Based on this modular composition, the conjugative elements can be classified as **autotransferables** or **mobilizables**. In general, the latter contain only the relaxosome, and can be transferred only when co-residing with an autotransferable element that provides the T4CP and T4SS (Smillie et al, 2010). Based on the genomic location, the conjugative elements can be **extrachromosomal** (plasmids), with autonomous replication capacity; or **intrachromosomal** (ICEs, Integrative and Conjugative Elements), integrated within the chromosome but with excision/integration abilities. When the latter are mobilizables, they are called IMEs (Integrative and Mobilizable Elements). Reviewed in (Bellanger et al, 2014).

Regarding the relaxosome, the key elements involved in the conjugative mobilization of the DNA are the *oriT* sequence and the relaxase protein. **OriTs** are DNA sequences that contain stretches of nucleotides involved in DNA-protein interactions (inverted and/or directed repeats) and the cleavage site for the relaxase. **Relaxases** are proteins with endonuclease/topoisomerase activity that recognize the *oriT* sequence where they specifically cleave the DNA to initiate the conjugation (donor cell), or close the transferred DNA strand in the termination event (recipient cell). Up to now, all relaxases described use a tyrosine-mediated transesterification by a mechanism that shares similarities with the rolling circle replication (RCR). In general, the domain involved with DNA interaction (relaxase domain) is located at the N-terminal region of the protein, whereas the C-terminal moiety can contain helicase, primase or protein-protein interactions domains. Reviewed in (Chandler et al, 2013). The aminoacid sequence of the relaxases has been used to classify the conjugative

elements (MOB families) since it provides a global view on the dissemination of these elements by conjugation (Garcillán-Barcia et al, 2009). The present work is focused on the characterization of two mobilizable elements that encode relaxases belonging to the MOB_{V1} family: pMV158 and IME*rpsI*.

OBJECTIVES

1. To update the MOB_{V1} family of plasmids, their distribution and phylogenetic relationships with emphasis on their transfer modules.
2. To characterize the relaxase domain of MobM protein, encoded by plasmid pMV158, at its structural and functional level.
3. To study the global interactions between MobM and the DNA of plasmid pMV158.
4. To characterize a newly discovered integrative element and the relaxase of the MOB_{V1} family it encodes.

RESULTS AND CONCLUSIONS

1. PLASMIDS OF THE MOB_{V1} FAMILY

A bioinformatic survey of plasmids belonging to the MOB_{V1} family (using relaxase MobM_{pMV158} as the prototype) allowed the identification of 97 relaxases codified by 93 different plasmids. All these plasmids are mobilizable and were isolated from G+ bacteria, mainly from *phylum* Firmicutes. Almost half of the plasmids (45%) encode antibiotic resistance or other determinants, and up to 80% contain RCR initiator proteins. The transfer modules of MOB_{V1} plasmids show that inverted repeats and putative nick sites within their *oriT* sequences are highly conserved. However, the relaxases encoded by these plasmids present a low overall similarity, although the three characteristic motifs of the MOB_{V1} family are conserved.

2. THE RELAXASE DOMAIN OF MobM

Purification and characterization of a new N-terminal truncated version of MobM (that contains its relaxase domain) has shown that the DNA binding and cleavage activities are located in the first 200 residues, whereas the central region (200-243) is important in DNA positioning within the active center of the protein. The oligomerization

domain is placed in the C-terminal region (243-494). Resolution of the structures of MobM with several DNA substrates together with construction of protein mutant derivatives and functional analyses revealed that the catalytic residue of MobM is the histidine at position 22 (H22). This is the first report on a relaxase that uses a residue other than tyrosine to perform the DNA nucleophilic attack.

3. INTERACTION OF MobM WITH THE REPLICATION AND CONTROL MODULE OF PLASMID pMV158

Electron microscopy analyses have unveiled that MobM could bind to plasmid pMV158 in a region located within the replication-control module. This region was mapped by EMSA and DNase I footprinting assays and was located within the promoter region of gene *rnalI*. RNAlI controls pMV158 copy number at a translational level. *In vivo* experiments showed that MobM inhibits transcription of RNAlI, thus reducing the intracellular levels of RNAlI and, consequently, increasing plasmid copy number. We believe that our findings constitute a novel mechanism of regulation of plasmid copy number by a relaxase and demonstrate the existence of intramolecular communications between the mobilization and the replication-control gene modules of a plasmid.

4. A NEW MOBILIZABLE ELEMENT OF *S. agalactiae*

Bioinformatic searches of MOB_{V1} relaxases in bacterial chromosomes has revealed the existence of a putative MobM homolog (MobSag) located within a mobilizable element (*IME_{rpsI}*) of *S. agalactiae*. The present work has shown that *IME_{rpsI}* has the ability to excise from the chromosome as well as the *in vivo* functionality of its transfer module (*oriT_{IME_{rpsI}}* and *mobSag* gene). The MobSag protein characterization revealed that its N-terminal domain encompasses the three characteristic motifs of the MOB_{V1} family of relaxases. MobSag has *in vitro* relaxase activity, since it is able to relax supercoiled plasmid DNA harbouring *oriT_{IME_{rpsI}}*. Cleavage of supercoiled DNA by MobSag depends on the protein dose, having optimal activity at 50°C, 20 min. Relaxation of scDNA by MobSag is strand and site-specific (leader strand and 5'-GpT-3' site), corresponding with the predicted nick site for the *oriTs* of plasmids belonging to the MOB_{V1} family. Further, MobSag is active *in vivo*, since it mediates the conjugative transfer of a supercoiled plasmid that contains its *oriT_{IME_{rpsI}}*.

INTRODUCCIÓN

1. TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL

La transferencia genética horizontal (*Horizontal Gene Transfer*, HGT) consiste en el intercambio de material genético entre células que pueden o no estar relacionadas filogenéticamente (Thomas, 2000). En bacterias, este fenómeno supone una fuerza evolutiva importante que afecta a la dinámica y adaptación de los genomas a diversos nichos (Gogarten & Townsend, 2005). Tanto es así que se considera principal responsable de la aparición y diseminación de bacterias patógenas resistentes a antibióticos (Mazel & Davies, 1999), uno de los problemas más importantes en la salud pública actual.

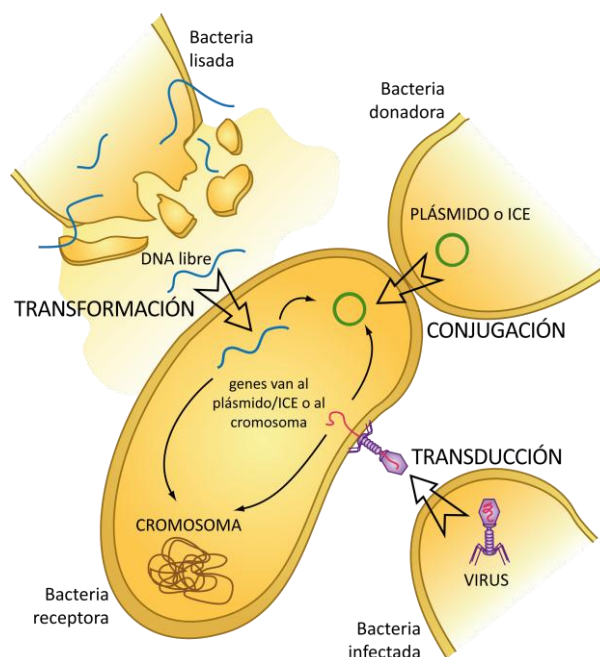


Figura 1. Transferencia genética horizontal en bacterias. En la transformación, la bacteria receptora adquiere DNA desnudo (sin proteínas asociadas) del exterior. En el caso de la transducción, el DNA se introduce en la célula huésped a través de un bacteriófago. En la conjugación, la transferencia de DNA tiene lugar entre dos bacterias a través de contacto físico. El mantenimiento del DNA exógeno (plásmido o Elemento Conjugativo e Integrativo; ICE) en la célula receptora depende de su capacidad de autorreplicación o bien de su integración en el cromosoma u otro elemento autorreplicativo. (Modificado de (Levy, 1998)).

Existen tres mecanismos principales de HGT descritos en bacterias (Figura 1): i) **transformación**, que consiste en la introducción de DNA que se encuentra en el ambiente en la célula a través de su membrana; ii) **transducción**, donde el DNA es introducido en la bacteria a través de un bacteriófago; y iii) **conjugación**, en el que el DNA se transfiere directamente de una célula a otra. Éste último es el mecanismo de HGT más extendido, e implica que la transferencia de material genético (plásmidos u

otros elementos móviles) se realice mediante contacto físico directo entre una célula bacteriana donadora y otra receptora (Halary et al, 2010; Thomas, 2000).

Los elementos transferidos mediante conjugación ofrecen una gran variedad de fenotipos a sus huéspedes y pueden reportar ventajas evolutivas tales como capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencias a antibióticos, metales pesados u otros factores de virulencia. Estos elementos, al contrario de lo que puede ocurrir con la transformación o transducción, se transfieren como hebras de DNA completas y autónomas, por lo que su adquisición de forma estable en la célula receptora es mucho más eficiente. El estudio de los mecanismos moleculares del proceso de la conjugación podría abrir nuevas vías para el diseño y desarrollo de compuestos que eviten la aparición y propagación de estos elementos, y por tanto, de los factores que codifican (Fernandez-Lopez et al, 2005; Lipps, 2008; Thomas, 2000).

2. CONJUGACIÓN BACTERIANA

La estrategia de conjugación bacteriana más común es la basada en el modelo que combina el mecanismo de replicación de DNA por círculo rodante (RCR) y los sistemas de secreción de macromoléculas de tipo IV (Llosa et al, 2002). Así, según se indica en la Figura 2, las proteínas que intervienen en el proceso conjugativo se integran en tres módulos especializados (Smillie et al, 2010):

- a) El relaxosoma (módulo MOB o *Dtr*, *DNA transfer replication*) es un complejo nucleoproteico encargado de reconocer y procesar el DNA que se va a transferir. Este complejo está constituido por el origen de transferencia (*oriT*) del DNA, la proteína iniciadora relaxasa (Tra/Mob) y en algunas ocasiones una o más proteínas accesorias.
- b) El complejo multiproteico formador del par conjugativo (MPF, *Mating Pair Formation*) está formado por un sistema de secreción de tipo IV (T4SS, *Type IV Secretion System*). Este sistema genera un conducto transmembrana capaz de transportar el complejo relaxasa-DNA desde la célula donadora hacia la receptora.
- c) La proteína acopladora (T4CP, *Coupling Protein*) es la encargada de comunicar el relaxosoma con el T4SS.

De acuerdo con la composición de estos módulos, los elementos conjugativos pueden clasificarse en: i) **autotransferibles**, cuando contienen todos los genes implicados en la transferencia por conjugación o ii) **movilizables**, portadores solamente de los elementos que componen el relaxosoma. Estos últimos únicamente se transfieren cuando co-residen en la misma célula con algún elemento

autotransferible, que aporte el resto de la maquinaria (T4CP y T4SS). En general, los elementos autotransferibles presentan un tamaño grande (>30 kb) y bajo número de copias por célula, mientras que los movilizables suelen tener un tamaño menor (<30 kb) y un alto número de copias (Smillie et al, 2010).

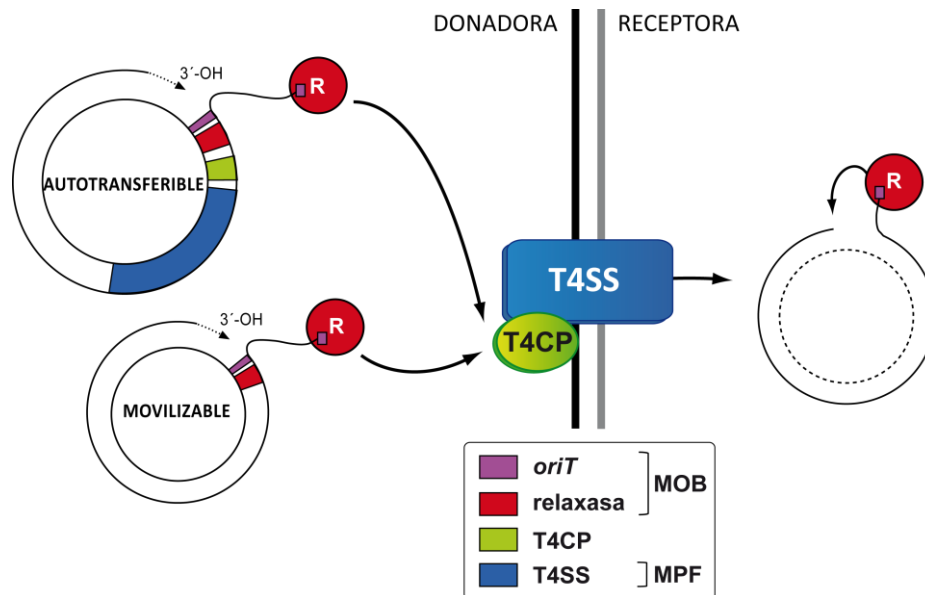


Figura 2. Esquema de los principales procesos y componentes implicados en la conjugación. La conjugación comienza cuando la proteína relaxasa (R; rojo) corta específicamente sobre una de las cadenas del *oriT* (morado). Tras el corte, la relaxasa queda unida covalentemente al extremo 5' de la cadena del DNA a transferir. La interacción de la relaxasa con la proteína acopladora (T4CP; verde) y otros componentes del sistema de secreción de tipo 4 (T4SS) permiten el transporte activo del complejo relaxasa-ssDNA hacia la célula receptora. En la célula receptora se reconstituye el *oriT* a través de una reacción mediada por la relaxasa, que cerrará la molécula de DNA recién adquirida. Los elementos conjugativos autotransferibles contienen todos los elementos necesarios para la conjugación: el origen de transferencia (*oriT*; morado), la relaxasa (R; rojo), la proteína acopladora (T4CP; verde) y el sistema de secreción de tipo 4 (T4SS; azul). Por otra parte, los elementos movilizables sólo contienen el módulo MOB (*oriT* y relaxasa), con o sin T4CP, por lo que necesitan de la maquinaria del MPF aportada por otro elemento autotransferible que co-exista en la misma célula para poder ser transferido. (Modificada de (Smillie et al, 2010)).

3. ELEMENTOS CONJUGATIVOS

Los elementos genéticos que se transfieren por conjugación suelen presentar una estructura de tipo modular, de forma que los genes que los forman se agrupan de acuerdo a su función (Bellanger et al, 2014; Lorenzo-Díaz et al, 2014; Thomas, 2000). En general, se pueden distinguir cuatro módulos génicos involucrados en: i) transferencia conjugativa; ii) replicación y su control; iii) escisión e integración en el cromosoma del hospedador y iv) funciones accesorias como: factores de patogenicidad, estabilidad y mantenimiento, resistencia a antibióticos o metales. De

esta forma, todos los elementos conjugativos tienen en común la presencia de un módulo de transferencia; pero el resto de unidades funcionales se encuentran o no dependiendo del tipo de elemento.

Si atendemos a su ubicación en el genoma bacteriano, los elementos conjugativos se pueden clasificar en dos tipos, cada uno de ellos caracterizado por un módulo funcional distinto (Figura 3): extracromosómicos, que se identifican por tener un módulo de replicación y control; e intracromosómicos, cuyo módulo representativo es el de escisión e integración. Los avances en técnicas de secuenciación masiva han revelado la gran cantidad y variedad de elementos conjugativos que se encuentran presentes en los genomas bacterianos. De hecho, un estudio *in silico* realizado en 2011 sobre un total de 1,124 genomas bacterianos identificó casi el mismo número de elementos conjugativos (1,180) (Guglielmini et al, 2011). Entre éstos, se encontró una sobrerrepresentación de elementos intracromosómicos (67%) frente a plásmidos (33%) y además, se vio que los elementos movilizables eran más abundantes que los autotransferibles, indicando que la movilización de elementos en *trans* es frecuente en poblaciones naturales (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2013; Guglielmini et al, 2011).

3.1. Elementos extracromosómicos

Denominados comúnmente como plásmidos, son elementos genéticos móviles con capacidad para replicar de forma autónoma y controlada (Figura 3A). En la mayoría de los casos, los plásmidos son circulares y bicatenarios, pudiendo variar en tamaño (<1-500 kb) y en número de copias (1-300 copias/equivalente cromosómico). Tienen la capacidad de mantenerse estables en las poblaciones bacterianas a través de transferencia vertical y horizontal. Revisado en (Pinto et al, 2012; Tomalsky & Alonso, 2015). El control de su replicación se realiza mediante factores codificados por el DNA plasmídico (como proteínas represoras y RNAs antisentido) y de forma coordinada con la división celular bacteriana. Los plásmidos suelen usar tres estrategias generales para iniciar el proceso replicativo (del Solar et al, 1998): replicación tipo theta, replicación por desplazamiento de hebra, o replicación por círculo rodante (RC). Ésta última comparte muchas similitudes con el proceso de transferencia por conjugación, ya que el primer paso consiste en la relajación del DNA superenrollado (actividad relaxasa) por la acción de proteínas (Rep y Tra/Mob) codificadas en el propio plásmido, que reconocen sus respectivos sitios de unión: el origen de replicación de cadena doble (*dso*, replicación) o el *oriT* (conjugación).

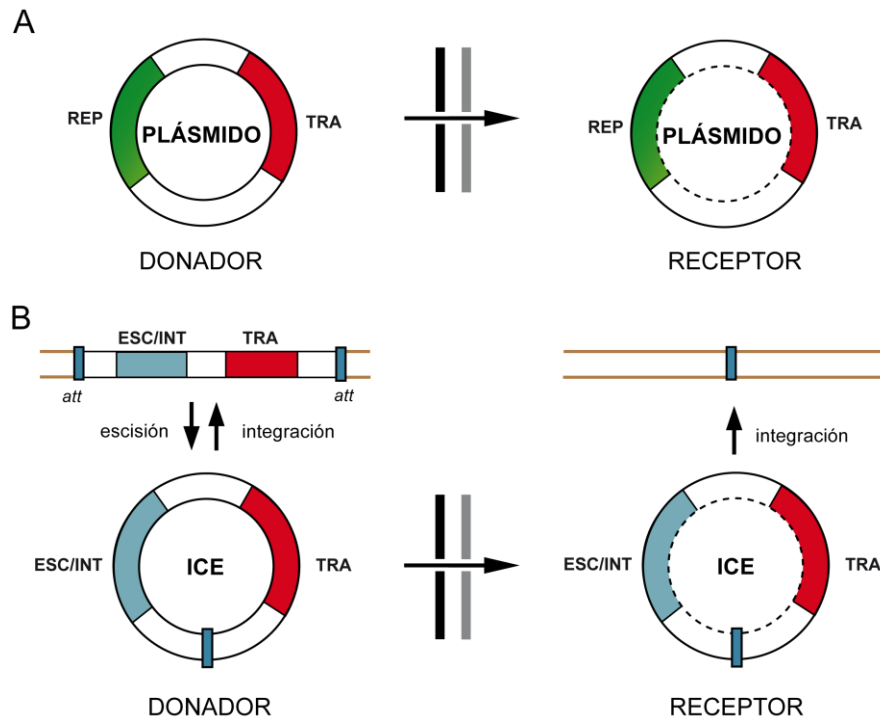


Figura 3. Esquema general de la transferencia por conjugación de elementos conjugativos extracromosómicos (plásmido; A) o intracromosómicos (ICE; B). Tras el contacto donador-receptor, se inicia la transferencia de una de las cadenas del DNA del plásmido (A) o ICE (B) a través del T4SS. El ssDNA transferido, es reconstruido en el receptor (línea discontinua) para regenerar la molécula de dsDNA. Se representan los módulos involucrados en: transferencia (rojo, TRA), replicación (verde, REP) y escisión/integración (azul, ESC/INT). **A.** Los plásmidos pueden replicar autónomamente debido a la presencia de un módulo de replicación (verde). **B.** Los ICEs replican con el cromosoma del hospedador al encontrarse como elementos integrados en el mismo. En marrón se indica el cromosoma y los rectángulos azules que flanquean el ICE representan los sitios de recombinación específica (*attachment site; att*). Estos sitios son reconocidos por una recombinasa sitio-específica y otras proteínas codificadas por el ICE (azul) para escindir o integrar el elemento. Tras la escisión, y antes de su integración, los ICEs se encuentran en forma de plásmidos dsDNA. (Modificado de (Koraimann & Wagner, 2014)).

3.2. Elementos intracromosómicos

Denominados ICEs (*Integrative and Conjugative Elements*), son elementos genéticos móviles que se encuentran integrados en el cromosoma (Figura 3B). Se encuentran flanqueados por dos secuencias repetidas (sitios de recombinación específica o *attachment sites; att*) que son reconocidas por una recombinasa sitio-específica. La actividad de la recombinasa sobre los sitios *att* permite a los elementos escindirse del, e integrarse en, el genoma del hospedador y por tanto, no requieren de autorreplicación para su mantenimiento. Otros ICEs utilizan para su escisión e integración transposasas de tipo DDE en vez de recombinasas (Guerillot et al, 2013). Al igual que los plásmidos, se han identificado elementos intracromosómicos movilizables que carecen de una maquinaria conjugativa completa y que se denominan IMEs (*Integrative and Mobilizable Elements*).

Aunque las últimas investigaciones apuntan a que los mecanismos de replicación, transferencia y estabilidad de estos elementos son muy parecidos a los presentes en plásmidos, todavía se desconocen muchos de los detalles de su biología debido al escaso número de trabajos experimentales que hay sobre los mismos. Revisado en (Bellanger et al, 2014; Guglielmini et al, 2011; Wozniak & Waldor, 2010).

4. BASES MOLECULARES DE LA CONJUGACIÓN

El proceso conjugativo comienza cuando las dos células implicadas (donadora y receptora) entran en contacto físico. En bacterias Gram-positivas (G+) la interacción celular necesita de proteínas de adhesión (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Goessweiner-Mohr et al, 2013; Grohmann et al, 2003), mientras que en bacterias Gram-negativas (G-) se lleva a cabo a través de la extensión del *pilus* conjugativo, que pone en contacto a célula donadora y receptora (Bhatty et al, 2013; Zechner et al, 2012).

La proteína que inicia la conjugación es una endonucleasa que reconoce una secuencia específica del DNA dentro del elemento conjugativo denominada origen de transferencia (*oriT*), donde realiza un corte en el enlace fosfodiéster de un dinucleótido específico en una de las cadenas del DNA (Figura 4a). Como consecuencia de esta actividad, la molécula de DNA superenrollado pasa a estar topológicamente relajada, razón por la cual estas proteínas se han definido como 'relaxasas'. Esta actividad se realiza a través del reconocimiento de una región del *oriT* que incluye el sitio de corte (*nick site*) y una repetición invertida a 5' del mismo (Figura 4a). Los detalles de las interacciones proteína-DNA están estudiadas en varios sistemas, revelando que para poder realizar su corte específico la relaxasa requiere que el DNA se encuentre desapareado en forma monocatenaria (Datta et al, 2003; Guasch et al, 2003; Larkin et al, 2005; Pansegrau & Lanka, 1996a)

Tras la reacción de corte se genera un enlace covalente entre el extremo 5' del DNA y el residuo catalítico de la relaxasa. Consecuentemente, el extremo 3'-OH generado queda libre (Guzmán & Espinosa, 1997; Pansegrau & Lanka, 1996a; Pansegrau & Lanka, 1996b) y, a modo de cebador, es susceptible de ser extendido mediante replicación por círculo rodante (Figura 4b-c). Una vez que se ha formado el relaxosoma, tiene lugar la interacción con la proteína acopladora (T4CP) y la secreción activa del complejo DNA-relaxasa a través del sistema de secreción de tipo IV (T4SS) (Cabezón et al, 2012; de Paz et al, 2010; Llosa et al, 2002; Llosa et al, 2003). El mecanismo de bombeo activo de este complejo asume el desplegamiento de la

relaxasa y el paso del complejo proteína-DNA a la célula receptora (Draper et al, 2005; Lang et al, 2010). Después de que el sustrato se haya transferido por completo al receptor, es la propia relaxasa la que llevaría a cabo una segunda reacción de transesterificación que resultaría en la re-circularización del DNA (Draper et al, 2005) (Figura 4d-f). Revisado en (Chandler et al, 2013).

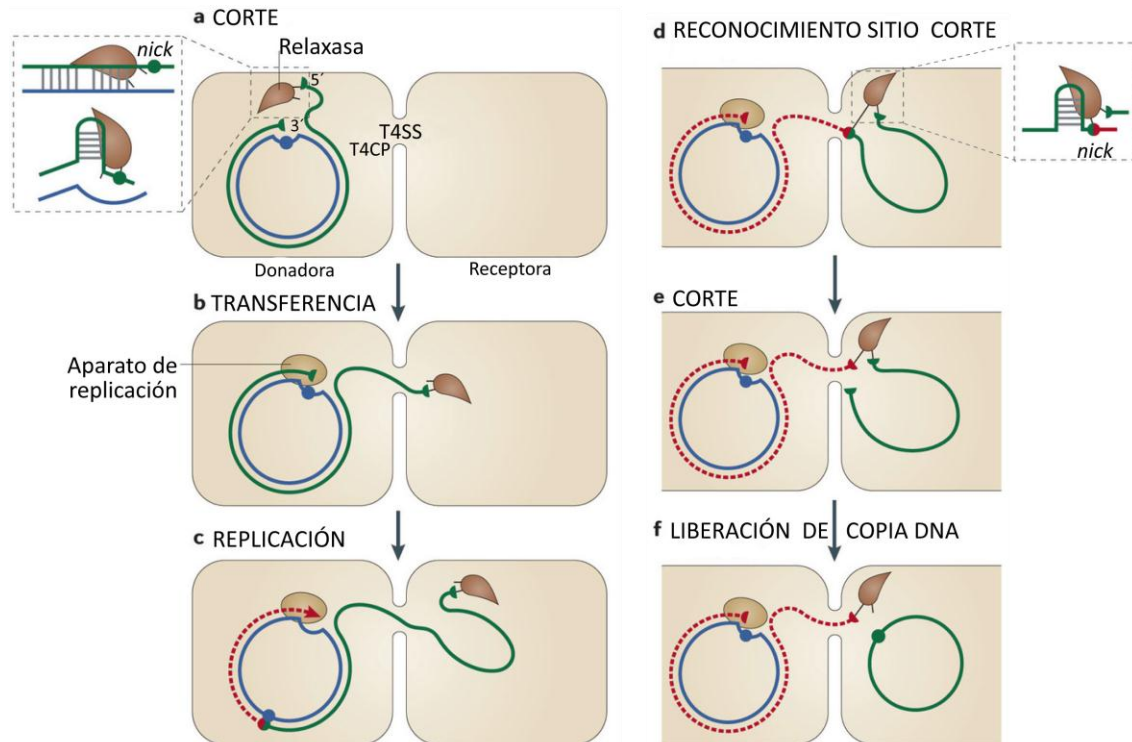


Figura 4. Mecanismo molecular de la conjugación bacteriana. Ordenado cronológicamente (a-f). **a.** La conjugación se inicia cuando la relaxasa reconoce el *oriT* donde realiza un ataque nucleofílico sobre el sitio de corte (*nick site*) generando un enlace entre el residuo catalítico de la relaxasa y el extremo 5' de la cadena de DNA recién cortada. **b.** El complejo ssDNA-relaxasa es transferido a célula receptora a través de la interacción con la T4CP y el T4SS. **c.** Aunque no es imprescindible para la transferencia, desde el extremo 3' del DNA recién cortado en la célula donadora se puede iniciar la replicación por círculo rodante usando el aparato de replicación del huésped. **d-f.** La terminación de la replicación se produce cuando la relaxasa corta el DNA transferido para regenerar una copia del ssDNA en la célula receptora. Este corte puede ser mediado por la relaxasa unida al extremo de DNA (representado en la figura), o por una segunda molécula de relaxasa (no se representa). Una vez reconstituída la molécula de ssDNA en el receptor, ésta se regeneraría a bicatenaria y superenrollada con ayuda de la maquinaria del huésped. (Modificado de (Chandler et al, 2013)).

La replicación de la cadena complementaria es necesaria para evitar el acúmulo de formas monocatenarias (ssDNA) y reducir la probabilidad de daños en el DNA (te Riele et al, 1986). La síntesis de la cadena complementaria podría producirse de igual manera a la propuesta para la conversión de DNA monocatenario a bicatenario en la replicación plasmídica por círculo rodante (RC), a partir de un origen de cadena retrasada (*sso*) y mediado por la RNA polimerasa (RNAP) del huésped

(Kramer et al, 1997; Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b). Por último, el DNA de doble cadena recién generado pasaría a un estado superenrollado mediante la actividad DNA girasa codificada por el huésped (del Solar et al, 1998; Espinosa, 2013; Khan, 2005). A partir de la nueva molécula plasmídica en la célula receptora se sintetizan todas las proteínas y RNAs implicados en la replicación activa del plásmido, aumentando el número de copias promedio (N_{av}) para asegurar su estabilidad y segregación. Además, se expresarán los determinantes de virulencia, resistencia a antibióticos y/u otros factores que codifique el plásmido.

4.1. Orígenes de transferencia y relaxasas

Orígenes de transferencia (*oriTs*)

El *oriT* es el único elemento que se requiere en *cis* para la transferencia de una molécula de DNA por conjugación. Los *oriTs* son secuencias de DNA de longitud variable (30-500 pb) que contienen, además del sitio de corte específico, elementos implicados en la interacción DNA-proteína tales como repeticiones directas (DR) o invertidas (IR) y regiones ricas en A+T. Estos elementos facilitarían la formación de estructuras secundarias de tipo cruciforme y/o la fusión de la doble cadena en el DNA superenrollado, lo que generaría un sustrato adecuado (ssDNA) para que la relaxasa introduzca el corte específico y así inicie la transferencia conjugativa (Datta et al, 2003; Guasch et al, 2003; Larkin et al, 2005; Pansegrau & Lanka, 1996a).

Relaxasas

Las relaxasas conjugativas (Tra o Mob) son topoisomerasas de tipo I que presentan actividad endonucleasa (Chandler et al, 2013). Estas proteínas suelen contener varios dominios funcionales: en la región N-terminal se localiza el dominio de interacción con DNA (unión y actividad endonucleasa), mientras que la región C-terminal puede contener dominios de interacción proteína-proteína y asociación a membranas (de Antonio et al, 2004) o actividad helicasa o primasa (Gomis-Rüth & Coll, 2006; Guasch et al, 2003; Monzingo et al, 2007). La estructura tridimensional del dominio N-terminal de las relaxasas resueltas hasta ahora revela un plegamiento similar, que consiste en un núcleo central formado por una lámina de cinco cadenas- β antiparalelas, flanqueado por una serie de hélices- α (Figura 5).

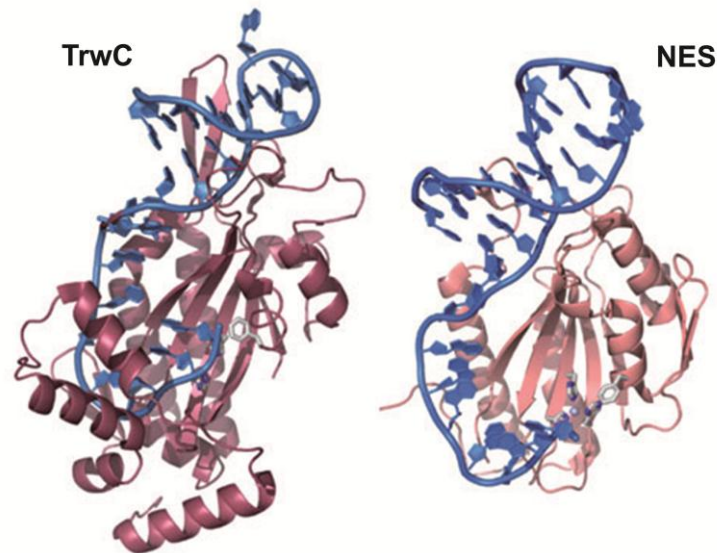


Figura 5. Estructuras del dominio relaxasa de las proteínas TrwC y NES con sus respectivos DNAs sustrato. En la izquierda se muestra el dominio relaxasa de TrwC, del plásmido R388, con un oligonucleótido de 25 bases (código PDB: 2CDM) (Boer et al, 2006). En la derecha está representada la relaxasa NES, del plásmido pLW1043, con un oligonucleótido de 30 bases (código PDB: 4HT4) (Edwards et al, 2013). En morado o rosa se representan las proteínas, mientras que en azul se representan los DNAs empleados para la obtención de los co-cristales. (Modificado de (Chandler et al, 2013)).

Algunas relaxasas conjugativas pertenecen a las familias PD-(D/E)XK de enzimas de restricción o las hidrolasas HD (Francia et al, 2013; Garcillán-Barcia et al, 2009), pero la mayoría pertenecen a la familia HUH, donde también se encuentran otras proteínas como las iniciadoras de la replicación por círculo rodante (Rep) y algunas transposasas (IS, Tnp) (Chandler et al, 2013). Esta familia presenta como característica común la presencia de un motivo HUH (histidina-residuo hidrofóbico-histidina) que, junto a un tercer residuo de histidina (HxDEx(T/S/N)PHUH, donde x es cualquier residuo), se encargan de la coordinación de un catión divalente, esencial para el corte del DNA.

En cuanto a la actividad endonucleasa, estas proteínas se caracterizan por poseer actividad de corte sobre DNA en la iniciación de la conjugación (en la célula donadora) y de cierre en la terminación (en la célula receptora). En los sistemas descritos hasta ahora, ambos procesos se realizan a través de reacciones de transesterificación catalizadas por medio de residuos de tirosina (Y). Así, el centro activo de estas proteínas se suele componer por el característico motivo HUH y uno (Y1) o dos (Y2) residuos catalíticos de tirosina, que pueden estar en la misma molécula de proteína (como en TrwC_{R388} (Guasch et al, 2003) y TraI_F (Datta et al, 2003)) o bien en unidades de proteína distinta (como en MobA_{R1162} (Monzingo et al, 2007) y NES_{pLW1043} (Edwards et al, 2013)). Además, suele encontrarse un cuarto residuo (histidina, aspártico, glutamina) que en conjunto con el motivo HUH, coordinan

un metal divalente (Figura 6) (Carballeira et al, 2014; Chandler et al, 2013). El metal favorece el posicionamiento correcto del enlace fosfato del DNA que se va a escindir y además, a través de la interacción de uno de los oxígenos del grupo fosfato aumenta la electropositividad del fósforo, favoreciendo el ataque nucleofílico por parte del residuo de tirosina. El residuo de aspártico podría estar involucrado en la formación de un puente de hidrógeno con una de las histidinas del motivo HUH, y además, actuar como base para extraer el protón del grupo hidroxilo de la tirosina catalítica y potenciar el ataque sobre el enlace fosfato específico en la cadena de DNA (Figura 6). Además, también se ha visto que otros residuos como la serina o arginina podrían estabilizar la unión DNA-proteína (Guasch et al, 2003; Pansegrau et al, 1994). Cabe destacar que los motivos conservados en las proteínas de tipo Rep y de tipo Tra/Mob presentan permutación circular, es decir, que el orden está invertido. Así, en la familia Rep el motivo de coordinación de metal (HUH) está más próximo al extremo N-terminal que el residuo catalítico, mientras que las relaxasas de tipo Mob ocurre lo contrario (Francia et al, 2004a).

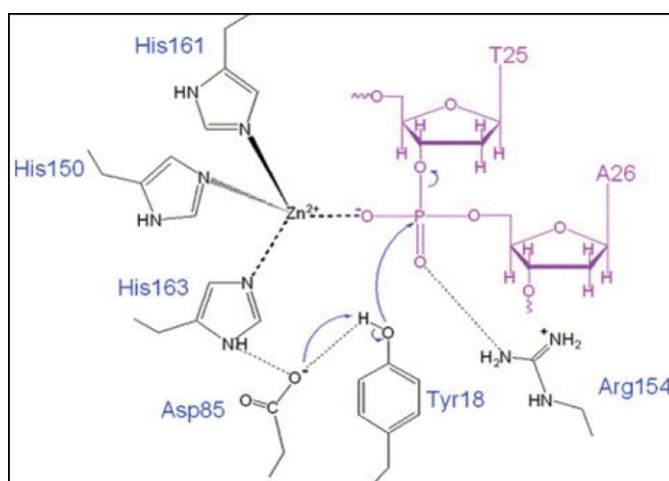


Figura 6. Mecanismo catalítico de TrwC_{R388} en el inicio de la transferencia. En azul se indican los aminoácidos que conforman el sitio activo; en violeta, el dinucleótido de corte (5'-TpA-3'). (Tomado de (Boer et al, 2006)).

La secuencia aminoacídica de la región N-terminal de las relaxasas conjugativas (dominio relaxasa) se ha utilizado como una herramienta muy útil a la hora de detectar y clasificar elementos conjugativos. En este trabajo se ha usado en esta clasificación, ya que aporta una visión global sobre la incidencia y diseminación de estos elementos mediante conjugación. En concreto, la clasificación de plásmidos en base a las homología de sus relaxasas ha definido seis familias (Figura 7) (Garcillán-Barcia et al, 2009): MOB_F, MOB_H, MOB_C, MOB_Q, MOB_P y MOB_V. Este análisis se extendió años más tarde para la clasificación de elementos conjugativos

intracromosómicos, tras lo que se definieron dos nuevas familias: MOB_T y MOB_B (Figura 7) (Guglielmini et al, 2011).

Familia MOB	Relaxasa prototipo _elemento conjugativo	Huésped original
MOB _F	TrwC_R388	<i>Escherichia coli</i>
MOB _H	TraI_R27	<i>Salmonella typhi</i>
MOB _C	MobA_RSF1010	<i>Enterobacter cloacae</i>
MOB _Q	MobC_CloDF13	<i>Escherichia coli</i>
MOB _P	TraI_RP4	<i>Escherichia coli</i>
MOB _V	MobM_pMV158	<i>Streptococcus agalactiae</i>
MOB _T	Orf20_Tn916	<i>Enterococcus faecalis</i>
MOB _B	Mob_CTn	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>

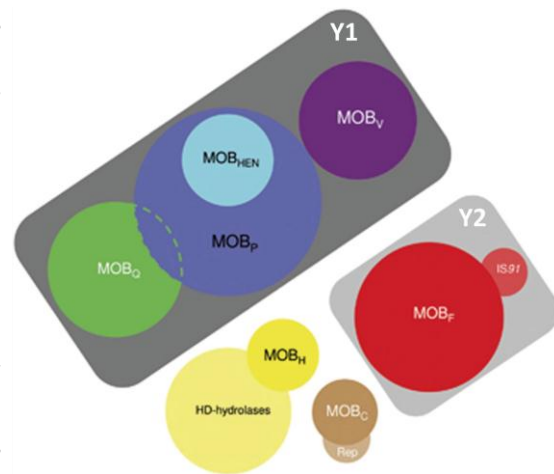


Figura 7. Familias de relaxasas. En la lista se enumeran las relaxasas prototipo de cada familia MOB y el huésped original de donde se aislaron. A la derecha se ilustra el esquema de las relaciones entre familias MOB de relaxasas exceptuando las familias MOB_T y MOB_B. Las relaxasas que contienen una sola tirosina activa (Y1) en el centro catalítico se agruparon con fondo gris oscuro y las que tienen dos (Y2) se representaron con fondo gris claro. El área de cada círculo es proporcional al número de relaxasas. Datos y figura tomados de (Garcillán-Barcia et al, 2009) y (Guglielmini et al, 2011).

Tal como se puede observar en el esquema de la Figura 7, la familia MOB_P es la familia que contiene más miembros, mientras que las familias MOB_H y MOB_C son las menos representadas. Además, se ha visto que algunas familias están distribuidas preferencialmente en plásmidos de cierto rango de tamaño y/o tipo. Por ejemplo, MOB_F y MOB_H se encuentran casi exclusivamente en plásmidos autotransferibles de gran tamaño (>60 kb), mientras que MOB_C y MOB_V parecen presentar preferencia por plásmidos de mediano (20-60 kb) y pequeño (<5 kb) tamaño, respectivamente; siendo además de tipo movilizable la mayoría de los plásmidos agrupados en MOB_V (Smillie et al, 2010). En cuanto a su reparto en los distintos *phyla* bacterianos, las α -proteobacterias carecen de MOB_H y MOB_C pero tienen muchos MOB_Q, mientras que las γ -proteobacterias tienen representantes de todas las familias. Las Actinobacterias parecen estar dominadas por la familia MOB_F, pero carecen de miembros de MOB_H y MOB_V. Por otra parte, MOB_V está sobrerrepresentada en el *phylum* Firmicutes pero es muy rara en Proteobacterias (Smillie et al, 2010).

5. ELEMENTOS CONJUGATIVOS EN *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, también denominada estreptococo de grupo B (GBS del inglés *Group B Streptococcus*), es una bacteria G+ comensal presente en mucosas y piel en humanos. Desde los años 60, esta bacteria ha emergido como patógeno, convirtiéndose en uno de los principales agentes causales de infecciones como meningitis, neumonía y sepsis tanto en neonatos como en adultos inmunodeprimidos (Edmond et al, 2012; Le Doare & Heath, 2013). Este fenómeno ha convertido a este organismo en objeto de estudio en un intento de desvelar los mecanismos que conducen a su capacidad de adaptación y virulencia (Da Cunha et al, 2014). La gran plasticidad genética que presenta su genoma, con más de un 20% de genes codificados en elementos móviles, podría ser una de las claves de esta emergencia (Tettelin et al, 2005). Este trabajo se ha centrado en el estudio de dos elementos movilizables que codifican relaxasas MOB_V, ambos aislados en *S. agalactiae*: el plásmido pMV158 y el IME_{rpsI}.

5.1. Elementos extracromosómicos: el plásmido pMV158

Los dos elementos extracromosómicos más estudiados en GBS son el plásmido autotransferible pIP501 (30.2 kb) (Horodniceanu et al, 1979) y el plásmido movilizable pMV158 (5540 pb) (Burdett, 1980). Éste último ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio durante más de veinticinco años. Fue aislado originalmente de la estirpe MV158 y es el prototipo de la familia de plásmidos MOB_V (Garcillán-Barcia et al, 2009; Lorenzo-Díaz et al, 2014). Se ha demostrado que pMV158 presenta un amplio rango de huéspedes, ya que es capaz de replicar en diversas especies como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Además, se ha demostrado que es movilizado mediante funciones aportadas por plásmidos autotransferibles (como el mencionado pIP501), entre diferentes estirpes de *S. pneumoniae*, o hacia otras especies como *E. faecalis* y *L. lactis* (Farías & Espinosa, 2000; Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009a) e incluso entre *L. lactis* y *E. coli* (Farías & Espinosa, 2000).

En cuanto a su contenido génico, el plásmido pMV158 presenta distintos módulos funcionales (Fernández-López et al, 2014; Lorenzo-Díaz et al, 2014) (Figura 8): i) el **módulo LIC** (*Leading-strand Initiation and Control*), compuesto por el origen de replicación de la cadena líder (*dso*) y los genes de replicación y su control; ii) el **módulo DET**, que determina la resistencia a tetraciclina (determinante de tipo *tetL*);

iii) el **módulo MOB**, que codifica las funciones de movilización conjugativa, y iv) dos orígenes de cadena retrasada, *ssuU* y *ssuA*.

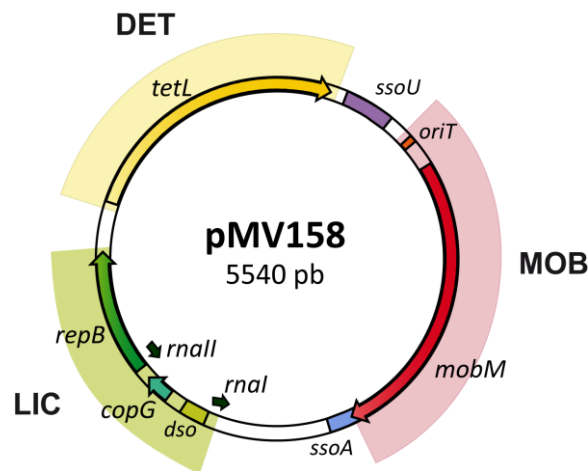


Figura 8. Mapa genético y funcional del plásmido pMV158. Se muestran los seis genes identificados y que se transcriben en el plásmido, dos de los cuales codifican RNAs (RNAI y RNAII); *repB* y *copG* forman parte de un operón implicado en la replicación y el control del número de copias plasmídico (respectivamente), *tetL* codifica resistencia a tetraciclina, y *mobM* codifica la proteína iniciadora de la conjugación (MobM). Se indica la dirección en la que se produce la transcripción (flechas). Se indica también la posición de los orígenes de cadena doble (*dso*) y cadena sencilla (*ssuA* y *ssuU*), a partir de los que se produce la replicación de la cadena líder y retrasada, respectivamente.

5.1.1. El módulo LIC

El módulo LIC incluye el *dso* y cuatro de los genes codificados por el plásmido (Figura 9). Concretamente, el promotor *Pcr* dirige la síntesis de un mRNA bicistrónico correspondiente a los genes *copG* y *repB* y el promotor *PctII* dirige la transcripción de un RNA de pequeño tamaño denominado RNAII. Desde el promotor *P_I* se transcribe otro pequeño RNA (RNAI) cuya función es, hasta el momento, desconocida.

La proteína RepB (210 aminoácidos; 24.3 kDa) pertenece a la familia de proteínas iniciadoras de replicación por círculo rodante (Rep_2, PF01719) (Boer et al, 2009; de la Campa et al, 1990; Moscoso et al, 1995; Ruiz-Masó et al, 2007). Es la responsable de iniciar la replicación vegetativa de plásmido mediante el reconocimiento del *dso*. La replicación RC es muy común en plásmidos de pequeño tamaño (Espinosa et al, 1995). Este mecanismo de replicación comparte similitudes con el proceso de transferencia genética horizontal por conjugación (Waters & Guiney, 1993), ya que ambos procesos son iniciados por una proteína (Rep en replicación y Tra/Mob en conjugación) que reconocen y cortan sobre un dinucleótido específico en una de las cadenas del DNA (regiones *dso* y *oriT*). En pMV158, el proceso de replicación de la cadena líder es iniciado por RepB tras reconocer el *dso* y cortar sobre el enlace fosfodiéster de un dinucleótido específico en una de las cadenas del DNA

plasmídico. La rotura genera un extremo 3'-OH desde el cual se inicia la síntesis de la cadena líder. Se postula que en la elongación intervendrían proteínas del huésped como la DNA polimerasa I (Díaz et al, 1994), y una vez que el replisoma alcanza el *dso* reconstituido, la replicación de la cadena líder concluye con una serie de reacciones de transesterificación (Rasooly et al, 1994).

Generalmente, el control del número de copias plasmídicas en plásmidos RCR se realiza en la etapa de iniciación de la replicación. En el caso de pMV158, esta regulación se realiza mediante sistemas de control negativo basados en dos elementos: la proteína represora CopG (45 aminoácidos; 5.1 kDa) y el RNAII (48 bases). Ambos elementos están implicados en el circuito de control de la replicación del plásmido a nivel transcripcional y traduccional, respectivamente. CopG pertenece a la superfamilia de represores transcripcionales con dominio 'ribbon-helix-helix' (RHH_1, PF01402) (Costa et al, 2001; Gomis-Rüth et al, 1998; Hernandez-Arriaga et al, 2009). Esta proteína actúa como represor a dos niveles durante la formación del complejo de iniciación de la transcripción, de manera que puede impedir la unión de la RNA polimerasa (RNAP) en el promotor *Pcr* o bien puede desplazarla una vez que se haya unido (Hernandez-Arriaga et al, 2009). De esta manera, no sólo regula la síntesis de la proteína iniciadora de la replicación RepB, sino que también regula su propia síntesis (del Solar et al, 1990). El RNAII regula la síntesis de la proteína RepB mediante anillamiento complementario con una región del mRNA de *copG-repB* que contiene las señales necesarias para la traducción de RepB (del Solar et al, 1997; López-Aguilar & del Solar, 2013; Lopez-Aguilar et al, 2015). Por tanto, la actuación conjunta del RNAII con la proteína CopG permite una regulación ajustada del control en el número de copias del plásmido (del Solar et al, 1995).

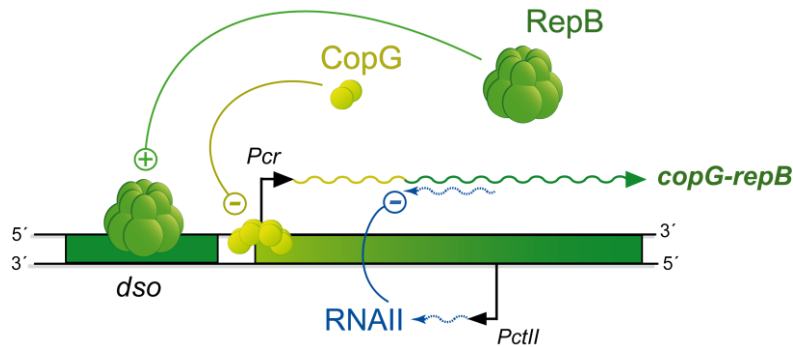


Figura 9. Módulo LIC y circuito de control del número de copias de pMV158. El componente activador (+) es la proteína iniciadora de la replicación RepB (verde) que actúa sobre su DNA diana, el origen de replicación (*dso*), para iniciar la replicación RC. Los componentes represores (-) son la proteína CopG (amarillo) y el RNAII (azul). En el mismo mRNA se transcriben *copG* y *repB*, aunque la traducción de las proteínas se encuentra desacoplada. CopG se une a su DNA diana y reprime la transcripción de *Pcr* inhibiendo su propia síntesis y también la de RepB. El RNAII es complementario a la región con las señales necesarias para la traducción de RepB, actuando como regulador negativo a nivel traduccional.

5.1.2. El módulo MOB

El módulo MOB de pMV158 contiene los dos elementos necesarios para su transferencia por movilización conjugativa: el origen de transferencia (*oriT_{pMV158}*) y el gen *mobM* que codifica la relaxasa MobM (Mob_Pre, PF01076) (Priebe & Lacks, 1989).

El origen de transferencia de pMV158

El *oriT_{pMV158}* tiene un alto contenido en A+T (75.6%) comparado con el resto del plásmido (62.3%) y tres repeticiones invertidas: IR1, IR2 e IR3 de 18, 24 y 31 pb, respectivamente (Figura 10) (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Estudios previos del laboratorio confirmaron que tras el ataque nucleofílico de MobM sobre una de las cadenas del *oriT_{pMV158}*, la proteína permanece unida de forma estable al extremo 5' (Guzmán & Espinosa, 1997). Además, el sitio de corte se mapeó tanto *in vitro* (Guzmán & Espinosa, 1997) como *in vivo* (Grohmann et al, 1997) entre las coordenadas 3595-3596 (dinucleótido 5'-GpT-3') del plásmido pMV158 (NC_010096).

La predicción bioinformática de las posibles estructuras que formarían las repeticiones invertidas del *oriT_{pMV158}* reveló que podría generar tres estructuras tallo-lazo alternativas, donde la posición del sitio de corte estaría localizada en distintas posiciones (Figura 10): i) 8 pb upstream del IR1, ii) en la región intra-brazo del IR2, o iii) en el extremo 3' del IR3 (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Dado que las tres repeticiones invertidas solapan parcialmente, la generación de estructuras secundarias de una de ellas podría impedir la formación de otras, indicando que el DNA sustrato para la

relaxasa podría depender del grado de superhelicidad del plásmido (Lorenzo-Díaz et al, 2011).

El estudio de las interacciones de MobM con DNA superenrollado de pMV158 reveló que la proteína reconoce una estructura cruciforme de tipo IR3 en el *oriT*_{pMV158} y separa el DNA en la región que incluye el sitio de corte mediante un desplazamiento hacia una estructura de tipo IR1 (Fernández-López et al, 2015a). Por otra parte, los ensayos de afinidad usando como sustrato DNAs monocatenarios demostraron que MobM se une específicamente a la secuencia del *oriT* que incluye IR1/IR3 con alta afinidad (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Estos ensayos permitieron definir la secuencia mínima de unión de MobM sobre DNA monocatenario como la que incluye el IR1 y 8 nucleótidos más hacia el sitio de corte (IR1+8; Figura 10).

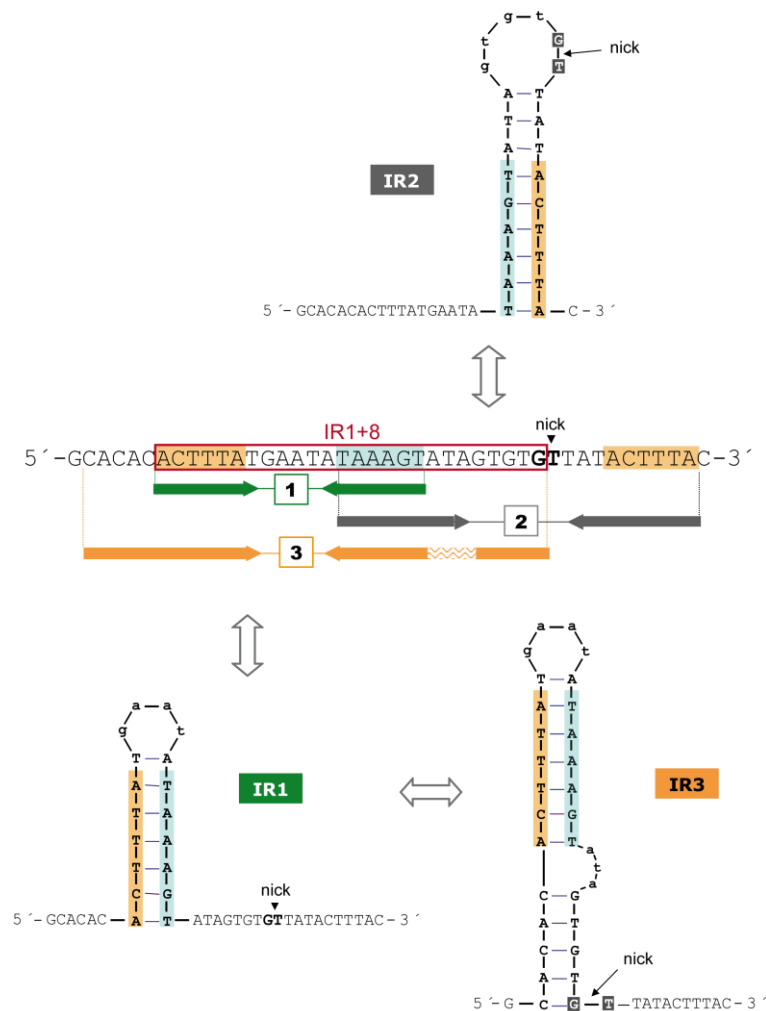


Figura 10. Posibles estructuras secundarias que se pueden formar en la cadena transferente del *oriT* de pMV158. Debido al solapamiento de secuencia (sombreada en azul), la extrusión del IR2 (gris) supondría la imposibilidad de formación de la estructura IR1 (verde) y viceversa. Si continúa la extrusión de la estructura cruciforme IR1, se podría formar una horquilla de tipo IR3 (naranja). Con un recuadro rojo se marca la secuencia IR1+8 definida como sitio de unión mínimo para MobM sobre DNA monocatenario. (Tomado de (Fernández-López et al, 2015a)).

Aunque la relevancia funcional de los IR en las distintas fases del proceso conjugativo está todavía bajo investigación, los resultados de los que disponemos hasta ahora parecen apuntar que el IR1/3 podría estar involucrado en el reconocimiento de MobM del $oriT_{pMV158}$ para la formación del relaxosoma (en la célula donadora), mientras que el IR2 sería reconocido en la reacción de terminación para cerrar la cadena de DNA transferida (en la célula receptora) (Fernández-López et al, 2015a). El papel del $oriT_{pMV158}$ no se limita sólo a su función en la transferencia conjugativa sino que además, se ha demostrado que la unión de MobM a la región que incluye el IR2 también permite a la proteína reprimir su propia expresión génica (Lorenzo-Díaz et al, 2012).

La relaxasa MobM

El segundo elemento del módulo de transferencia es la relaxasa MobM (494 aminoácidos, 57.9 kDa) (Guzmán & Espinosa, 1997). El dominio relaxasa de MobM (unión y corte de DNA) se encuentra en la mitad N-terminal de la proteína, tal como demostró la caracterización de la proteína MobMN199, una versión truncada de MobM que incluía los primeros 199 aminoácidos (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Dentro de esta región se encuentran los tres motivos conservados característicos de la familia MOB_{V1} (Garcillán-Barcia et al, 2009) (Figura 11A): i) motivo I (HxxR), sin función conocida hasta esta tesis; ii) motivo II (NY(D/E)L), con la tirosina propuesta como catalítica (Garcillán-Barcia et al, 2009), y iii) motivo III o HUH (HxDEx(T/S/N)PHUH), propuesto como implicado en la coordinación del metal divalente (de Antonio et al, 2004). En la región C-terminal de MobM (200-494) se ubica el dominio de oligomerización, posiblemente mediado por una cremallera de leucinas (residuos 317-338: LENHSKSLEAKIECLESDNLQL) (Figura 11A). También se postula que esta región podría estar involucrada en la interacción con otras proteínas de la maquinaria conjugativa (T4CP y/o T4SS). Además, la disrupción de una región rica en hélices- α localizada en el extremo C-terminal de MobM resultó en la pérdida de asociación de MobM con membranas y la pérdida de su habilidad para transferir a pMV158 (de Antonio et al, 2004).

Mediante análisis bioquímicos se ha demostrado que la proteína MobM es un dímero con forma elipsoide (de Antonio et al, 2004). Su contenido en estructura secundaria se ha estimado en un 60% de hélice- α , un 5% de cadena- β y un 35% de estructuras desordenadas (de Antonio et al, 2004). Por otra parte, se ha podido resolver la estructura tridimensional del dominio relaxasa de MobM (MobMN199) unida a un oligonucleótido que incluía la secuencia definida previamente como $oriT$ mínimo (IR1+8) (Figura 11B). Esta conformación podría corresponder a la adoptada en el

inicio de la transferencia (Fernández-López et al, 2015a). Los datos de la estructura mostraron que el plegamiento general exhibía una lámina central compuestas por varias cadenas- β antiparalelas rodeada por un conjunto de hélices- α (Figura 11C), una estructura homóloga a la de otras relaxasas con estructuras resueltas como TrwC_{R388} o NES_{pLW043} (Figura 5).

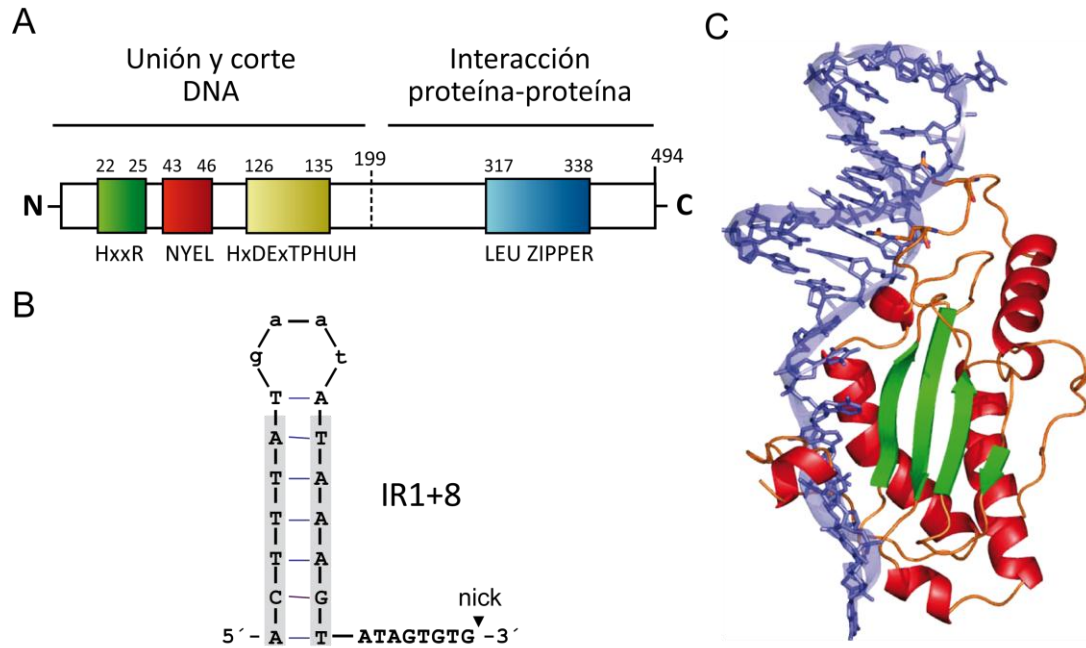


Figura 11. La proteína MobM y su dominio relaxasa. A. Esquema indicando cada uno de los motivos conservados de la proteína MobM con la posición aminoacídica relativa que ocupan (parte superior). La localización del aminoácido 199 indica el extremo C-terminal para la proteína truncada MobMN199. **B.** Esquema de la estructura secundaria que formaría el oligonucleótido IR1+8 que representa la región de unión mínima de MobM en el *oriT*. **C.** Estructura tridimensional del dominio relaxasa de MobM (MobMN199) unida al oligonucleótido IR1+8. El DNA se representa en azul y las hélices- α , las cadenas- β y los bucles de la proteína se indican como cintas helicoidales rojas, flechas verdes y tubos marrones, respectivamente. (Modificado de (Lorenzo-Díaz, 2010)).

En cuanto a su actividad enzimática, hay dos requisitos indispensables para que la proteína realice el corte: i) el sustrato de DNA debe estar en estado monocatenario y ii) la coordinación de metales divalentes, tales como Mg²⁺ o Mn²⁺ (de Antonio et al, 2004). Se ha visto que la actividad de corte es dependiente de la concentración de proteína, de la temperatura (óptima a 30°C) y del tiempo de la reacción (>20 min). El dominio relaxasa de MobM presenta una afinidad elevada por iones Mn²⁺, además, en presencia de este catión y/o de DNA sustrato se incrementa la estabilidad térmica de la proteína, reteniendo incluso su actividad enzimática tras un proceso de desnaturalización y renaturalización (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Este descubrimiento es consistente con el modelo en el cual el complejo DNA-relaxasa

debe ser completamente desplegado para entrar en la célula receptora durante la conjugación (Draper et al, 2005; Garcillán-Barcia et al, 2007).

La actividad de corte de MobM también depende de la topología del sustrato de DNA. Así, MobM es capaz de cortar tanto DNA superenrollado como un oligonucleótido que incluyan la secuencia del *oriT*_{pMV158}. Sin embargo, no presenta actividad catalítica sobre DNA bicatenario lineal. Por otra parte, ensayos de actividad mostraron que MobMN199 presenta la misma actividad sobre DNA superenrollado que la proteína nativa MobM, pero en cambio, esta versión truncada no tiene actividad de corte sobre DNA monocatenario. Atendiendo a la estructura tridimensional de MobMN199, se observó que el extremo 3' del oligonucleótido empleado (IR1+8) queda alejado del centro activo, lo que podría explicar esta falta de actividad (Fernández-López et al, 2015a). De hecho, el análisis de la estructura de TrwC mostró claramente cómo el extremo 3' del DNA unido realiza un giro y entra hacia el centro activo de la proteína. En la Figura 12, se puede observar como la región C-terminal del dominio relaxasa de TrwCN293 (293 aminoácidos) contiene tres hélices- α (α 8, α 9 y α 10) que dirigen la región monocatenaria del DNA hacia la lámina- β central donde se encuentran los residuos catalíticos implicados en el corte. Sin embargo, la región homóloga en MobMN199 se encuentra desestructurada, lo que podría explicar por qué el extremo 3' del DNA queda libre.

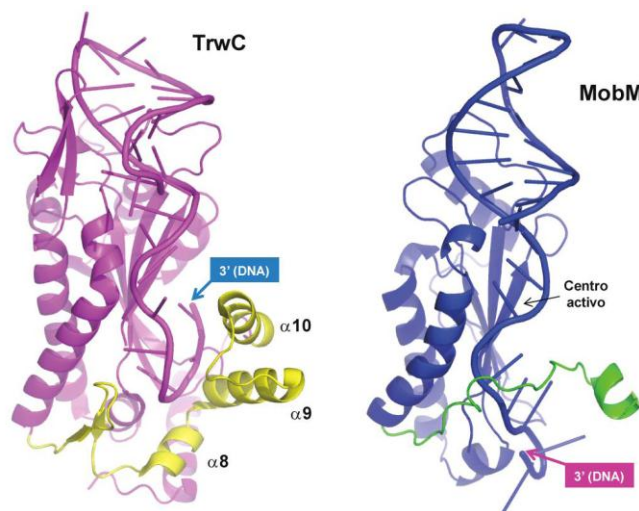


Figura 12. Comparación entre las estructuras de TrwCN293 y MobMN199 indicando la posición de los extremos 3' de los respectivos DNAs empleados en la obtención de los co-cristales. Las tres hélices- α (en amarillo) que introducen el DNA hacia el centro activo de TrwC (código PDB: 1QX0) no se encuentran disponibles en la versión truncada de MobMN199 (en verde). (Tomado de (Lorenzo-Díaz, 2010)).

5.2. Elementos intracromosómicos

El cromosoma de *S. agalactiae* presenta una organización compleja, donde se ha identificado una base conservada y hasta 69 regiones variables (Tettelin et al, 2005). El estudio de los ocho primeros genomas secuenciados de esta bacteria mostró que hasta dos tercios de estas regiones variables se correspondían con putativos elementos conjugativos integrados. En concreto, se identificaron un total de 12 ICEs y 6 IMEs repartidos en 14 localizaciones cromosómicas distintas (Figura 13) (Brochet et al, 2008a). La mayoría de estos elementos se encontraron integrados específicamente en un sitio único, tal como el extremo 3' de un gen de RNA de transferencia ($tRNA^{Leu}$, $tRNA^{Thr}$ o $tRNA^{Lys}$), un gen ribosomal ($rpsI$, $rplL$, o $rpmG-3$), o el gen $guaA$. Las excepciones a esta norma fueron los elementos Tn916, TnGBS1 y TnGBS2, que se detectaron en hasta cuatro ubicaciones distintas del cromosoma (Brochet et al, 2008a). Además de intervenir en su propia movilidad, se ha visto que estos elementos participan en el intercambio por conjugación de grandes fragmentos de DNA cromosómicos (de hasta 334 kb) entre distintas estirpes de GBS, lo que ampliaría su papel en la dinámica del genoma bacteriano (Brochet et al, 2008b).

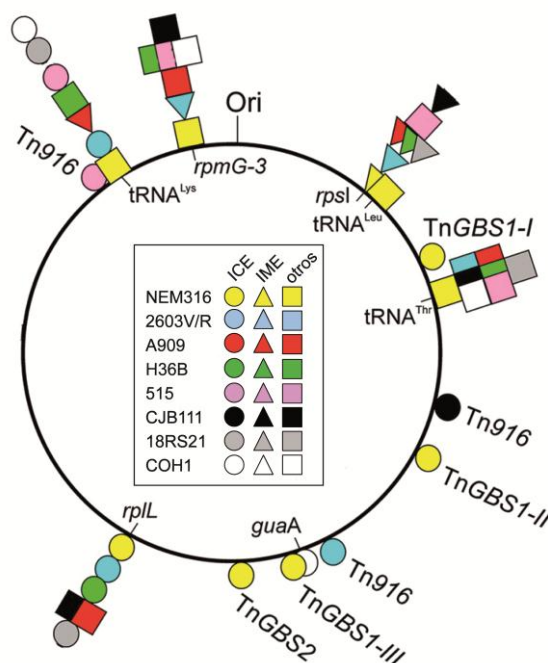


Figura 13. Mapa cromosómico indicando la posición de ICEs e IMEs en ocho estirpes de *S. agalactiae*. Se indica la posición y/o gen en el que se encuentran integrados los ICEs (círculos), IMEs (triángulos) u otros elementos genéticos móviles (cuadrados). El color del símbolo se refiere a la estirpe en la que se ha encontrado el elemento. En la parte superior se indica el origen de replicación del cromosoma (Ori). (Modificado de (Brochet et al, 2008a)).

En la Tabla 1 se presenta un listado con los elementos intracromosómicos de GBS de los que se disponen datos experimentales. Dentro de éstos, el ICE más estudiado es probablemente Tn916, aislado originalmente de *E. faecalis* (Clewel et al, 1995; Franke & Clewel, 1981). Se ha visto que Tn916 es capaz de escindirse del cromosoma hospedador y se transfiere conjugativamente no sólo entre estirpes de *S. agalactiae*, sino también hacia estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* (Haenni et al, 2010). De hecho, un estudio reciente reveló que la incidencia del Tn916 parece ser una de las principales responsables de la diseminación de la resistencia a tetraciclina entre la población de GBS (Da Cunha et al, 2014). Aparte de este ICE, sólo hay evidencias experimentales de la existencia de formas escindidas de TnGBS1 y 2 (Guerillot et al, 2013) y de cinco elementos más integrados en *rpsI*, *rpIL*, y *tRNA^{Lys}*. (Brochet et al, 2008a). En cuanto a su capacidad de transferirse horizontalmente, sólo se ha probado para TnGBS1 y 2 entre GBS; y para ICE_515_ *tRNA^{Lys}* entre distintos Firmicutes (Guerillot et al, 2013; Puymege et al, 2013). A su vez, también se ha visto que los ICEs Tn916 e ICE_515_ *tRNA^{Lys}* son capaces de movilizar a otros elementos codificados en el mismo cromosoma (Achard & Leclercq, 2007; Puymege et al, 2013).

Tabla 1. ICEs e IMEs integrados en el cromosoma de *S. agalactiae*.

Nombre	Sitio integración	Módulo MPF / MOB	Transferible ^a	Factores ^b	Referencia
TnGBS1	Upstream caja - 35 de promotores A	MPF _I / MOB _P	Si	N.D.	(Guerillot et al, 2013)
TnGBS2	Upstream caja - 35 de promotores A	MPF _{FATA} / MOB _P	Si	N.D.	(Brochet et al, 2009)
Tn916	regiones ricas en A+T	MPF _{FA} / MOB _T	Si	Tet ^R	(Brochet et al, 2008a)
ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>	3´ del gen <i>tRNA^{Lys}</i>	MPF _{FA} / MOB _T	Si	CAMP	(Puymege et al, 2013)
ICESa2603	3´ del gen <i>rpIL</i> (L7/L12)	MPF _{FATA} / MOB _P	Si	Met ^R	(Davies et al, 2009)
IME_2603_ <i>rpsI</i>	3´ del gen <i>rpsI</i> (S9)	MOB _V	N.D.	Ars ^R	(Brochet et al, 2008a)
IME_A909_ <i>tRNA^{Lys}</i>	3´ del gen <i>tRNA^{Lys}</i>	MOB _T	N.D.	N.D.	(Brochet et al, 2008a)
IME_2603_ <i>rpmG</i>	3´ del gen <i>rpmG-3</i> (L33)	MOB _T	N.D.	N.D.	(Brochet et al, 2008a)

N.D., No determinado. Datos tomados de (Bellanger et al, 2014)

^aSe indica con un 'Si' los elementos cuya transferencia conjugativa se ha demostrado experimentalmente.

^bFunciones accesorias que pueden ser útiles para el huésped: factor de patogenicidad CAMP y resistencias a tetraciclina (Tet^R), metales pesados (Met^R; en concreto, mercurio, cadmio y cobre) y arsenato (Ars^R).

OBJETIVOS

La transferencia de DNA mediante conjugación juega un importante papel en la dispersión de resistencias a antibióticos o factores de virulencia entre bacterias. Los elementos movilizables de la familia MOB_V se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias G⁺, donde los mecanismos que dirigen la conjugación están todavía poco estudiados. Basándonos en el trabajo realizado previamente en el laboratorio con el plásmido modelo de esta familia, pMV158, en esta Tesis Doctoral se plantea profundizar en el estudio de elementos móviles que codifican relaxasas conjugativas de la familia MOB_V. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Análisis de los plásmidos de la familia MOB_{V1}. Con este objetivo se pretende actualizar el repertorio de plásmidos de la familia MOB_{V1} a través de una búsqueda bioinformática, además de realizar un estudio de su estructura y constitución haciendo énfasis en los módulos de transferencia (*oriT* y gen *mob*). Este análisis permitirá obtener una perspectiva global sobre la incidencia y dispersión de esta familia.

2. Caracterización funcional y estructural del dominio relaxasa de MobM del plásmido pMV158. A través de la construcción de una nueva versión truncada de la proteína MobM que incluye su dominio relaxasa, se profundizará en el estudio de su actividad endonucleasa y estabilidad proteica. Además, la construcción de mutantes puntuales basados en la estructura de MobM permitirá conocer detalles sobre su mecanismo catalítico.

3. Interacciones globales entre MobM y DNA del plásmido pMV158. Datos de microscopía electrónica obtenidos previamente en el laboratorio indicaron que MobM se une específicamente no sólo al origen de transferencia de pMV158, sino a una segunda región del plásmido. Por ello, se plantea el estudio de la interacción de MobM con esta región y sus posibles implicaciones en alguna de las funciones o mantenimiento del plásmido.

4. Caracterización de una nueva relaxasa y elemento movilizable del cromosoma de *S. agalactiae*. En la búsqueda de nuevas relaxasas de la familia MOB_{V1} en cromosomas bacterianos, se ha identificado una proteína hipotética dentro de un elemento movilizable (IME*rpsI*) integrado en el cromosoma de *S. agalactiae*. En este objetivo se propone una caracterización global de esta nueva relaxasa y de las propiedades de movilización del elemento que la contiene.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS Y MANIPULACIÓN

Tabla 2. Estirpes bacterianas usadas en este trabajo.

Estirpe	Características o genotipo ^a	Fuente ^b
<i>Streptococcus agalactiae</i> HRC	Silvestre	Hospital Ramón y Cajal (Madrid, 2009)
<i>S. agalactiae</i> 2603V/R	Silvestre; genoma representativo de <i>S. agalactiae</i> en base de datos del NCBI	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Tettelin et al, 2002)
<i>S. agalactiae</i> NEM316	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Glaser et al, 2002)
<i>S. agalactiae</i> BM132	Silvestre; Rif ^R , Fus ^R	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Horodniceanu et al, 1979)
<i>S. agalactiae</i> Spain-IP-33	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Da Cunha et al, 2014)
<i>S. agalactiae</i> H36B	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Tettelin et al, 2005)
<i>S. agalactiae</i> CCH208800879	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Da Cunha et al, 2014)
<i>S. agalactiae</i> 18RS21	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Lancefield et al, 1975)
<i>S. agalactiae</i> Madagascar-IP-7	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Da Cunha et al, 2014)
<i>S. agalactiae</i> COH1	Silvestre	Philippe Glaser (I. Pasteur, París) (Wilson & Weaver, 1985)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 708	<i>end-1, exo-1, trt-1, hex-4, malM594</i>	(Lacks & Greenberg, 1977)
<i>S. pneumoniae</i> MP3008	<i>end-1, exo-1, trt-1, hex-4,; Nov^R</i>	(Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b)
<i>Escherichia coli</i> BL2(DE3)	λ DE3 (<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>) F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁺) gal</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> M15/pREP4	<i>Nals, Strs, Rifs, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+</i> . Estirpe derivada de <i>E. coli</i> K12, con delección M15 en el gen <i>lacZ</i> y plásmido pREP4; Km ^R	QIAGEN
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	λ DE3, <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , (F', <i>traD36, proAB⁺, lacI^qZΔM15</i>)	Promega
<i>E. coli</i> JM109(DE3)/pET-5	λ DE3, <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , (F', <i>traD36, proAB⁺, lacI^qZΔM15</i>); transformada con el plásmido pET-5; Ap ^R	Colección propia

<i>E. coli</i> JM109(DE3)/pLGM2	λ DE3, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, (F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q Δ M15); transformada con el plásmido pLGM2 (expresión de <i>mobM</i>); Ap ^R	Colección propia
<i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF	Gel+, Spr+ (gelatinasa y serina proteasa); Rif ^R , Fus ^R	(Murray et al, 1993)

^aEm^R, Rif^R, Fus^R, Nov^R, Km^R: resistencia a eritromicina, rifampicina, ácido fusídico, novobiocina y kanamicina, respectivamente.

^bLa bacteria *S. agalactiae* estirpe HRC fue aislada de una mujer de mediana edad con una infección abdominal en el Hospital Ramón y Cajal (Madrid), en abril del año 2009. El aislado fue cedido por los Dres. F. Baquero y T. Coque.

2. MEDIOS DE CULTIVO Y SELECCIÓN

Tabla 3. Medios de cultivo y selección usados en este trabajo.

Bacteria	Medio de cultivo	Selección a antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) ^a						
		Tc	Em	Rif	Fus	Km	Nov	Ap
<i>S. agalactiae</i>	Todd-Hewitt (TH) (Todd & Hewitt, 1932)	4	4	50	10			
<i>E. faecalis</i>	TH	4	4	25	25			
<i>S. pneumoniae</i>	AGCH (Lacks et al, 1986; Ruiz-Cruz et al, 2010) complementado con 0.2% de extracto de levadura y 0.3% de sacarosa o maltosa, dependiendo de la estirpe.	1	1			10	10	
<i>E. coli</i>	TY (1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 0.5% de NaCl) (Maniatis et al, 1982)	5-10				50		100-200

^aTc, Em, Rif, Fus, Km, Nov, Ap: resistencia a tetraciclina, eritromicina, rifampicina, ácido fusídico, kanamicina, novobiocina y ampicilina, respectivamente.

En el caso de cultivo en medio sólido de *S. agalactiae*, *E. faecalis* o *E. coli*, las placas se realizaron añadiendo 1.5% (m/v) de agar al medio correspondiente. Para el crecimiento de *S. pneumoniae* en medio sólido, se prepararon placas tal como se indica en Métodos 1.

En la preparación para electrocompetencia y transformación de *E. faecalis* se usaron los medios ESTY y SG-ESTY (ESTY suplementado con 0.5 M sacarosa y 6% glicina) (Cruz-Rodz & Gilmore, 1990). Para el mismo fin con cultivos de *S. agalactiae* se usó el medio TH suplementado con 0.5 M de sacarosa y 2.5% glicina; una solución

que contenía: 0.5 M de sacarosa, 1 mM de MgCl₂, 7 mM de NaH₂PO₄ y 15% de glicerol (pH 7.4); y el medio TH. En la preparación para la electroporación de estirpes de *E. coli* se utilizó el medio SOB (Hanahan, 1983) mientras que para la recuperación de las células tras la transformación se utilizó el medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa).

3. ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Plásmidos

Tabla 4. Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmido	Tamaño (pb)	Características ^a	Fuente
pAMβ1	27815	Plásmido conjugativo de <i>E. faecalis</i> DS-5; Em ^R	(Clewel et al, 1974)
pMV158	5540	Original de <i>S. agalactiae</i> ; movilizable por pAMβ1; Tc ^R	(Burdett, 1980)
pMVS	3687	Delección de <i>oriT</i> , <i>mobM</i> y <i>ssoA</i> de pMV158; introducción de diana <i>StuI</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pMVSag	5289	Derivado de pMVS con el módulo de movilización cromosómico de <i>S. agalactiae</i> HRC (<i>oriT</i> , <i>mobSag</i> , <i>ssoA</i>); Tc ^R	Este trabajo
pET-24b	5309	Vector de expresión bajo control del promotor φ10 del fago T7; Km ^R	Novagen
pET-5	4134	Vector de expresión bajo control del promotor φ10 del fago T7; Ap ^R	Novagen
pLGM2	7586	Doble fragmento <i>Tth111I</i> - <i>NcoI</i> de pMV158 clonado en vector pET-5; Ap ^R	(Guzmán & Espinosa, 1997)
pMobMN199	5384	pET-24b:: <i>mobMN199</i> ; Km ^R	(Lorenzo-Díaz et al, 2011)
pQE-1	3466	Vector de expresión bajo control del promotor del fago T5; Ap ^R	QIAGEN
pHisMobMN199	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pHisMobMN199(H22A)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (C64G, A65C); Ap ^R	Este trabajo
pHisMobMN199(H22Y)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (C64T); Ap ^R	Este trabajo

Materiales y Métodos

pHisMobMN199(R25A)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (C73G,G74C); Ap ^R	Este trabajo
pHisMobMN199(Y44F)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (A131T); Ap ^R	Este trabajo
pHisMobMN199(E129A)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (G386A); Ap ^R	Este trabajo
pHisMobMN199(E129Q)	4074	pQE-1:: <i>HismobMN199</i> (G385C); Ap ^R	Este trabajo
pMobMN243	5492	pET-24b:: <i>mobMN243</i> ; Km ^R	(Fernández-López et al, 2013b)
pMobSag	6598	pET-24b:: <i>mobSag</i> ; Km ^R	Este trabajo
pMV158(Y44F)	5540	Derivado de pMV158 con mutación A131T en gen <i>mobM</i> (Y44F)	Este trabajo
pMV158(H22A)	5540	Derivado de pMV158 con mutaciones C64G, A65C en gen <i>mobM</i> (H22A)	Este trabajo
pMP220	~10500	Vector de clonaje para fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> ; Tc ^R	Novagen (Spaink et al, 1987)
pΔORI	~10500	pMP220:: <i>Pmob2</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pRNAII	~10500	pMP220:: <i>PctII</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pAS	5210	Derivado de pLS1 que contiene el cassette <i>gfp</i> del plásmido pGreenTIR; Tc ^R	(Ruiz-Cruz et al, 2010)
pAST	5456	Derivado de pLS1 que contiene el cassette <i>gfp</i> del plásmido pGreenTIR y los terminadores transcripcionales <i>T1T2</i> de <i>E. coli</i> ; Tc ^R	(Ruiz-Cruz et al, 2010)
pAST- <i>PfcsK</i>	5573	Derivado de pAST que contiene el promotor del gen de la fuculosa kinasa (<i>PfcsK</i>) controlando la expresión de <i>gfp</i> ; Tc ^R	(Ruiz-Cruz et al, 2010)
pMVT	5670	Derivado de pMV158 con delección de <i>oriT</i> _{pMV158} y región promotora de <i>mobM</i> , adición <i>T1T2</i> de pAST; Tc ^R	Este trabajo
pMVT- <i>PfcsK</i>	5787	Derivado pMV158 con delección de <i>oriT</i> _{pMV158} y región promotora de <i>mobM</i> , adición de <i>T1T2-PfcsK</i> de pAST- <i>PfcsK</i> ; Tc ^R	Este trabajo

^aEm^R, Tc^R, Ap^R, Km^R, Neo^R, MLS^R: resistencia a eritromicina, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, neomicina y macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del tipo B, respectivamente.

3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron sintetizados en el servicio de Química de proteínas del CIB (Sintetizador Applied Biosystems 3400) o en la compañía IDT (Integrated DNA Technologies). En ambos casos se incluyó una purificación final por HPLC, disolución en agua ultrapura (Milli-Q) estéril a una concentración de 100 μ M y almacenamiento a -80 °C.

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Bases	Secuencia (5' - 3') ^a	Aplicaciones
INV-F	29	AGGCCT ACTCTATTGCCTTTTGACTTTT	Construcción pMVS
INV-R	20	CCGACCAAACCATAAAACC	Construcción pMVS
Sag1-F	27	TGGCAATTACCG GCTAGC ATCTCGGCGA	Construcción pMobSag
Sag1-R	24	CCTGACGACT CGAG CCCATCTAGT	Construcción pMobSag
Sag2-F	20	AGCGAAGAGCTGTCTGCAAG	Construcción pMVSag
Sag2-R	25	TCCTTACTCATTTATTCCATGGTTC	Construcción pMVSag
cIME-F	19	GCTTGAATGTGACAGCTC	Detección formas circulares IME <i>rpsI</i>
cIME-R	19	GCAATTTGCGGACTATCTC	Detección formas circulares IME <i>rpsI</i>
ssoA-R	18	TCACAACGCTCACCTCCA	Secuenciación
ssoU-F	20	GGGATCAACTTTGGGAGAGA	Secuenciación
T7-promoter	17	TAATACGACTCACTATA	Secuenciación
T7-terminator	19	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación
19nic4	23	Cy5-GAATATAAAGTATAGTGTGTAT	Ensayos de actividad de MobM
IR1+8	26	ACTTTATGAATATAAAGTATAGTGTG	Ensayos de unión, corte y competición de MobM
IR1+12	30	ACTTTATGAATATAAAGTATAGTGTGTAT	Ensayos de actividad de MobM

Materiales y Métodos

IR1+12pA	47	ACTTTATGAATATAAAAGTATAGTGTGTTATGG(A) ₁₅	Ensayos de actividad de MobM
pQE-Mob	23	AGTTACATGGTTGCAAGAATGCA	Construcción pHis-MobMN199
pQE-MobMN199	26	TCCTCTTTGAGTTACATATCAGCCAT	Construcción pHis-MobMN199
H22A-F	34	ATTTGGGAGGAGCTTTTAAGGCTAATGAACGTGT	Mutagénesis dirigida H22A de MobM
H22Y-F	34	ATTTGGGAGGAGCTTTTAAGIATAATGAACGTGT	Mutagénesis dirigida H22Y de MobM
H22F-F	34	ATTTGGGAGGAGCTTTTAAGIITAATGAACGTGT	Mutagénesis dirigida H22F de MobM
H22-R	30	CTTAAAAGCTCCTCCCAAATTGCCAGCTTT	Mutagénesis dirigida H22 de MobM
R25A-F	34	GAGCTTTTAAGCATAATGAAGCTGTTTTTGAGAC	Mutagénesis dirigida R25A de MobM
R25-R	30	TTCATTATGCTTAAAAGCTCCTCCCAAATT	Mutagénesis dirigida R25A de MobM
Y44F-F	30	CGAGCAGGTCACACCTCAACTICGAGTTGACGGA	Mutagénesis dirigida Y44F de MobM
Y44-R	34	GTTGAGGTGTGACCTGCTCGGGTTTATATC	Mutagénesis dirigida Y44F de MobM
E129A-F	34	ATGCGAGTGTTCACCTGGATGCAAGCACCCCTCA	Mutagénesis dirigida E129A de MobM
E129Q-F	34	ATGCGAGTGTTCACCTGGATCAAAGCACCCCTCA	Mutagénesis dirigida E129Q de MobM
E129-R	30	ATCCAAGTGAACACTCGCATAAGCAATATT	Mutagénesis dirigida E129 de MobM
FPT5	18	CCCGAAAAGTGCCACCTG	Secuenciación
RpQE	19	GTTCTGAGGTCATTAAGTGG	Secuenciación
NdeI-F	24	AAGGAGGGAAA CATATG AGTTACA	Construcción pMobMN243
P244-Stop-XhoI-R	34	CTTGTTAGTTGT CTCGA GTATCTAAGATTGAAC	Construcción pMobMN243
2/C3	33	AAAGACACACGAGGCTCGCCCGGGGATCCTCTA	Construcción pMVT y pMVT-PfcsK
4Sacl	30	ATTA GAGCTC GACCAAAACCATAAAACCTT	Construcción pMVT y pMVT-PfcsK

C2/3	33	CCCCGGGCGAGCCTCGTGTGTCTTTTCGGTAATC	Construcción pMVT y pMVT- <i>PfcsK</i>
PctII	24	TCTTTAGCCATAAAGTATAATATA	Ensayo de competición de unión con MobM
IR3	31	Cy5-CACACACTTTATGAATATAAAGTATAGTGTG	Ensayo de competición de unión con MobM
FP-PctII	27	TTGCCTTGAAAATTACAAGAAAGGTC	<i>Footprinting</i> con DNA superenrollado
FP-PctII-2	28	GCACTCCAAGCGTTTCAAGTTTCAGCTC	<i>Footprinting</i> con DNA superenrollado
PE-mall	17	TGCTGGCAGGCACTGGC	<i>Primer extension</i>
PE-coprep	24	CCGATTCACCTTAATGTTATCGTCA	<i>Primer extension</i>
PE-mob	23	CCCTCCTTAAGACTTGTCTTTTCG	<i>Primer extension</i>
AST-tet	23	GAGGGCAGACGTAGTTTATAGGG	<i>Primer extension</i>
Δ ORI-F	34	AGTATAGTGTGTTA <u>GAATTC</u> CACATGGAAGTTATA	Construcción p Δ ORI
Δ ORI-R	26	CAGACGAGCCG <u>CTGCAG</u> TCTATTGCT	Construcción p Δ ORI
RNAII-F	25	AGTCGCTTGGAATTCATTCAAGGATA	Construcción pRNAII
RNAII-R	25	CAGGCACTGG <u>CTGCAG</u> TCAAACATT	Construcción pRNAII
nickSag-F	21	ACCTGTCCCTTGCTGATTTTT	Secuenciación sitio corte de MobSag
nickSag-R	21	TAGCCGTCAACTGACCTGACT	Secuenciación sitio corte de MobSag

^aLos nucleótidos cambiados para generar sitios de restricción, mutantes puntuales o codones *Stop* se encuentran subrayados. Los sitios de restricción para cada enzima se marcan en negrita. Los oligonucleótidos 19nic4 e IR3 incluyen el fluoróforo Cy5 en su extremo 5'.

4. TAMPONES

Tabla 6. Tampones usados en este trabajo.

Tampón	Composición	Aplicación
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8.0 EDTA 1mM	Disolución del DNA
TAE	Tris base 40 mM pH 8.0 Ácido acético 20 mM EDTA 2 mM	Electroforesis de DNA en geles de agarosa
TBE	Tris base 89 mM pH 8.3 Acido bórico 89 mM EDTA 2.5 mM	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y poliacrilamida (PAA)
TG	Tris-HCl 50 mM pH 8.3 Glicina 300 mM SDS 0.1% EDTA 2 mM	Electroforesis de proteínas SDS-PAGE
SLB 5X	Tris-HCl 250 mM pH 7.2 SDS 10% β -Mercaptoetanol 3.5 M Glicerol 50% Azul de bromofenol 0.5%	Colorante de carga para electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE
SBE 3X	Sacarosa 30% Azul de bromofenol 0.075% EDTA 2.5 mM	Colorante de carga para electroforesis de DNA
BXGE 10X	Azul de bromofenol 0.25% Xilencianol 0.25% Glicerol 60% EDTA 10 mM	Colorante de carga para electroforesis de DNA y complejos DNA-proteína
BXF	Formamida desionizada 80% NaOH 10 mM Azul de bromofenol 0.1% Xilencianol 0.1% EDTA 1 mM	Carga de muestras de DNA en geles de PAA desnaturalizantes
CEC 3X	Azul de bromofenol 0.02% Glicerol 50% EDTA 2.5 mM	Colorante de carga para extractos crudos

A	Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 1 mM DTT 1 mM Glicerol 1%	Purificación de MobM, MobMN243, MobMN199 y MobSag. Se suplementa con NaCl a distintas concentraciones
B	Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 0.1 mM DTT 1 mM Glicerol 1% MnCl ₂ 8 mM	Actividad de corte de MobM, MobMN243, MobMN199, MobSag, His-MobMN199 y mutantes sobre DNA
HIS	Tris-HCl 10 mM pH 7.6 β-Mercaptoetanol 5 mM Glicerol 5% NaCl 1M	Purificación de His-MobMN199 y variantes. Se suplementa con diferentes concentraciones de imidazol.
MS	Acetato amónico 100 mM pH 6.8	Análisis de masas por MALDI-TOF
ESI-MS	Acetonitrilo-ácido fórmico 0.1% o acetonitrilo-agua-ácido fórmico 1% pH 6.8	Análisis de masas por nano ESI-MS
UA	Tris-HCl 20 mM pH 7.6 EDTA 1 mM DTT 0.1 mM NaCl 500 mM Glicerol 1% [vol/vol]	Análisis de proteínas por Ultracentrifugación Analítica
CD	Fosfato potásico 10 mM Sulfato amónico 100 mM pH 7.6	Lectura de espectros por dicroísmo circular
LEP	Sacarosa 25% Citrato trisódico 150 mM SDS 0.01% Na-DOC 0.1%	Lisis de <i>S. pneumoniae</i> para extractos crudos
LEAF	Sacarosa 25% NaCl 100 mM Lisozima 100 µg/µl	Lisis de <i>S. agalactiae</i> y <i>E. faecalis</i> para extractos crudos
LP	Tris-HCl 50 mM pH 7.6 EDTA 1 mM NaCl 50 mM Na-DOC 0.1%	Lisis de <i>S. pneumoniae</i> para extractos totales de proteína y extracción de RNA total

LAF	Tris-HCl 50 mM pH 7.6 EDTA 1 mM Lisozima 5 mg/ml Mutanolisina 0.26 U/μl	Lisis de <i>S. agalactiae</i> y <i>E. faecalis</i> para extractos totales de proteína
WBT	Tris 25 mM Glicina 192 mM Metanol 20%	Transferencia a membrana por <i>Western blot</i>
PBS	Na ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄ 2 mM KCl 2.7 mM NaCl 137 mM pH 7.4	Lavados membrana <i>Western blot</i>
PBS-L	PBS Tween-20 0.05%	Lavados membrana <i>Western blot</i>
PBS-S	PBS Tween-20 0.05% Caseína 0.2%	Saturación membrana <i>Western blot</i>
Tampón Z	Na ₂ HPO ₄ 60 mM NaH ₂ PO ₄ 40 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 1 mM β-mercaptoetanol 38 mM pH 7	Ensayos de actividad β-galactosidasa

5. ENZIMAS, PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS

Las enzimas de restricción, la ligasa y la polinucleótidoquinasa del fago T4 se adquirieron de New England Biolabs. La casa Roche suministró el kit de extracción de DNA plasmídico (*High Pure plasmid isolation kit*), la DNasa I *RNAse free*, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), inhibidor de proteasas *Complete* con y sin EDTA, antibiótico Ap, rNTPs y dNTPs no radiactivos. La DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* se adquirió a través de Finnzymes. Thermo Fisher Scientific suministró la transcriptasa reversa *Thermoscript*, la DNA polimerasa *Taq*, el marcador preteñido de pesos moleculares de proteínas (*SeeBlue Plus*), el inhibidor de RNasas (*RNAseZap*), y el kit para mutagénesis dirigida *GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System*. La retrotranscriptasa *iScript* y el kit de síntesis de cDNA con el que viene son de Bio-Rad. Bioline proporcionó el marcador de peso molecular de DNA *HyperLadder 1*. Sigma

suministró las siguientes enzimas: proteinasa K, RNasa A, seroalbúmina bovina (BSA), lisozima y mutanolisina; antibióticos: eritromicina (Em), rifampicina (Rif), tetraciclina (Tc), kanamicina (Km) y novobiocina (Nov); cloramfenicol (Cm) ácido fusídico (Fus), los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo IgG, además de polietilenimina (PEI), bromuro de etidio (BrEt), DMSO, imidazol y fucosa. El GelRed fue adquirido de Biotium. Merck suministró el dimetilsulfato (DMS), etanol, ácido clorhídrico, cloroformo, metanol y propanol, además de todos los aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono (sacarosa, maltosa y glucosa) y cationes divalentes (Mn^{+2} , Mg^{+2}). La caseína fue adquirida a Amresco. El fenol saturado se obtuvo de AppliChem. Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Pronadisa, Merck, Sigma, BD y Difco. De GE-Healthcare, el marcador de peso molecular proteínas (LMW), las columnas Illustra Microspin G-25 y las columnas *HisTrap HP*, *HiTrap Heparin HP* y *HiLoad Superdex 200*. El kit de secuenciación de DNA (*Sequenase Version 2.0*) se obtuvo de USB Corporation. Los nucleótidos radiactivos de Perkin-Elmer. La agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, β -mercaptoetanol, Coomassie Brilliant Blue, SDS, Triton X-100. Tween-20. Commassie Bio-safe, Sypro Ruby, el kit Inmun-StarTM HRP Chemiluminiscent y membranas de PVDF se adquirieron de Bio-Rad. Para la purificación de fragmentos de DNA de agarosa y limpieza de reacciones de PCR o digestiones enzimáticas se utilizó el kit *QIAquick* de QIAGEN. Para extraer DNA genómico se utilizó el kit *Genomic DNA Isolation kit* de Norgen. En el caso de extracción de DNA genómico de *S. agalactiae* se usó el kit *DNeasy blood Tissue* (QIAGEN). Para cultivos de *E. coli* en la extracción de DNA plasmídico se usó el kit de Midipreparaciones de Genomed. Para la extracción de RNA total se usó el kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). Las membranas para diálisis se obtuvieron de Spectrum, y las diapositivas de diálisis de Thermo Fisher Scientific. Las placas de revelado radiactivo en el equipo Phosphorimager (*Imaging Plates*) se obtuvieron de Fuji. Los filtros de nitrocelulosa (0.20. 0.22 o 0.45 μm) se adquirieron en Millipore. Las cubetas de electroporación de 2 mm de CellProjects. Los concentradores de muestra de proteína Vivaspin eran de GE-Healthcare.

6. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Tabla 7. Programas informáticos usados en este trabajo.

Uso	Programa	Dirección web/Compañía
Búsqueda de homologías	BLAST	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
		mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py
Búsqueda pautas de lectura	ORF finder	linux1.softberry.com/berry.phtml
Predicción de dominios funcionales	Pfam	pfam.sanger.ac.uk
Diseño oligonucleótidos	Primer_3	frodo.wi.mit.edu
Análisis oligonucleótidos	OligoAnalyzer	eu.idtdna.com
Visualización de genomas	Artemis	sanger.ac.uk/resources/software/artemis/
Ensamblado de genomas	IonGAP	http://iongap.hpc.iter.es/
Comparativa de genomas	SynTVView	genopole.pasteur.fr/SynTVView/
	MAUVE	darlinglab.org/mauve/mauve.html
Anotación de genomas	RAST	rast.nmpdr.org/
Comparación y representación de genomas	Easyfig 2.1	easyfig.sourceforge.net/
Mapas de restricción y lectura de secuencias	ApE plasmid	biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
Alineamiento de secuencias	ClustalOmega	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
	MUSCLE	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
Secuencias consenso	WebLogo	weblogo.berkeley.edu/
Análisis filogenéticos	RAxML	sco.h-its.org/exelixis/web/software/raxml/
Visualización de estructuras 3D	PyMol	pymol.org
Modelado estructuras 3D	Phyre2	www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2
Análisis de geles	QuantityOne	Bio-Rad

Análisis secuencia primaria de proteínas	ProtParam	expasy.ch
	SABLE	sable.cchmc.org
Análisis estructura secundaria de proteínas	Jpred	www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/
	PsiPred	bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred
	PredictProtein	predictprotein.org
Representación gráfica	SigmaPlot	SigmaPlot
Velocidad de Sedimentación	SEDFIT	analyticalultracentrifugation.com
	SEDNTERP	jphilo.mailway.com
Equilibrio de Sedimentación	HeteroAnalysis	biotech.uconn.edu/auf/?i=aufftp
Análisis CD	SpectraManager	Jasco
	Origin 6.0	Microcal
Deconvolución espectros CD	SELCON3/ CONTIN/ CDSSTR/ K2D	dichroweb.cryst.bbk.ac.uk

MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE ESTIRPES BACTERIANAS

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se crecieron en matraces o tubos con una capacidad de, al menos, cinco veces mayor que el volumen del cultivo y en condiciones de aireación con agitación a una velocidad de 180-220 rpm. En el caso del crecimiento en medio líquido de *S. agalactiae* y *E. faecalis* se usaron tubos con una capacidad de dos a cinco veces mayor que el volumen del cultivo y baños estáticos o con agitación (180-220 rpm). En medio sólido el crecimiento de los cultivos fue en superficie. Para los cultivos de *S. pneumoniae* se utilizaron condiciones microaerófilas de crecimiento y en medio líquido se utilizaron baños sin agitación y tubos cuya capacidad no sobrepasaba el doble del volumen del cultivo. Para el crecimiento de neumococos en placa, se mezclaron las células y los antibióticos correspondientes en una capa basal (20 ml) de medio AGCH suplementado con extracto de levadura (0.2%) y sacarosa o maltosa (0.3%), al cual se añadió agar al 1%. Esta capa se cubrió con 8 ml del mismo medio, 0.75% de agar y sin antibióticos. La temperatura de incubación para el crecimiento de todas las estirpes bacterianas fue de 37°C. El crecimiento en medio líquido se siguió midiendo la absorbancia de los cultivos a las longitudes de onda de 600 nm para *E. coli*, *S. agalactiae* y *E. faecalis*; y 650 nm para *S. pneumoniae*. Para ello, se empleó un espectrofotómetro Bausch & Lomb (Spectronic 20D+).

Para la conservación de estirpes, se crecieron los cultivos hasta una DO de 0.3-0.4, posteriormente se añadió glicerol a una concentración final del 10%, se mantuvieron a 37°C durante 10 min y después otros 10 min a 4°C. Finalmente, se congelaron a -80°C.

2. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

2.1. Preparación de células competentes

Las células electrocompetentes de *E. coli* se prepararon a partir de cultivos crecidos hasta la fase exponencial (DO = 0.5) con agitación fuerte de la estirpe de interés en medio SOC (Maniatis et al, 1982). Tras enfriar el cultivo en hielo, se centrifugó a baja velocidad (5.000 rpm) a 4°C y se lavó el pellet varias veces con agua fría estéril. Finalmente, las células se resuspendieron en glicerol al 10% y tras repartir en alícuotas de 50 µl, se congelaron a -80°C.

Las células electrocompetentes de *E. faecalis* y *S. agalactiae* se prepararon siguiendo métodos muy parecidos, basados en el descrito por Cruz-Rodz & Gilmore (Cruz-Rodz & Gilmore, 1990). Con *E. faecalis* se creció la cepa de interés en medio SG-ESTY (medio ESTY suplementado con 0.5 M de sacarosa y 6% de glicina ajustado a pH 6.8-7) hasta una DO = 0.5 sin agitación. Se centrifugó el cultivo a 6.000 rpm y 4°C y el pellet resultante se lavó tres veces con una solución fría (4°C) que contenía 0.5 M de sacarosa y 10% de glicerol (pH 7). En el caso de *S. agalactiae*, los cultivos se crecieron hasta una DO = 0.5 sin agitación, tras lo que se añadieron 0.5 M de sacarosa y 2.5% glicina y se incubaron 1 h más con agitación. Se recogieron las células por centrifugación a baja velocidad (4.000 rpm) y 4°C y el pellet de células se lavó tres veces con una solución fría (4°C) que contenía 0.5 M de sacarosa, 1 mM de MgCl₂, 7 mM de NaH₂PO₄ y 15% de glicerol (pH 7.4). Finalmente, se hicieron alícuotas de 40 µl y se congelaron a -80°C.

Las células competentes de *S. pneumoniae* se prepararon siguiendo el método descrito por Lacks (Lacks, 1966). Básicamente, se realizaron tres diluciones sucesivas del cultivo en medio fresco y tras alcanzar la fase exponencial (DO = 0.3), se añadió glicerol al 10% y se congeló a -80°C en alícuotas de 50 µl.

2.2. Transformación

2.2.1. Transformación por electroporación

Las células de *E. coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito (Dower et al, 1988). En el caso de la electroporación de células de *E. faecalis* y *S. agalactiae* se siguió el método optimizado de Cruz-Rodz & Gilmore (Cruz-Rodz & Gilmore, 1990). Para todas ellas, el DNA transformante estaba disuelto en agua ultrapura (Milli-Q) estéril y se mezcló con 50 µl de células competentes en una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada a 4°C. El pulso eléctrico se aplicó en un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad), con las siguientes condiciones: 25 µF, 2.5 kV/cm y 200 Ω. Los transformantes de *E. coli* se diluyeron en 0.8 ml de medio SOB suplementado con glucosa (0.4%) y se incubaron a 37°C en agitación (150 rpm) durante 1 hora. Para los transformantes de *S. agalactiae* o *E. faecalis* las células se recuperaron en medio TH o S-ESTY-MC (ESTY suplementado con 0.5 M sacarosa, 10 mM de MgCl₂ y 10 mM de CaCl₂ a pH 7), respectivamente. Las células se incubaron a 37°C sin agitación durante 2-3 horas. En todos los casos la selección de transformantes se realizó mediante siembra en placas TY-agar (*E.coli*), TH-agar (*S. agalactiae*) o SR (*E. faecalis*) y el antibiótico adecuado.

2.2.2. Transformación genética natural

Los plásmidos de interés fueron introducidos por transformación natural de células competentes de la estirpe 708 de *S. pneumoniae* (Espinosa et al, 1982). Básicamente, las células se diluyeron las células en medio AGCH suplementado con 70 μM CaCl_2 y 0.2% sacarosa, y se añadió posteriormente el DNA transformante. Tras un periodo de incorporación del DNA a 30°C (40 min), las transformaciones se incubaron a 37°C durante 90 minutos para permitir la expresión fenotípica, en condiciones de inducción dependiendo del marcador de selección empleado. El aislamiento de colonias transformantes se llevó a cabo mediante crecimiento en placa con selección correspondiente, tal como se describe en el Métodos 1.

3. PREPARACIONES DE DNA

3.1. Extractos crudos celulares

La preparación de extractos crudos celulares se utilizó para analizar el contenido en DNA total de las estirpes a estudio. Básicamente, se resuspendió el pellet celular (crecido hasta una DO = 0.4) en 100 μl de un tampón de lisis, cuya composición varió dependiendo de la especie bacteriana. Para *S. pneumoniae* se empleó el tampón LEP y para *S. agalactiae* y *E. faecalis* el tampón LEAF (Tabla 6), suplementado en todos los casos con RNasa I (0.25 mg/ml). Tras incubar 10 min a 24°C, se añadió SDS (1%) y se agitó la mezcla durante 3 min. A continuación, para romper el DNA cromosómico, se congeló (-80°C) y descongeló (37°C) cada tubo 3-5 veces. Finalmente, se añadió proteinasa K (0.25 mg/ml) e incubó 10 min a 24°C. Para el análisis de las muestras, se añadieron 50 μl de tampón CEC 3X a cada una y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa.

3.2. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de cultivos de *S. agalactiae* se usó el kit *DNeasy blood Tissue* (QIAGEN) siguiendo las especificaciones de la casa suministradora incluyendo algunas modificaciones que se describen a continuación. Tras el crecimiento y centrifugación del cultivo, las células se resuspendieron en una solución que incluía 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100 y 20 mg/ml de lisozima. Tras una incubación a 37°C durante una hora, se añadió el tampón de resuspensión (provisto por el kit) suplementado con 1 mg/ml proteinasa K y se incubó

a 70°C otras 3 horas. Una vez eluído el DNA, se añadió un paso extra de digestión de RNA por adición de 5 µg/ml de RNasa I e incubación de 30 minutos a 37°C.

3.3. Extracción de DNA plasmídico

La purificación de los plásmidos pMV158, pAS, pMVS y pMVSag para su uso en ensayos de *footprinting* o como sustratos en ensayos de actividad proteica, se llevó a cabo mediante dos gradientes sucesivos de CsCl/BrEt (del Solar et al, 1987). En general, el resto de preparaciones de plásmido se realizaron con el kit comercial (*High Pure plasmid isolation kit*, Roche), incluyendo algunas variaciones en los tampones para *S. pneumoniae* y *S. agalactiae*. El tampón de resuspensión del *pellet* celular se suplementó con 50 mM de glucosa y 0.1% de DOC para *S. pneumoniae*, o 50 mM de glucosa y 100 µg/ml de lisozima para *S. agalactiae*. El tampón de lisis en ambos casos incluía 0.170 M de NaOH y un 1% de SDS para la desnaturalización del DNA cromosómico. Con cultivos de *E. coli* también se usó para extraer DNA plasmídico el kit de Midipreparaciones de DNA plasmídico de Genomed.

3.4. Obtención de fragmentos de DNA de doble cadena

Los fragmentos de DNA empleados en este trabajo se obtuvieron a través de digestión con enzimas de restricción o amplificación por PCR. El kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) se usó para purificar el DNA resultante en ambos casos.

3.4.1. Digestión con enzimas de restricción

La digestión enzimática del DNA se realizó utilizando las soluciones y condiciones de reacción recomendadas por la casa suministradora. Siempre que fue posible se hicieron las digestiones dobles con enzimas cuyo tampón y temperatura de reacción era compatible, suplementando con BSA (10 µg/ml) en el caso de que alguna de ellas lo requiriera. En general, los tiempos de digestión no excedieron las tres horas y se inactivó la enzima mediante desnaturalización térmica (10 min a 65°C).

3.4.2. Amplificación en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

En todas las amplificaciones se utilizó un termociclador iCycler (Bio-Rad). La enzima *Taq DNA polymerase* (Invitrogen) fue usada para el análisis de transformantes por PCR de colonias de *E. coli*, *S. agalactiae*, *E. faecalis* y *S. pneumoniae*. El método consiste en resuspender una colonia bacteriana en 100 µl de medio de cultivo, seguido de una dilución 1/10 en agua a partir de este cultivo, donde 1 µl de esta mezcla se usa como molde en la reacción de PCR. Cada reacción de 25 µl contenía: 20 mM Tris-HCl,

pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 pmol de cada cebador, 200 μM de cada dNTP y 1 U de polimerasa *Taq*. La enzima *Phusion High-Fidelity DNA polymerase* (Finnzymes) fue usada para el resto de las reacciones de amplificación. En este caso, la composición por reacción (50-100 μl) contenía: tampón de reacción 1X (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂), 0.2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada cebador, 0.65 U de polimerasa *Phusion* y DNA molde (1-50 ng). Las condiciones de temperatura con ambas enzimas fueron las siguientes: un paso inicial a 94-98°C durante 30 s, seguido por 30-35 ciclos de 10s a 94-98°C, 20-60s a 50-68°C y 30s a 72°C. Por último se añadió una extensión de 10 min a 72°C.

3.5. Ligación de DNA

La ligación de fragmentos DNA se llevó a cabo en mezclas de reacciones diluidas (para recircularizar la misma molécula) o concentradas (para ligar dos moléculas diferentes). En general, la relación molar entre vector e inserto fue entre 1:5 y 1:10. Las condiciones de reacción fueron las recomendadas por la casa suministradora, incubando las mezclas con 400 U de ligasa del fago T4 (New England Biolabs) a 16°C durante 15 horas (extremos romos) o 22°C durante 2 horas (extremos cohesivos).

3.6. Construcción de plásmidos recombinantes

La integridad del DNA de todas las construcciones plasmídicas se confirmaron mediante secuenciación, a través del servicio de secuenciación automática del CIB (*Secugen S.L.*).

3.6.1. Vectores de expresión de la proteína MobM y sus variantes

El vector pQE-1 fue usado para el clonaje y producción de la versión con colas de histidinas en el extremo N-terminal de MobMN199 (His-MobMN199). Para ello, se amplificó la región de 608 pb delimitada por los oligonucleótidos pQE-Mob y pQE-N199 (Tabla 5) del plásmido pMV158. El fragmento de DNA resultante se clonó en el vector pQE-1 previamente digerido con *PvuII* en *E. coli* M15/pREP4 para obtener el plásmido pHis-MobMN199 (Tabla 4). Para la producción de mutantes puntuales de la proteína His-MobMN199 (en las posiciones H22, R25, Y44 y E129) se usaron los oligonucleótidos detallados en la Tabla 5 y el kit *GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System* (Fisher Thermo Scientific) siguiendo las condiciones recomendadas por el mismo.

La expresión de MobMN243, una versión truncada de MobM con los primeros 243 aminoácidos desde el extremo N-terminal, se llevó a cabo tras la conversión del codón P244 (CCG) del gen *mobM* en un codón STOP (TAG, ámbar) (Fernández-López et al, 2013b). Concretamente, se amplificó la región delimitada por los oligonucleótidos NdeI-F y P244-stop-XhoI (Tabla 5) (768 pb) del plásmido pMV158 y se digirió el producto obtenido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. El DNA resultante se ligó con el vector pET-24 previamente digerido con las mismas enzimas, y el producto se transformó el *E. coli* BL21(DE3) obteniendo así el plásmido recombinante pMobMN243 (Tabla 4).

Por otro lado, la construcción de plásmidos derivados de pMV158 que contienen mutaciones puntuales en el gen *mobM* se llevaron a cabo mediante una estrategia de PCR. Se usaron como moldes el plásmido pMV158 y dos plásmidos que contenían las proteínas His-MobMN199 ya mutadas (pHisMobMN199(H22A) o pHisMobMN199(Y44F)). Los plásmidos recombinantes pMV158H22A y pMV158Y44F (Tabla 4) se recuperaron en *S. pneumoniae* 708 (Tabla 2) para su uso en ensayos de transferencia conjugativa.

3.6.2. Vector de expresión de la proteína MobSag

Para clonar el gen *mobSag* en el vector de expresión pET-24b (Tabla 4), se llevó a cabo una estrategia de PCR anidada (del inglés *nested PCR*) que favorece la sensibilidad y especificidad de la amplificación (Newton & Graham, 1994). La primera amplificación se realizó con la pareja de oligonucleótidos Sag2 (Tabla 5) y el DNA genómico de *S. agalactiae* HRC (Tabla 2). Usando como molde el fragmento obtenido (1602 pb), se realizó una segunda amplificación de la región de 1386 pb delimitada por los oligonucleótidos Sag1 (Tabla 5). El producto resultante se digirió con las enzimas *AvaI* y *NheI*, mientras que el vector pET-24b se linearizó con *XhoI* y *NheI*. La estirpe *E. coli* BL21 (DE3) fue transformada con el DNA resultante de la ligación de ambos DNAs, obteniendo el plásmido pMobSag (Tabla 4).

3.6.3. Plásmidos derivados de pMV158

3.6.3.1. pMVS y pMVSag

Para el estudio de la actividad relaxasa de la proteína MobSag se construyó un plásmido derivado de pMV158 en los que se sustituyó el módulo de movilización de pMV158 (*oriT_{pMV158}*, *mobM* y *ssmA*) por el correspondiente cromosómico de *IME_{rpsI}* (*oriT_{IME_{rpsI}}*, *mobSag* y *ssmA*).

Los oligonucleótidos INV-F e INV-R (Tabla 5) se fosforilaron con la polinucleótidoquinasa T4 (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones de la casa suministradora. Posteriormente se amplificó mediante PCR inversa (Ochman et al, 1988) la región delimitada por ellos, empleando DNA del plásmido pMV158 como molde. El producto de amplificación de 3687 pb (de extremos romos y con una nueva diana *Stul*) fue recircularizado con la ayuda de la T4 DNA ligasa y recuperado por transformación en *S. pneumoniae* 708, resultando el vector que se denominó pMVS (Tabla 4). Por otra parte, a partir del DNA genómico de *S. agalactiae* HRC (Tabla 2) se realizó una amplificación por PCR con la pareja de oligonucleótidos fosforilados Sag2 (Tabla 5). El fragmento obtenido de 1602 pb y extremos romos (el cual incluye el *oriT_{IMErpsI}*, el gen *mobSag* y el *ssmA* de *IMErpsI*) se clonó en la diana *Stul* del vector pMVS. A continuación, se utilizó la mezcla de ligación para transformar *S. pneumoniae* 708. Tras la selección de recombinantes se obtuvo un nuevo plásmido, pMVSag, en el que el casete MOB se encuentra en la dirección equivalente a la de pMV158 (véase Tabla 4).

3.6.3.2. pMVT y pMVT-*PfcsK*

Para el análisis de la unión de MobM al sitio secundario se construyó un derivado de pMV158 que carecía de sitio de unión primario (*oriT_{pMV158}*) y promotor *Pmob2* y en el que el gen *mobM* estaba bajo el control del promotor inducible por fucosa *PfcsK* de neumococos.

La estrategia de clonaje planteada se encuentra resumida en la Figura 14. A partir del plásmido pMV158 se realizó una amplificación con los oligonucleótidos 4Sacl y C2/3 (Tabla 5), obteniendo un producto de 5420 pb. Por otra parte, se usaron los oligonucleótidos 1Sacl y 2/C3 (Tabla 5) para amplificar dos fragmentos distintos: i) uno de 290 pb que incluía dos terminadores transcripcionales en tándem (*T1T2*) del operón *rrnB* de *E. coli* (Brosius et al, 1981), usando como molde el plásmido pAST (Ruiz-Cruz et al, 2010) y ii) otro de 407 pb que incluía los dos terminadores transcripcionales antes mencionados (*T1T2*) y el promotor inducible por fucosa *PfcsK* (Chan et al, 2003), usando como molde el plásmido pAST-*PfcsK* (Ruiz-Cruz et al, 2010). Los cebadores C2/3 y 2/C3 son parcialmente complementarios, por lo que a través de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos 1Sacl y 4Sacl (Tabla 5) y una mezcla de moldes entre el fragmento de 5420 pb derivado de pMV158, y el fragmento de 290 pb (terminadores *T1T2*), se obtuvo un producto final de 5670 pb. Este fragmento se digirió con la enzima *Sacl* y se recircularizó para construir el plásmido pMVT. Siguiendo la misma estrategia y oligonucleótidos se amplificó una mezcla entre el

fragmento de 5420 pb derivado de pMV158 y el de 407 pb (terminadores *T1T2* y promotor *PfcsK*), obteniendo un producto final de 5787 pb. Tras su digestión con *SacI* y autoligación se obtuvo el plásmido pMVT-*PfcsK* (Tabla 4).

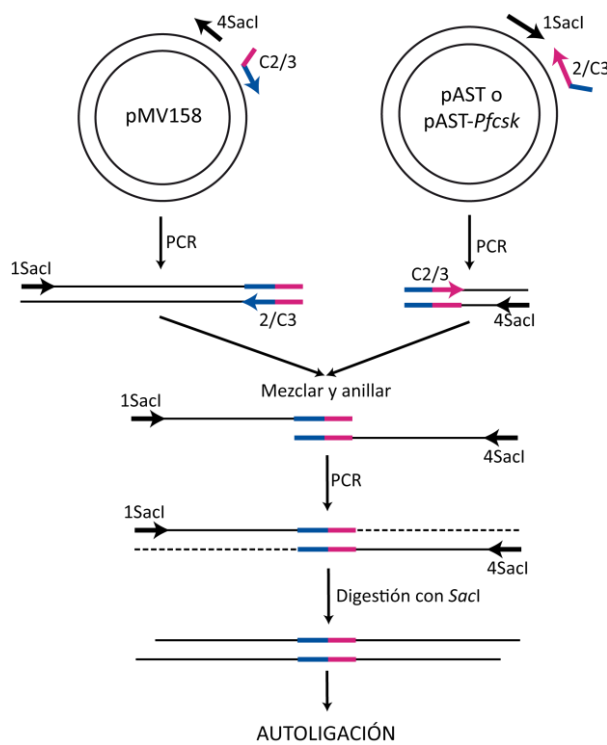


Figura 14. Estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pMVT y pMVT-*PfcsK*. Los oligonucleótidos 4Sacl y C2/3 (Tabla 5) se usaron para amplificar un fragmento de 5420 pb del plásmido pMV158 (excluyendo la región del origen de transferencia (*oriT_{pMV158}*) y promotor 2 de *mobM* (*Pmob2*)). Por otra parte, se utilizó el par de oligonucleótidos 1Sacl y 2/C3 (Tabla 5) para amplificar dos fragmentos distintos dependiendo del molde: con pAST se obtuvo un fragmento de 290 pb (incluye los terminadores transcripcionales *T1T2*); mientras que con pAST-*PfcsK* se obtuvo un fragmento de 407 pb (incluye los terminadores transcripcionales *T1T2* y el promotor inducible por fucosa *PfcsK*). Se llevó a cabo una segunda PCR con una mezcla añalada del DNA obtenido a partir de pMV158 y pAST. El producto obtenido se digirió con *SacI* y se autoligó, obteniendo el plásmido pMVT (5670 pb). Se repitió el mismo proceso con los DNAs de pMV158 y pAST-*PfcsK*, obteniendo así el plásmido pMVT-*PfcsK* (5787 pb).

3.6.4. Fusiones transcripcionales de *lacZ* con el promotor *PctII*

El efecto de MobM sobre el promotor del *rnall* (*PctII*) se analizó a través de ensayos de β -galactosidasa con una construcción que contenía la fusión transcripcional entre *PctII* y el gen *lacZ*. Usando como molde DNA del plásmido pMV158 y los oligonucleótidos RNAII-F y RNAII-R (Tabla 5), se amplificó un fragmento de 109 pb que contenía la secuencia del promotor *PctII*. Este fragmento se digirió con las enzimas *EcoRI* y *PstI* y se ligó con el plásmido pMP220 (Tabla 4) previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante, denominado pRNAII (Tabla 4), se transformó en las estirpes: i) *E. coli* JM109(DE3) portadora del vector compatible de expresión de *mobM*, pLGM2 (Tabla 4) y ii) *E. coli* JM109(DE3) portadora del plásmido pET-5 (Tabla 4). Como control y siguiendo la misma estrategia, se construyó otro plásmido denominado p Δ ORI (Tabla 4) que contiene el gen *lacZ* fusionado transcripcionalmente con el promotor *Pmob2* de *mobM*. Para ello, primero se amplificó un fragmento de 106 bp del plásmido pMV158 usando los cebadores Δ ORI-F y Δ ORI-R (Tabla 4). Tras la digestión con las enzimas *EcoRI* y *PstI* de este fragmento y del

plásmido pMP220, ambos productos se ligaron. La mezcla de ligación se transformó en las mismas estirpes de *E. coli* usadas para el plásmido pRNAII (ver más arriba).

4. ANÁLISIS DE DNA

4.1. Cuantificación

La concentración y calidad de las muestras de DNA se analizó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop), midiendo el espectro de absorción de las soluciones entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm. Se estimó que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 o 33 µg/ml para dsDNA o ssDNA, respectivamente. En algunos casos, la cuantificación de dsDNA lineal o circular se determinó por densitometría mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt (1 µg/ml) o GelRed 1X, comparando las intensidades de la(s) banda(s) de DNA de interés y un patrón de fragmentos de DNA de concentración y peso molecular conocido (patrón comercial *HyperLadder I*, Bionline). Las medidas de la concentración de DNA genómico empleado para secuenciación masiva se realizaron con el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

4.2. Electroforesis

4.2.1. Geles de agarosa

La separación de DNA plasmídico, cromosómico o lineal se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Previa aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en los tampones de carga BXGE o SBE (Tabla 6). La concentración de agarosa (entre 0.8% y 1.5%), el tampón de electroforesis (TAE o TBE), la duración de carrera, el voltaje aplicado y la longitud del gel, dependieron del tipo y tamaño del DNA a analizar. Para la tinción del DNA se sumergieron los geles en BrEt (1 µg/ml) o GelRed 1X durante 30 min a temperatura ambiente. Alternativamente y dependiendo del ensayo, la tinción se realizó incluyendo BrEt en el gel y en el tampón de carrera. El DNA se visualizó con luz ultravioleta larga (360 nm) para geles analíticos o corta (260 nm) para geles preparativos en un transiluminador GelDoc XR (Bio-Rad). La imagen resultante se analizó con el software QuantityOne (Bio-Rad).

4.2.2. Geles de poliacrilamida (PAA)

4.2.2.1. Geles PAA nativos (EMSA)

La electroforesis de fragmentos de DNA en geles nativos de PAA se realizó en geles verticales con el sistema Mini Protean III (Bio-Rad). Normalmente, la concentración de PAA fue de 10% en tampón TBE 1X. Las muestras se mezclaron con tampón de carga BXGE y se aplicaron en el gel al que se aplicó un voltaje de 100 V. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron y visualizaron como se indica en Métodos 4.2.1.

4.2.2.2. Geles PAA desnaturalizantes

La visualización de los oligonucleótidos productos de reacción en los ensayos de actividad de corte de MobM sobre ssDNA se analizaron en minigeles de PAA al 20%, con 7 M de urea, empleando cubetas Mini Protean III (Bio-Rad). Por otra parte, tanto los productos de secuenciación como las reacciones de extensión del cebador se resolvieron mediante electroforesis en geles de PAA al 8% con 7 M de urea. Las cubetas empleadas tenían unas dimensiones de 15 x 40 cm (gel 0.35 mm de espesor). Las condiciones de carrera fueron: vataje constante de 50-60 W, 120-150 min de duración y a una temperatura de 50°C. En todos los casos se llevó a cabo una precarrera durante 30 min (hasta que la temperatura del sistema alcanzó aproximadamente 50°C) en las mismas condiciones de carrera. Las muestras se mezclaron con un volumen de colorante de carga BXF 1X (Tabla 6), se calentaron a 85°C durante 5 min y se mantuvieron en mezcla de agua y hielo (~0°C) hasta el momento de la carga en el gel. Se empleó TBE como tampón de electroforesis (Tabla 6). Dependiendo del marcaje del DNA, las bandas se visualizaron mediante el sistema *Fujifilm Image Analyzer FLA-3000* (Phosphorimager, Fuji) o según se indica en Métodos 4.2.1.

4.3. Marcaje radiactivo de DNA

El DNA marcado radiactivamente fue visualizado mediante el equipo *Fujifilm Image Analyzer FLA-3000* (Phosphorimager, Fuji). La intensidad de las bandas de DNA marcado fue cuantificada usando el software Quantity One (Bio-Rad).

4.3.1. Marcaje en el extremo 5'

El uso de oligonucleótidos marcados radiactivamente en 5' se usó para los ensayos de *primer extension*, *footprinting*, o secuenciación manual de DNA. Los

oligonucleótidos se marcaron en el extremo 5' utilizando [γ - ^{32}P]-ATP. Se siguió el método descrito (Maniatis et al, 1982), utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs). Cada reacción de marcaje (25 μl) contenía el tampón proporcionado por el fabricante, 50 pmoles de oligonucleótido, 50-90 pmoles de [γ - ^{32}P]-ATP (3,000 Ci/mmol; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y 10 U de kinasa. Tras una primera incubación a 37°C durante 30 min se añadieron otras 10 U de kinasa y se incubó a 37°C durante 30 min adicionales. Finalmente, la enzima fue inactivada mediante una incubación a 65°C durante 20 min. El nucleótido radiactivo no incorporado se eliminó por cromatografía de filtración, empleando las columnas Microspin-G25 (GE Healthcare).

4.3.2. Marcaje interno

Para la secuenciación manual del DNA del fago M13, se emplearon oligonucleótidos no marcados y se incorporó el isótopo radiactivo [α - ^{32}P]-dCTP (400 Ci/mmol) durante la amplificación por PCR (ver apartado siguiente). La actividad específica de los fragmentos obtenidos dependió del %GC del DNA amplificado y de la relación empleada entre nucleótido dCTP radiactivo y no radiactivo.

4.4. Secuenciación de DNA

4.4.1. Secuenciación manual

Para la secuenciación manual del DNA se siguió el método de terminación de cadena (Sanger et al, 1977) con el kit comercial *Sequenase v2.0 DNA Sequencing kit* (USB-Affimetrix).

En la secuenciación de DNA del fago M13, se usó como DNA molde 1 μg de DNA que se anilló con 0.5 pmol de cebador sin marcar (provisto por el kit). Para ello, la reacción se incubó a 65°C durante 5 minutos, tras lo que se dejó enfriar lentamente hasta aproximadamente 37°C. En la reacción de secuenciación se incluyeron: DNA-cebador previamente anillado, el isótopo radiactivo [α - ^{32}P]-dCTP (ver apartado anterior), 5 mM DTT, una mezcla que incluía 7.5 μM de cada uno de los dNTPs (G, A y T) y 3.2 U de DNA polimerasa Sequenasa. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 4 min. Inmediatamente, se repartió la mezcla entre cuatro tubos que contenían los dideoxinucleótidos (ddNTPs) de A, G, C y T, y se incubaron a 37°C durante 5 min. A continuación, las reacciones de secuencia fueron procesadas como se indica en la sección 4.2.2.2 de este capítulo para el análisis en geles de PAA.

Para las reacciones de secuencia de ensayos de *footprinting*, como DNA molde se utilizó 1 μg de DNA plasmídico desnaturalizado por álcali y se anilló (tal como se indica en el párrafo anterior) con 1.5 pmol de un cebador marcado radiactivamente en

el extremo 5' con [γ -³²P]-ATP (ver Métodos 4.3.1.). Las reacciones de secuenciación se trataron como en el caso anterior, excepto que el mix de dNTPs utilizado fue el provisto por el kit (que incluía dGTP, dCTP, dTTP).

4.4.2. Secuenciación automática

La composición nucleotídica de los DNAs obtenidos a través de manipulación genética se confirmó mediante el sistema BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies) en el servicio de secuenciación automática del CIB (*Secugen S.L.*).

4.4.3. Secuenciación masiva

La secuenciación del genoma del aislado clínico *S. agalactiae* HRC se llevó a cabo con la tecnología *Ion Torrent* (Thermo Fisher Scientific, Inc.) en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (Universidad de La Laguna). La construcción de la librería de DNA se llevó a cabo de manera automática en el sistema *AB Library Builder* (Applied Biosystems), partiendo de 500 ng de DNA genómico y empleando el kit *Xpress Plus Library Kit* (Life Technologies). La concentración y distribución de fragmentos de la librerías de secuenciación cual se evaluó mediante electroforesis capilar posteriormente en un el sistema *Bioanalyzer 2100* con un chip de alta sensibilidad (Agilent Technologies). La muestra se diluyó (26 pM) y se sometió a una amplificación mediante PCR en emulsión y a un posterior enriquecimiento utilizando el sistema *One Touch* (Ion OneTouch 200 kit v2DL). La muestra enriquecida se cargó en un chip Ion 314 y se sometió a secuenciación en la plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine* con la química de secuenciación para lecturas de 200 pb. Un total de 121 Mb fueron secuenciados en 686.800 lecturas (media de longitud de lecturas de 177 pb). La plataforma web IonGAP (Tabla 7) se utilizó para realizar el análisis de los datos. Usando la clasificación bacteriana MLST (*Multilocus Sequence Typing*) y 16S rRNA, se determinó que el aislado HRC pertenece al complejo clonal (CC) 1 y Sequence Type (ST) 1. Se realizó un análisis comparativo de las secuencias obtenidas usando como genoma de referencia el de la estirpe secuenciada ST1 más cercana (*S. agalactiae* SS1, *GenBank* CP010867.1); encontrándose entre ellas un total de 78 SNPs (12% sinónimos y 19% no sinónimos). Las secuencias de DNA genómico de HRC obtenidas fueron depositadas en el SRA (*Sequence Read Archive*) con el siguiente código: SRX1089584.

5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

5.1. Extracción de RNA total

Para aislar RNA total de *S. pneumoniae* 708 se usó el kit RNeasy Mini kit (QIAGEN) siguiendo en las indicaciones de la casa suministradora con las variaciones que se describen a continuación. Para la lisis celular, los cultivos crecidos a una DO de 0.4 se concentraron 20 veces en tampón LSR (Tabla 6) y se incubaron a 37°C durante 5-10 min. Tras la elución de las muestras, se incluyó un paso adicional de digestión con DNasa I (*recombinant RNase free*, Roche) durante 20 minutos a 37°C para eliminar posibles trazas de DNA en las muestras. Tras este tratamiento las muestras fueron limpiadas con un segundo paso de purificación usando las columnas del kit. La integridad del RNA obtenido fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y la concentración de RNA fue determinada usando un espectofotómetro NanoDrop ND-2000. Para la conservación de las muestras se repartieron en alícuotas y congelaron a -80°C.

5.2. Retrotranscripción por extensión de cebador (o *primer extension*)

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron usando como sustrato RNA total aislado tal como se indica en el apartado anterior. La retrotranscripción se realizó usando el sistema *ThermoScript™ RT-PCR* de Invitrogen. En concreto, se emplearon 2-15 µg de RNA total, 1-2 pmoles del cebador marcado en 5' con ³²P, 100 µM de cada dNTP y 15 U de la transcriptasa reversa ThermoScript. Antes de la adición de la enzima, el RNA y el cebador se desnaturalizaron durante 5 min a 65°C y se dejó enfriar la mezcla lentamente para su anillamiento. La reacción de síntesis de cDNA se llevó a cabo a una temperatura de 58°C durante 60 min. La reacción se terminó incubando 5 min a 85°C. Tras precipitar y disolver en tampón BXF (Tabla 6), las muestras se analizaron muestras en geles PAA desnaturalizantes como se indica en el apartado 4.2.2.2. Para estimar la longitud del oligonucleótido extendido, se utilizaron reacciones de secuencia obtenidas por el método Sanger como referencia, utilizando el oligonucleótido indicado en cada experimento como cebador. Las bandas de DNA radiactivo se visualizaron mediante *Fujifilm Image Analyzer FLA-3000* (Phosphorimager, Fuji) y fueron cuantificadas con ayuda del software QuantityOne (Bio-Rad).

6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para reproducir MobM y MobMN199 se usaron dos vectores construidos previamente en el laboratorio (Guzmán & Espinosa, 1997; Lorenzo-Díaz et al, 2011). En el caso de MobMN243 y MobSag se partió del vector de expresión pET-24b de Novagen. En este vector, el gen clonado se expresa bajo el control del promotor $\Phi 10$ del fago T7 en la estirpe *E. coli* BL21(DE3) (Tabla 2). Esta estirpe contiene una copia cromosómica del gen *lacI* y del gen que codifica la RNAP de T7, el cual, a su vez, está bajo el control del promotor *lacUV5*. En ausencia de IPTG, el represor LacI se une a la región operadora del promotor *lacUV5* y reprime la transcripción del gen *T7-RNAP* (gen 10 del fago T7). En presencia de IPTG, *lacI* está inactivo, por lo que se inicia la síntesis de T7-RNAP, la cual reconoce exclusivamente al promotor $\Phi 10$ del T7, transcribiendo el gen de interés (Studier & Moffatt, 1986).

Para la proteína MobM199 con cola de Histidinas en el extremo amino terminal (His-MobMN99) y los mutantes puntuales, se usó la estirpe de *E. coli* M15/pREP4 (Tabla 2) y el vector pQE-1 (Tabla 4).

6.1. Purificación de MobM, MobMN199, MobMN243 y MobSag

Tanto *mobM*, *mobMN243* y *mobMN199*, como *mobSag*, se encuentran clonados en vectores del sistema pET (Novagen) en la estirpe *E. coli* BL21(DE3) (Tabla 2). Dada la convergencia en el sistema de expresión y la homología entre las proteínas, se decidió usar para su expresión y purificación el protocolo optimizado para MobM (Guzmán & Espinosa, 1997) con algunas modificaciones. Básicamente, se crecieron cultivos (1-4 litros) a 37°C con fuerte agitación hasta que se alcanzó una DO = 0.5 y se indujo la expresión del gen por la adición de 1 mM de IPTG. Tras 30 min de incubación, en las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió rifampicina (200 µg/ml) para inhibir la síntesis de la RNAP de *E. coli* y se prolongó la incubación 90 min más. Se recogieron las células por centrifugación y el sedimento celular se concentró 100 veces mediante resuspensión en tampón A (Tabla 6) con 1 M de NaCl, suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (*Complete*, Roche). La lisis celular se llevó a cabo pasando la suspensión dos veces por una prensa *French* a una presión de 8.3 MPa y se eliminaron los restos celulares por centrifugación. Para precipitar los ácidos nucleicos, se incubó el sobrenadante con PEI al 0.2% (v/v) durante 30 min a 4°C y agitación continua. Posteriormente, se centrifugó y se precipitó el sobrenadante (donde se encuentra la fracción proteica) con sulfato amónico a un 70% de saturación, manteniendo una temperatura de 0°C y agitación continua durante 1 hora. El sedimento de proteínas se disolvió en 40 ml de tampón A con 300 mM NaCl.

A continuación, las muestras se aplicaron en una columna de 20 ml de heparina-agarosa (*HiPrep FF*, GE Healthcare), equilibrada previamente con el mismo tampón, a un flujo de 50 ml/hora en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC; BioLogic DuoFlow, Bio-Rad). Tras lavar con 5 volúmenes de columna, las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de 300 a 800 mM de NaCl (400 ml de volumen total). Se recogieron fracciones de 4 ml y su contenido se analizó mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían la proteína de interés se juntaron y dializaron frente 3 l de tampón A con 500 mM de NaCl. Posteriormente se concentró la muestra y se purificó mediante una etapa de cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna *HiLoad Superdex 200* (120 ml, 16 x 600 mm; GE Healthcare) previamente equilibrada en el mismo tampón. Se aplicó un flujo de 0.5 ml/min con tampón A 500 mM NaCl y se monitorizó la señal de absorbancia de luz UV a 260 y 280 nm, recogiendo fracciones de 2 ml. Las muestras se volvieron a analizar en SDS-PAGE, juntando las fracciones centrales del pico de elución. La solución de proteína pura se concentró a través de filtros Vivaspín-20 (GE Healthcare) con un tamaño medio de poro de 3 kDa. Por último, el extracto concentrado se repartió en alícuotas y se congelaron a -80°C para su conservación. En todos los casos, se obtuvo un grado de pureza superior al 90% y las proteínas se mantuvieron activas al menos un año en estas condiciones.

6.2. Purificación de His-MobMN199 y mutantes

En este caso se crecieron las células en 500 ml de medio a 37°C, con fuerte agitación, hasta alcanzar una DO = 0.5. La inducción de la expresión de proteína y el procesamiento hasta romper las células en la prensa French, fue exactamente igual a como se describe en el punto anterior, salvo que se utilizó tanto un tampón sin EDTA (tampón His; Tabla 6) como un cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA (*Complete sin EDTA*, Roche). Tras recoger el sobrenadante y añadir imidazol a una concentración final de 10 mM, se aplicó la muestra en una columna con 5 ml de resina de Níquel (*HisTrap FF*, GE Healthcare), a un flujo de 30 ml/hora. La columna se lavó con 20 volúmenes de tampón His suplementado con imidazol (10 mM) y la proteína adsorbida se eluyó con 5 volúmenes del mismo tampón en el que se aumentó la concentración de imidazol hasta 250 mM. Tras el análisis mediante electroforesis, las fracciones centrales se dializaron frente a tampón A con 300 mM NaCl. Tras analizar las muestras en SDS-PAGE y juntar las fracciones centrales del pico de elución, éstas se concentraron a través de filtros Vivaspín-20 (GE Healthcare) (tamaño de poro de 3

kDa). Por último, el extracto proteico concentrado se repartió en alícuotas y se congelaron a -80°C para su conservación.

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1. Cuantificación proteica

La secuencia específica de las proteínas en estudio permitió calcular su peso molecular teórico (Da) y coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) usando el programa ProtParam (Tabla 7). Con esta información, la concentración de proteína pura en solución se determinó midiendo en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 o Spectronic 1201 (Milton Roy).

7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAA)

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles discontinuos desnaturizantes de PAA con SDS (SDS-PAGE). El gel concentrador se preparó con PAA al 4% en 0.375 M de Tris-HCl pH 6.8 y 0.1% de SDS. El gel separador se preparó con una concentración de PAA de entre un 10-12% en 0.375 M de Tris-HCl pH 8.8 y 0.1% de SDS. En ambos casos se usaron TEMED y PSA como catalizadores de la polimerización. Los geles se montaron en cubetas Mini-Protean III (Bio-Rad). Antes de la aplicación, las muestras se disolvieron en tampón de carga SLB (Tabla 6) y se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 3 min. La electroforesis se realizó en tampón TG (Tabla 6). Tras la aplicación de las muestras, se inició la electroforesis con un voltaje constante de 80 V hasta que las muestras entraron en el gel separador y luego continuó con un voltaje de 180 V durante un tiempo que dependía del peso molecular de la/s proteína/s a analizar. Salvo que se indique lo contrario, la tinción de estos geles se realizó con Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad).

7.3. Secuenciación del extremo amino-terminal (NH_2)

Las secuencias amino-terminales de proteínas se determinaron mediante degradación secuencial de Edman en un secuenciador Procise 494 (Perkin Elmer), en el servicio de Química de Proteínas del CIB. Para ello, las muestras proteicas se separaron en geles SDS-PAGE junto con un marcador de proteínas preteñido (*SeeBlue Plus 2*). Posteriormente se transfirieron a membranas PVDF mediante el sistema Mini Trans-Blot de Bio-Rad y la membrana se tiñó con una solución fresca de Coomasie. Tras desteñir y lavar con agua destilada, la membrana se secó a

temperatura ambiente para recortar la banda de interés, desde la que se realizó directamente el análisis.

7.4. Análisis de masas moleculares por espectrometría de masas

Para el análisis de masa molecular exacta de MobMN243 se usó el espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) del servicio de proteómica del CIB, equipado con un láser de haz fino. Previo a su análisis, las muestras de proteína se dializaron en tampón MS (Tabla 6).

El análisis de masa molecular de MobMN243 y sus productos de degradación se realizó usando un espectrómetro de masas de Thermo Scientific denominado LTQ-FT Ultra (que contiene un *Linear Ion Trap* combinado con un *Fourier Transform Ion Cyclotron*). Este equipo se encuentra acoplado a una fuente de nanoflujo ESI (*ElectroSpray Ionisation*). Estos ensayos se realizaron en el servicio de espectrometría de masas del *Institute for Research in Biomedicine* (IRB-Barcelona), en colaboración con el grupo del Prof. Miquel Coll, perteneciente al mismo instituto. Las muestras a estudio se dializaron en tampón ESI-MS (Tabla 4) antes de su análisis.

7.5. Ultracentrifugación Analítica

Esta técnica se llevó a cabo en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares del CIB, y permitió la determinación de la masa molecular de MobMN243 y de sus propiedades hidrodinámicas. Los experimentos se realizaron con muestras de proteína a distintas concentraciones en tampón UA (Tabla 6), usando una ultracentrífuga analítica modelo XL-I (Beckman-Coulter), equipada con un sistema óptico de detección UV-VIS y un rotor An50Ti. Las medidas de absorbancia fueron tomadas a una apropiada longitud de onda entre 229 y 296 nm.

7.5.1. Velocidad de sedimentación

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 48000 rpm y 20°C, con muestras de 400 μ l a distintas concentraciones proteicas. En estas condiciones se desprecia la fuerza de difusión y se pudo estimar el coeficiente de sedimentación de la proteína a analizar usando el programa SEDFIT v12.1 (Schuck & Rossmanith, 2000) y aplicando un modelo de mínimos cuadrados basado en el método de la distribución del coeficiente de sedimentación. El coeficiente de sedimentación se corrigió para condiciones estándar usando el programa SEDNTERP (Laue et al, 1992), con lo que se obtuvo el correspondiente valor de $S_{20.w}$. El valor del

coeficiente de fricción traslacional de proteína (f) se determinó a partir de la masa molecular y del coeficiente de sedimentación de la proteína (van Holde, 1985), mientras que el coeficiente de fricción de la esfera hidratada equivalente (f_0) se estimó usando una hidratación de 0.4507 g de agua/g de proteína para MobMN243. Con estos valores se pudo calcular la relación de fricción traslacional (f/f_0), que proporcionó una estimación sobre la forma hidrodinámica de la proteína.

7.5.2. Equilibrio de sedimentación

Los experimentos de equilibrio de sedimentación fueron hechos a dos velocidades sucesivas (20000 y 35000 rpm) y una temperatura de 20°C. En todos los casos las señales basales fueron medidas tras una centrifugación a alta velocidad (43000 rpm). El volumen de las muestras a distintas concentraciones fue de 80 μ l. En estas condiciones de ensayo, las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión tienden a igualarse (condición de equilibrio), de forma que las especies macromoleculares se distribuyen formando un gradiente de concentración que se caracteriza porque es independiente de las propiedades hidrodinámicas (forma) de las macromoléculas y depende únicamente de la masa molecular de la especie que sedimenta. Las lecturas de absorbancia se realizaron a la longitud de onda más apropiada (280, 281 o 290 nm). El cálculo de la masa molecular aparente ($M_{w,a}$) de MobMN243 se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales usando el programa HeteroAnalysis v1.1.44 (Cole, 2004). El volumen específico parcial de MobMN243 fue de 0.73 ml/g. Este valor se calculó con el programa SEDNTERP (Laue et al, 1992) partiendo de la composición aminoacídica de cada proteína.

7.6. Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel separa las moléculas en función de su forma/tamaño (radio de Stokes), por lo que además de su uso en el proceso de purificación proteica también se usó a la hora de estimar el tamaño molecular de las proteínas MobM y MobSag (Siegel & Monty, 1966). Para este fin se usó el mismo equipo de cromatografía y columna de filtración descritos en el la purificación proteica (Métodos 6.1). La columna fue pre-calibrada mediante la carga de un set de proteínas estándar cuyo radio de Stokes (tamaño molecular) era conocido: ferritina (F; 61 Å), alcohol deshidrogenasa (ADH; 45 Å), ovoalbúmina (O; 30.5 Å) y anhidrasa carbónica (CA; 20.1 Å). Estas proteínas estándar se prepararon a las siguientes concentraciones: 0.3 mg/ml (F), 5 mg/ml (ADH), 4 mg/ml (O) y 3 mg/ml (CA). Por otra parte, las proteínas MobM y MobSag purificadas se prepararon a una concentración

final de 3 mg/ml (1 ml) y se eluyeron en las mismas condiciones que los estándares; es decir, con tampón A (Tabla 6) suplementado con 500 mM de NaCl, 4°C y un flujo isocrático de 0.5 ml/min. Los volúmenes de elución se monitorizaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm y el valor del coeficiente de partición o de distribución (K_{av}) de cada proteína (relacionado con el peso/tamaño molecular) se calculó con la siguiente fórmula:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

donde V_e es el volumen de elución, V_0 es el volumen de exclusión (determinado mediante la elución del azul de dextrano) y V_t es el volumen total del lecho de la columna.

A partir de los valores del radio de Stokes y K_{av} de las proteínas estándar, se construyó una recta patrón desde la que se pudo inferir el valor aproximado de los tamaños moleculares (radio de Stokes) de las proteínas MobM y MobSag.

7.7. Análisis de estructura secundaria de proteínas

7.7.1. Predicción de estructura secundaria de proteínas

La predicción del contenido y distribución de estructuras secundarias en base a la secuencia de aminoácidos de las proteínas MobMN243 y MobSag se llevó a cabo con los programas bioinformáticos SABLE (Adamczak et al, 2005), Jpred (Cole et al, 2008), PSIPRED (McGuffin & D.T., 2000) y PredictProtein (Rost et al, 2004); accesibles a través del portal ExPASy (www.expasy.org).

7.7.2. Análisis por Dicroísmo Circular (CD)

El dicroísmo circular (CD) es una técnica estándar para medir la actividad óptica de las proteínas. El análisis por DC en el UV lejano proporciona información sobre los enlaces peptídicos y la estructura secundaria de la proteína, por lo que se usa con frecuencia para seguir cambios en la estructura secundaria en el transcurso de transiciones estructurales.

El espectro de dicroísmo de MobSag se adquirió con un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un controlador de temperatura tipo 'peltier'. La proteína MobSag purificada se dializó en el tampón CD (Tabla 6) y se diluyó en este mismo tampón hasta una concentración de 20 μ M. Para la adquisición del espectro en el UV lejano (180-260nm) se emplearon cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0.2 mm a una temperatura de 4°C. Cada espectro fue el resultado de cuatro acumulaciones, a

una velocidad de barrido de 20 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y una respuesta de 4 segundos. Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo ($\text{grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$), tras la sustracción del espectro del tampón, según la expresión:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \Theta \times M_{\text{mrw}} / 10 \times c \times l$$

donde $[\Theta]_{\text{MRW}}$ es la elipticidad media en grados por residuo promedio, Θ es la elipticidad en miligrados, M_{mrw} es la media del peso molecular por residuo (calculado como el cociente entre el peso molecular y el número de residuos de la proteína), c es la concentración de la proteína en mg/ml y l es el paso óptico en cm. La elipticidad molar calculada se representó frente a la longitud de onda. Los datos obtenidos de CD en el UV lejano se analizaron con ayuda del servidor DichroWeb y los siguientes programas: SELCON3 (Sreerama & Woody, 2000), CONTINLL (Provencher & Glöckner, 1981), CDSSTR (Compton & Johnson, 1986); y K2D (Andrade et al, 1993).

7.7.3. Análisis de estabilidad térmica

Los análisis mediante CD son también usados en la determinación de la estabilidad térmica de una proteína, ya que los cambios en elipticidad se pueden correlacionar con la desnaturalización proteica (pérdida de estructura secundaria). Los cambios inducidos en la estructura secundaria de MobSag se midieron en un incremento de temperatura desde 4°C hasta 90°C a una tasa de 50°C/hora. Las muestras de proteína se prepararon como en el análisis del espectro de CD. Los cambios en la elipticidad se registraron a una longitud de onda de 218 nm en cubetas de 1 mm de paso óptico. Se recogieron los espectros en un rango de 200 a 260 nm de longitud de onda, con incrementos de temperatura de 5°C y equilibrando previamente durante un minuto antes de cada lectura. Finalmente, las muestras se enfriaron hasta la temperatura inicial (4°C) y se recogió otro espectro en el mismo rango de longitudes de onda.

7.8. Inmunodetección de proteínas

7.8.1. Anticuerpos policlonales frente a MobM (anti-MobM)

Los anticuerpos policlonales de conejo anti-MobM utilizados en este trabajo se obtuvieron previamente en el laboratorio por Leda Guzmán (Guzmán & Espinosa, 1997). Con una mezcla de proteína pura MobM y emulsión coadyuvante de Freund se inmunizó a un conejo blanco *New Zealand*. Las alícuotas de suero inmune obtenidas se congelaron a -80°C hasta su uso.

7.8.2. Ensayo de electrotransferencia proteica (*Western blot*)

Para los ensayos de *Western blot* se usaron células de *S. pneumoniae* 708 cultivadas hasta una DO de 0.6 y recogidas por centrifugación en alícuotas de 2 ml. El sedimento celular se disolvió en 50 µl de tampon LP (Tabla 6) y se incubó a 30°C durante 10 minutos. Se añadieron a las muestras 25 µl de tampón SLB 5X (Tabla 6) y se calentaron a 95°C durante 5 min antes de ser cargadas en un gel SDS-PAGE al 12%. En el mismo gel se cargó una alícuota del marcador de pesos moleculares preteñido *SeeBlue Plus 2* (Invitrogen). Una vez terminada la electroforesis (ver Métodos 4.2.2.2.), el gel se equilibró en tampón WBT (Tabla 6). La preparación de la membrana *Inmun-Blot* de PVDF (Bio-Rad) se realizó con un lavado con metanol y equilibrado con el mismo tampón que el gel. La transferencia de proteínas del gel a la membrana se realizó a 100 mA durante 90 minutos y 4°C en el sistema Mini Trans-Blot de Bio-Rad (tampón WBT, Tabla 6). Al finalizar la transferencia, la membrana se secó en metanol durante dos minutos, tras lo que se procedió a la incubación con el anticuerpo policlonal primario anti-MobM (diluido 1:3000 en tampón de saturación PBS-S; Tabla 6). La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 90 minutos y con agitación suave. Después de tres lavados de la membrana con tampón PBS-L (Tabla 6), se procedió a su incubación con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). En este caso el anticuerpo fue diluido 1:30000 en tampón PBS-S y la incubación se llevó a cabo durante 1 hora en las mismas condiciones que la del anticuerpo primario. Antes de su revelado, la membrana se lavó con PBS (Tabla 6) tres veces. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron usando el kit *Immun-StarTM HRP Chemiluminiscent* (Bio-Rad). En este sistema, la peroxidasa (HRP) conjugada con el anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol, potenciando la quimioluminiscencia de éste cuando recupera su estado original (reducido). La luz desprendida en este proceso fue detectada con el equipo *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* (Fujifilm). La intensidad de la bandas fue cuantificada con el software *QuantityOne* (Bio-Rad).

8. INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA

8.1. Visualización de complejos nucleoproteicos pMV158-MobM por microscopía electrónica

La visualización de los complejos nucleoproteicos por microscopía electrónica se llevó a cabo por la Dra. Alicia Bravo en el grupo del Dr. Rudi Lurz (*Max-Planck Institut für molekulare Genetik*, Berlin, Alemania).

La preparación de muestras comenzó con la incubación del DNA superenrollado del plásmido pMV158 con la proteína MobM durante 30 min a 37°C, en ausencia o presencia de Mg⁺². Posteriormente, se fijaron dichos complejos mediante entrecruzamiento químico con 0.2% de glutaraldehído durante 15 min a 37°C. Para obtener DNA de plásmido lineal, se trataron los complejos pMV158-MobM con la enzima de restricción *StuI*. Para separar los complejos pMV158-MobM de la proteína MobM libre y de la enzima de restricción, se utilizaron columnas de *Sepharose 4B*. Luego, se procedió a la adsorción de los complejos en una lámina de mica recién extraída y a la tinción de los mismos con 2% de acetato de uranilo. A continuación, se llevó a cabo un sombreado metálico por evaporación de platino/iridio y se cubrió con una lámina fina de carbón (Spiess & Lurz, 1988). Por último, las preparaciones se examinaron en un microscopio electrónico (Philips CM100, 100 kV) y se tomaron microfotografías con una cámara CCD acoplada. Para calcular la posición de la proteína unida en un DNA, se midió con un digitalizador LM4 (Brühl) la longitud del contorno del DNA de los complejos DNA-MobM y la distancia del sitio de unión de MobM a uno de los extremos de la molécula de DNA.

8.2. Análisis de la actividad de corte de MobM y MobSag

La actividad de MobM sobre DNA bicatenario (superenrollado) o monocatenario ha sido caracterizada previamente en nuestro laboratorio (Fernández-López et al, 2013a; Grohmann et al, 1999; Guzmán & Espinosa, 1997; Lorenzo-Díaz et al, 2011). Basándonos en estos ensayos, analizamos la capacidad de corte sobre DNA, tanto de MobM y sus variantes, como de MobSag.

8.2.1. DNA superenrollado

En general, en estas reacciones se incubaron 8 nM de DNA plasmídico con concentraciones variables de proteína en 20 µl de tampón B (Tabla 6). Las mezclas de reacción se incubaron (a no ser que se indique lo contrario) durante 20 min y 30°C (para MobM y sus derivados) o 50°C (para MobSag) y se pararon por la adición de

proteínasa K (0.1 mg/ml) y SDS (0.5%), incubando 30 min a 37°C. Las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y tinción con una solución de BrEt (1 µg/ml) o GelRed 1X. Se tuvo en cuenta que las formas el grupo planar del BrEt/GelRed se intercala en mayor grado en las formas FII (relajadas) del DNA que en formas FI (superenrolladas), por lo que éstas últimas se multiplicaron por un factor de corrección (1.36) (Projan et al, 1983) para el cálculo del % de formas relajadas generadas por la actividad endonucleasa de la relaxasa.

8.2.2. DNA monocatenario

Para estos ensayos se utilizó como sustrato diferentes oligonucleótidos que contenían la secuencia entera o parte del *oriT_{pMV158}*. En las reacciones se mantuvo la concentración de oligonucleótido constante, aumentando la cantidad de proteína en un volumen final de 20 µl de tampón B. Las reacciones se incubaron durante 20 min a 30°C, y se pararon por la adición de proteínasa K (0.1 mg/ml) y SDS (0.5%), incubando 30 min a 37°C. A continuación, los DNAs se precipitaron con etanol absoluto y un co-precipitante comercial (*Pellet Paint*, Millipore), tras lo que se disolvieron directamente en tampón de carga BXF (Tabla 6) para ser analizadas en un gel de PAA desnaturalizante como se indica en el apartado 4.2.2.2. y visualizadas en el equipo *Fujifilm Image Analyzer FLA-3000* (Phosphorimager, Fuji).

8.3. Precipitación de complejos covalentes DNA-MobM

Los aductos estables pMV158-MobM formados tras el corte de la proteína sobre el DNA (formación del relaxosoma) se precipitaron con el método desarrollado por (Trask et al, 1984). Este método está basado en el uso de un detergente aniónico (dodecilsulfato sódico, SDS) que neutraliza las interacciones electrostáticas de proteínas débilmente unidas al DNA. Las proteínas con una unión covalente o fuerte al DNA, no se disocian con el tratamiento con detergente, por lo que la posterior adición de cloruro potásico (KCl) precipitará sólo estos complejos, mientras que los ácidos nucleicos y proteínas libres permanecerán en solución.

Siguiendo las indicaciones descritas (Trask et al, 1984; Waters et al, 1991), se incubaron 8 nM de DNA de pMV158 con 250 nM de MobM (silvestre o mutantes) en condiciones óptimas para el corte (ver Métodos 8.2.1.). Tras parar la reacción con SDS, los complejos estables pMV158-MobM se precipitaron con 180 mM de KCl a 0°C durante 10 minutos. Los ácidos nucleicos presentes en pellets y sobrenadantes obtenidos, se precipitaron a su vez con acetato sódico (0.3 M) y etanol absoluto. Tras la centrifugación, las muestras se trataron con proteínasa K (0.1 mg/ml) a 37°C

durante 10 minutos. Finalmente se analizaron en un gel de agarosa 1% tal como se describe en 4.2.1.

8.4. Ensayos de competición mediante movilidad diferencial en geles nativos (EMSA)

La capacidad de unión de la proteína MobM a distintos ssDNAs se realizó mediante ensayos de competición. Las reacciones contenían una concentración fija de proteína (80 nM) y de oligonucleótido marcado fluorescentemente (2 nM) en 10 μ l de reacción en tampón A con 300 mM NaCl. En las mezclas se añadió en primer lugar el DNA marcado con cantidades crecientes de un oligonucleótido no marcado (competidor). Después, se añadió la proteína y la mezcla se incubó durante 30 min a 25°C. Posteriormente, se añadió tampón BXGE y se aplicaron las muestras en geles nativos de PAA, visualizando los resultados con ayuda del equipo *Fujifilm Image Analyzer FLA-3000* (Phosphorimager, Fuji).

8.5. Footprinting con DNasa I sobre DNA superenrollado

Para el estudio de la interacción de MobM con la región del DNA de pMV158 que incluye el promotor del *rnalI* (*PctII*), se realizó un ensayo de *footprinting* con DNA superenrollado. Como agente modificador se usó la enzima DNasa I, que digiere el enlace fosfodiéster del DNA mono- y bi-catenario de forma inespecífica. De esta forma, las regiones de DNA reconocidas específicamente y a las que se une la proteína de interés (en nuestro caso, MobM), son inaccesibles para la DNasa I y quedan protegidas de su actividad.

El primer paso del ensayo consistió en la incubación de 1 μ g de DNA superenrollado del plásmido pAS (Tabla 4) con diferentes dosis de proteína MobM (1 y 2 μ M) en 45 μ l de tampón A con 50 mM NaCl, durante 25 min a 24°C. A continuación, las muestras se trataron con una mezcla de DNasa I que contenía 0.3 U de enzima, 10 mM de MgCl₂ y 5 mM de CaCl₂, incubando en este caso durante 1 min a 24°C. Las reacciones de modificación se pararon directamente con un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y el DNA de las muestras se precipitó tras dos extracciones sucesivas con fenol:cloroformo (1:1). Seguidamente, se procedió a la desnaturalización alcalina y posterior neutralización del DNA plasmídico modificado con el objetivo de ser anillado con 1.5 pmoles de oligonucleótido marcado (³²P). El anillamiento se realizó calentando la mezcla de DNA modificado-oligonucleótido marcado a 65°C y dejando enfriar lentamente hasta alcanzar los 37°C. Para extender el DNA anillado se añadieron 1.5 U de T7 DNA polimerasa y una mezcla de dNTPs

(0.2 mM cada uno), incubando a 37°C durante 10 min. Por último, se paró la reacción con tampón de carga BXF (Tabla 6) y las bases degradadas por ataque de la DNasa I se identificaron tras resolver el DNA en geles desnaturalizantes de PAA 8 % y 7 M de urea, en los que también se aplicaron reacciones de secuencia obtenidas con el mismo oligonucleótido.

8.6. Técnicas de cristalización

Todas las cristalizaciones y resolución de estructuras fueron realizadas por el grupo del Prof. Miquel Coll, en los Institutos de Investigación en Biomedicina (IRB) y Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

La proteína MobMN199 marcada o no con seleno-metionina (SeMet) se utilizó para la obtención de los cristales. Los detalles de la construcción y purificación de MobMN199 y la versión marcada con SeMet se detallan en Métodos 6 y (Lorenzo-Díaz, 2010), respectivamente. La preparación de muestras consistió en: mezclas de proteína con distintos DNAs (relaciones 1:1.2 para proteína:DNA) en tampón A (Tabla 6) suplementado con 500 mM de NaCl para SeMet-MobMN199; o un tampón que incluía 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 15 mM MnCl₂·4H₂O, 1% glicerol y 1 mM DTT para MobMN199. Los DNAs sustrato usados para la co-cristalización con la proteína consistieron en pares de oligonucleótidos anillados (Figura 26). Los complejos proteína-DNA fueron purificados mediante cromatografía de filtración en gel y concentrados hasta unos 4 mg/ml.

Los distintos cristales de los complejos DNA-proteína se obtuvieron por el método de difusión de vapor *sitting drop* en distintos tampones (dependiendo de la muestra) sobre un tampón de cristalización que contenía 100 mM AcNa y 10-23% de PEG 6000 o bien 100 mM de MES, 200 mM MgAc₂ · 4H₂O y 20% de PEG 8000 a distintos pHs y temperaturas (entre 4°C y 20°C). Todos los cristales se recogieron en soluciones crio-protectoras que contenían 15-25% de glicerol. Las estructuras fueron resueltas por el método de SAD (Dispersión Anómala Simple), utilizando la dispersión del átomo de selenio. Tras la difracción por rayos-X de los cristales en el ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) y el Soleil (*French Synchrotron Facility*), los datos fueron procesados con iMOSFLM (Battye et al, 2011) y SCALA (Evans, 2006). Los programas informáticos empleados para identificar los átomos de selenio y obtener los mapas de densidad electrónica fueron SHELXD (Uson & Sheldrick, 1999) (Schneider & Sheldrick, 2002) y PHASER (McCoy et al, 2007), mejorando los mapas iniciales con PIRATE (Cowtan, 2001). El 30% de la cadena polipeptídica fue trazada

automáticamente con el programa RESOLVE (Terwilliger, 2003), completando el resto manualmente con el programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

El refinamiento de todas las estructuras se realizó con el programa REFMAC 5.5.0102 (Murshudov et al, 1997), realizando siempre los ajustes manuales con COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Las estructuras obtenidas se depositaron en el PDB (*Protein Data Bank*) con los siguientes códigos: 4LVI (Nic0 pH4.6); 4LVJ (Nic0 pH5.5); 4LVK (Nic0-PO pH4.6); 4LVL (Nic0-SPO pH6.8) y 4LVM (Nic0+1 pH6.5).

9. ANÁLISIS DE MOVILIZACIÓN PLASMÍDICA

La estirpe *S. pneumoniae* 708 portadora del plásmido pAM β 1 (autotransferible), se transformó con DNA de pMV158, algunos de sus derivados o pMVSag (todos ellos movilizables), para su uso como estirpes donadoras. Las estirpes escogidas como receptoras en los ensayos de conjugación en filtro fueron: *S. pneumoniae* MP3008 o *E. faecalis* OG1RF. Todos los ensayos de conjugación se realizaron al menos por triplicado para el cálculo de medias y desviaciones estándar de las eficiencias de movilización conjugativa.

Los ensayos de conjugación en filtro se realizaron según se describió en (Priebe & Lacks, 1989; Smith et al, 1980) con algunas modificaciones. En resumen, las cepas donadoras y receptoras se crecieron sin aireación hasta que alcanzaron una concentración de 5×10^8 células/ml, y tras centrifugar y lavar el *pellet* con AGCH y una segunda centrifugación, se resuspendió el sedimento celular en una solución que contenía medio AGCH, 10 mM MgCl₂ y 0.2% de albúmina. Ambas soluciones se mezclaron con una relación 1:2 (donador:receptor) en un volumen final de 2 ml y se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 μ m (Millipore), colocándolo con la cara que contenía las células hacia abajo sobre otro filtro en una placa de AGCH-agar, suplementada con MgCl₂ (10 mM), albúmina (0.2%), glucosa (0.2%) y DNasa I (5 μ g/ml). La superficie del filtro superior se recubrió con 1 ml de AGCH-agar de igual composición a la capa basal. Tras incubar durante 4 horas a 37°C, se recuperaron las células mediante lavado de los filtros con 2 ml de medio AGCH, aplicando agitación energética durante 20 s. Las células transconjugantes se seleccionaron en medio AGCH-agar con Tc (1 μ g/ml), Nov (10 μ g/ml) y 0.3% maltosa para el receptor *S. pneumoniae* MP3008 o en placas TY-agar con Tc (4 μ g/ml) y 0.3% glucosa para el receptor *E. faecalis* OG1RF. Mediante diluciones seriadas se determinó el número de células/ml de receptor siguiendo el mismo procedimiento que para los transconjugantes, con la excepción de que no se aplicó selección para resistencia a

Tc. Las frecuencias de movilización conjugativa se calcularon como el número de células transconjugantes/ml dividido por el número de células de receptor/ml.

10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS PLASMÍDICAS

El número de copias plasmídicas por equivalente cromosómico se determinó a partir de cultivos líquidos de *S. pneumoniae* que contenían los plásmidos de interés. A partir de estos cultivos, se prepararon extractos crudos de DNA total (véase apartado 3.1.) y se cargaron distintos volúmenes en un gel de agarosa al 0.8% con 1 µg/ml de BrEt (del Solar et al, 1987). Tras la electroforesis, la densitometría de las bandas se realizó con ayuda del transiluminador Gel-Doc y el software QuantityOne (Bio-Rad). Dado que el grupo planar del BrEt se intercala en mayor grado en las formas lineales o relajadas (FII, oc) del DNA que en su forma superenrollada (FI, ccc), los valores densitométricos correspondientes a esta última se multiplicó por un factor de corrección de 1.36 (Projan et al, 1983). El número de moléculas de plásmido promedio por equivalente cromosómico (N_{av}) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$N_{av} = (Dp_{oc} + 1.36 \times Dp_{ccc}) \times Mc / Dc \times Mp$$

donde, Dp_{oc} y Dp_{ccc} son los valores determinados por densitometría para la banda correspondiente a las formas plasmídicas oc y ccc, respectivamente; Mc es el tamaño del DNA cromosómico, tomado como 2.2×10^6 pb para *S. pneumoniae* (Tettelin et al, 2001); Dc es el valor determinado por densitometría para la banda correspondiente al DNA cromosómico; y Mp es el tamaño del DNA plasmídico en pb.

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

Las fusiones transcripcionales con *lacZ* (pΔORI o pRNAII; Tabla 4) se usaron en ensayos de β-galactosidasa para analizar el efecto de la proteína MobM sobre la actividad del promotor del *mall* (*PctII*). La actividad β-galactosidasa se midió en cultivos en fase exponencial (DO = 0.6) de *E. coli* JM109(DE3)/pLGM2 (expresa *mobM*) o *E. coli* JM109(DE3)/pET-5 (no contiene *mobM*) (Tabla 2) que contenían además el plásmido recombinante de interés (pΔORI o pRNAII; Tabla 4). El método utilizado para este ensayo está basado en el descrito por Miller en 1972 (Miller, 1972).

Los cuatro cultivos de *E. coli* JM109(DE3) crecieron hasta una DO de 0.4, tras lo que se dividió cada uno de ellos en dos partes iguales. Tras añadir IPTG 1 mM a

una de las mitades, se incubaron todos los cultivos hasta alcanzar una DO de 0.6 y se enfriaron en hielo durante 20 minutos. A continuación, se mezclaron cultivos y tampón Z (Tabla 6) en una relación 1:10, tras lo que se procedió a la permeabilización celular con SDS y cloroformo. Las muestras se incubaron de 1 a 4 min con el sustrato colorimétrico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), parando la reacción con la adición de Na_2CO_3 . La absorbancia de las muestras a dos DO (420 y 550 nm) fue medida usando un equipo *Varioskan Flash reader* (Thermo Fisher Scientific). A partir de los valores obtenidos, se determinó la actividad β -galactosidasa en unidades Miller (MU) (Miller, 1972). Con cada cultivo se realizaron tres experimentos independientes y los valores de actividad β -galactosidasa se midieron por triplicado. Con estas medidas, se calculó la media y desviación estándar de cada muestra.

RESULTADOS

Capítulo 1

Familia de plásmidos MOB_{v1}

La definición de familias plasmídicas basada en las secuencias de sus relaxasas ha proporcionado una perspectiva orientada hacia los procesos de transferencia genética por conjugación. En este capítulo se estudia una de estas familias, MOB_{V1} , cuyo prototipo es la relaxasa MobM del plásmido pMV158 (Francia et al, 2004a; Garcillán-Barcia et al, 2009). Una búsqueda bioinformática ha permitido actualizar y explorar el repertorio de plásmidos de esta familia. Se ha hecho énfasis en sus módulos de transferencia, es decir, los orígenes de transferencia (*oriT*) y genes *mob*. A través del análisis de las secuencias conservadas de estos dos elementos, se ha determinado su distribución taxonómica y relaciones filogenéticas.

Este trabajo se ha realizado en colaboración con la Dra. María Pilar Garcillán Barcia, del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) y Universidad de Cantabria-CSIC-IDICAN; Santander. Parte de los resultados de este capítulo dieron lugar a una publicación: Lorenzo-Díaz F*, Fernández-López C*, Garcillán-Barcia MP, Espinosa M (2014) Bringing them together: Plasmid pMV158 rolling circle replication and conjugation under an evolutionary perspective. *Plasmid* 74:15-31. (*estos autores contribuyeron por igual).

1.1. LOS PLÁSMIDOS DE LA FAMILIA MOB_{V1}

En general, la clasificación de los plásmidos se ha basado en el tipo y características del replicón que contienen, ya que éste es el módulo esencial del plásmido (Chang et al, 2000; del Solar et al, 1998; Khan, 1996; Nordström et al, 1984; Novick, 1989). Alternativamente, la clasificación de los plásmidos en base a las secuencias de sus relaxasas ha supuesto una nueva definición de las familias plasmídicas (MOB) (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009). Concretamente, se han definido seis familias MOB distintas: MOB_F , MOB_H , MOB_C , MOB_Q , MOB_P y MOB_V (Garcillán-Barcia et al, 2009; Smillie et al, 2010). Mientras que la clasificación por el replicón plasmídico se enfoca hacia la transferencia vertical, esta nueva clasificación proporciona una visión global de los procesos de transferencia genética horizontal por conjugación.

La relaxasa MobM del plásmido pMV158 fue elegida como la representante de la familia de plásmidos MOB_V (Garcillán-Barcia et al, 2011; Garcillán-Barcia et al, 2009). Esta familia está compuesta por más de 200 relaxasas, de las cuales 140 están localizadas en plásmidos y el resto en cromosomas bacterianos (Guglielmini et al, 2011). De las cinco subfamilias que se han descrito dentro de MOB_V , MobM es el prototipo de la subfamilia más poblada, MOB_{V1} (Garcillán-Barcia et al, 2009). En este

capítulo se ha actualizado el repertorio de plásmidos agrupados dentro de esta subfamilia. Para ello, se ha realizado una búsqueda mediante PSI-BLAST (enero 2014), empleando la secuencia de los 300 aminoácidos del extremo amino-terminal de MobM_{pMV158} (donde se encuentra el dominio relaxasa). Como resultado, tras 6 iteraciones de búsqueda, se encontraron 97 relaxasas no redundantes en los plásmidos que se resumen en la Tabla 8 y se enumeran en la Tabla A1 (ver anexo).

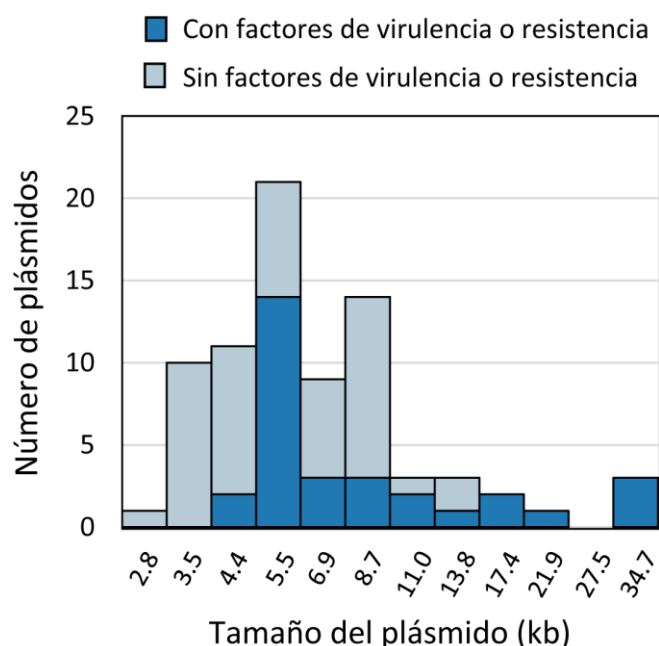


Figura 15. Distribución de los plásmidos MOB_{v1} de acuerdo a su tamaño. El eje de las X se representó los valores del tamaño usando el logaritmo en base 10. Cada barra representa la abundancia de plásmidos para un determinado rango de tamaño. Los plásmidos que contenían genes involucrados en resistencias a antibióticos o metales y/o producción de bacteriocinas están coloreados en azul oscuro, mientras que el resto se representa en azul claro. La información fue obtenida de la Tabla A1 (ver anexo).

De todos los plásmidos MOB_{v1} encontrados, ninguno de ellos contiene otros genes asociados con la transferencia conjugativa aparte de los que codifican la relaxasa. Por tanto, estos plásmidos serían potencialmente movilizables y requerirían de la maquinaria conjugativa de otros elementos auxiliares (es decir, T4CP y T4SS) para ser transferidos. La mayoría de estos plásmidos (79%) presentaron proteínas de iniciación de la replicación por el mecanismo de círculo rodante (RCR). En cuanto al tamaño, mostraron tener entre 2.7 y 30 kb (con una de media de 5.1 kb; Figura 15). Aproximadamente la mitad de ellos contenían genes involucrados en resistencia a antibióticos (principalmente a una amplia variedad de inhibidores de síntesis de proteínas, tales como macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, estreptograminas, aminoglucósidos y tetraciclinas) u otros marcadores tales como la resistencia a metales pesados o la producción de bacteriocinas (Figura 15). Respecto a su

estructura genética, el módulo de transferencia resultó ser muy similar en todos los plásmidos identificados: el *oriT* situado *upstream* y cerca (<150 pb) del gen *mob*. Por otra parte, el sitio de corte se encontró siempre en la misma cadena que el gen *mob*, tal como ocurre en la mayoría de plásmidos.

1.2. MÓDULO DE TRANSFERENCIA DE LOS PLÁSMIDOS MOB_{V1}

En este apartado se presenta un estudio detallado del módulo involucrado en la transferencia conjugativa (MOB) de los plásmidos de la familia MOB_{V1}, examinando los dos elementos principales que lo componen: *oriT* y gen *mob*.

1.2.1. Los orígenes de transferencia MOB_{V1}

El inicio de la conjugación bacteriana se realiza a través de la formación del relaxosoma en el origen de transferencia (*oriT*). El *oriT*_{pMV158} abarca 41 pb en una región localizada *upstream* del gen *mobM*. Esta secuencia contiene tres repeticiones invertidas (IR1 a IR3) (Lorenzo-Díaz et al, 2011) y el sitio de corte, mapeado tanto *in vitro* (Guzmán & Espinosa, 1997) como *in vivo* (Grohmann et al, 1999) entre las coordenadas 3595-3596 (dinucleótido 5'-GpT-3') del plásmido pMV158 (NC_010096). El estudio de los 93 plásmidos MOB_{V1} recogidos en la Tabla A1 (anexo), tomando como referencia la organización del *oriT*_{pMV158}, permitió identificar un total de 97 secuencias de orígenes de transferencia *upstream* de los respectivos genes que codificaban las relaxasas (cinco de ellos con dos tipos diferentes de *oriT*: pSTE1, pKKS285, pSCFS1, secuencia 'GG692894.1', y pTB19). Las secuencias mostraron un alto grado de conservación, ya que todos contenían tres repeticiones invertidas (IR) y una secuencia consenso 'GTGBG↓T' para el sitio de corte (donde B puede ser una G, C o T siguiendo el código IUPAC; y '↓' representa el sitio de corte). También se detectaron dos grupos minoritarios de plásmidos representados por pT181 y p1414, que se agruparon en un tipo distinto de *oriT* debido a sus diferencias respecto a la secuencia del *oriT*_{pMV158}. (Figura 16). Aun así, estos dos grupos mantienen tanto el número como la distribución de IRs. Desafortunadamente, hay pocas evidencias experimentales que determinen el sitio de corte de estos plásmidos y sólo se han publicado las predicciones de *oriT* de algunos de ellos, como pSMQ172 y pPB1 (de las Rivas et al, 2004; Turgeon & Moineau, 2001).

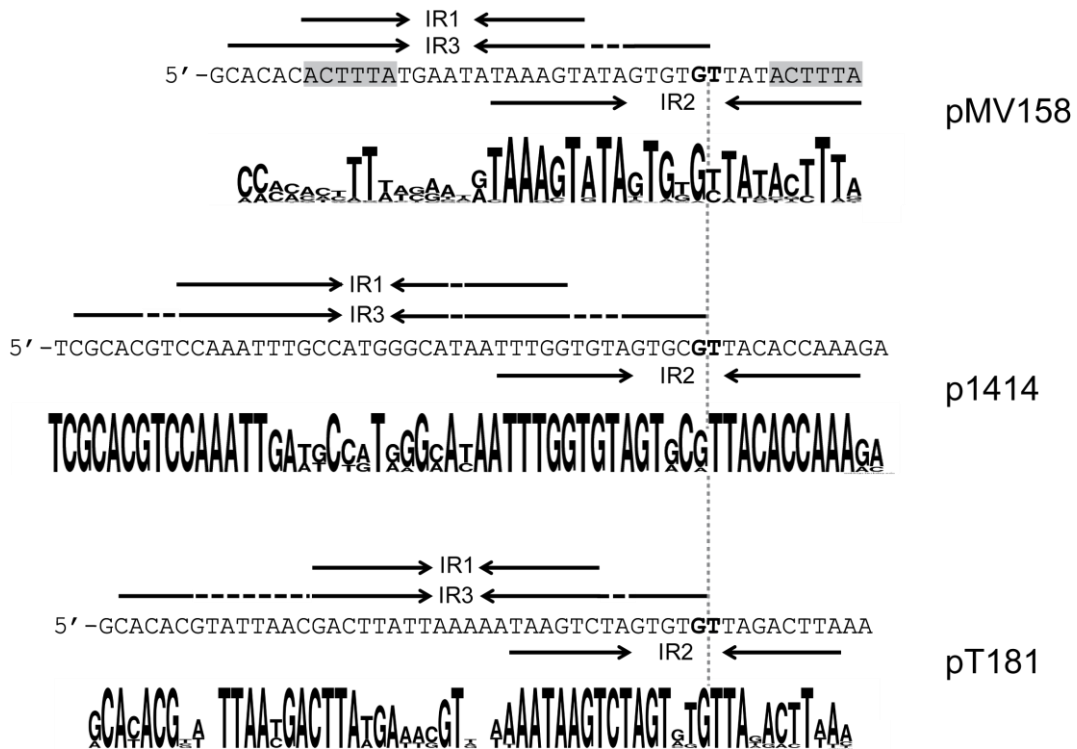


Figura 16. Orígenes de transferencia representativos de los plásmidos de la familia MOB_{V1}. Se representa la comparación de las secuencias de los *oriT* de los plásmidos pMV158, p1414 y pT181 alineados por la posición del sitio de corte (línea vertical discontinua). Las tres repeticiones invertidas parcialmente solapantes (IR1, IR2 e IR3) se indican con flechas, donde las líneas discontinuas marcan la posición de las bases desapareadas en las estructuras secundarias que podrían formarse. El sombreado gris en la secuencia del *oriT*_{pMV158} resalta dos repeticiones conservadas. Los *oriT* consenso se calcularon usando el programa WebLogo v2.8.2 (Crooks et al, 2004) con las secuencias de *oriT* identificadas en plásmidos MOB_{V1} (Tabla A1; anexo).

1.2.2. Las relaxasas MOB_{V1}

El segundo elemento del módulo de transferencia de la familia de pMV158 es el gen *mobM*, el cual codifica la relaxasa MobM (Guzmán & Espinosa, 1997) prototipo de la familia MOB_{V1} (Garcillán-Barcia et al, 2009). Las relaxasas MOB_{V1} presentan tres motivos característicos en su dominio amino-terminal (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009): i) motivo I (HxxR), de función desconocida; ii) motivo II, (NYEL) donde se encuentra teóricamente la tirosina catalítica; y iii) motivo III (HUH), encargado de coordinar el metal.

Las 97 relaxasas encontradas usando MobM_{pMV158} en la búsqueda PSI-BLAST (Tabla A1) resultaron conservar los tres motivos comunes a la familia MOB_{V1} (Figura 17A). A partir del análisis de todas las relaxasas MOB_{V1}, se escogió una representativa de cada grupo filogenético, tal como se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Plásmidos MOB_{V1} representativos agrupados por grupo filogenético de la relaxasa.

Nombre del plásmido ^a	Acceso nucleótido (GenBank)	Tamaño (kb)	Acceso relaxasa (GenBank)	Relaxasas por grupo ^b	Huésped	Familia Rep ^c
pMV158	NC_010096.1	5.5	YP_001586274	8	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rep_2
pYSI8	NC_010936.1	5.0	YP_001967741.1	5	<i>Lactobacillus sakei</i>	Rep_2
pKKS825	NC_013034.2	14.4	YP_003084337.1	5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1 y HTH_Hin_like y Rep_3
pLB4	M33531.1	N.D.	AAA25252.1	8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_2
pSMA23	NC_010242.1	3.5	YP_001649176.1	10	<i>Lactobacillus casei</i>	Rep_1
pGL2	NC_016981.1	4.6	YP_005352352.1	1	<i>Lactococcus garvieae</i>	Rep_2
pAMalpha1	NC_005013.1	9.8	NP_863358.1	4	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rep_1+Rep_1 y Rep_3
pBM02	NC_004930.1	3.9	NP_862027.1	1	<i>Lactococcus lactis</i>	Rep_2
pI4	AF300457.1	N.D.	AAG28767.1	1	<i>Bacillus coagulans</i>	-
pTXW	NC_013952.1	3.2	YP_003517730.1	4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Rep_2
pT181	NC_001393.1	4.4	NP_040472.1	11	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans
pPCZ1	NC_013539.1	4.7	YP_003329162.1	1	<i>Planococcus</i> sp.	Rep_3
pGI1	NC_004335.1	8.3	NP_705753.1	8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1
pE33L5	NC_007104.1	5.1	YP_245942.1	3	<i>Bacillus cereus</i>	HTH_36
p1414	NC_002075.1	7.9	NP_049443.1	9	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1
pTRACA20	NC_013279.1	3.8	YP_003208332.1	1	<i>Bacteria no cultivable</i>	DNA_primase_S
pUB110	NC_001384.1	4.5	NP_040431.1	12	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1+Rep_1
pNM11	NC_019558.1	11.4	YP_007016413.1	4	<i>Planococcus citreus</i>	Rep_3
pJ612	NC_019186.1	5.0	YP_006959664.1	2	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rep_3

Datos extraídos de Tabla A1 (anexo). N.D. Tamaño de plásmido no disponible.

^a: Plásmidos de los grupos filogenéticos representados en la Figura 17; cuyas relaxasas fueron encontradas mediante un PSI-BLAST usando como referencia MobM_{pMV158} (300 residuos N-terminales).

^b: Número de relaxasas encontradas en plásmidos MOB_{V1} que pertenecen al grupo filogenético del plásmido representativo.

^c: Familia de proteínas iniciadoras de la replicación (Rep). En los casos de plásmidos que presentan más de una, sus nombres se separan por un 'y'. El símbolo '+' se usa para iniciadoras que contienen más de un dominio Pfam (Tabla 7).

Con estos datos se construyó un árbol filogenético de relaxasas MOB_{V1}, enraizado con una relaxasa de la subfamilia MOB_{V2} (Figura 17B). Este árbol muestra unos grupos externos con secuencias altamente relacionadas (altos valores de confianza) y unos nodos internos con bajo soporte (los nodos sin número indican un valor de confianza < 50%). Esto revela que hay una baja similitud general entre las secuencias de las relaxasas, limitada básicamente a la conservación de los tres motivos descritos anteriormente (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009). En cuanto a la distribución, los plásmidos que codifican estas relaxasas se encuentran principalmente en los órdenes bacterianos Lactobacillales y Bacillales, con algunos miembros fuera del *phylum* Firmicutes. Curiosamente, los plásmidos que codifican relaxasas incluidas dentro

de un mismo grupo monofilético, están generalmente en huéspedes de un único orden taxonómico (bien Lactobacillales o Bacillales), sugiriendo una transferencia inter-orden menor de la esperada (Figura 17B).

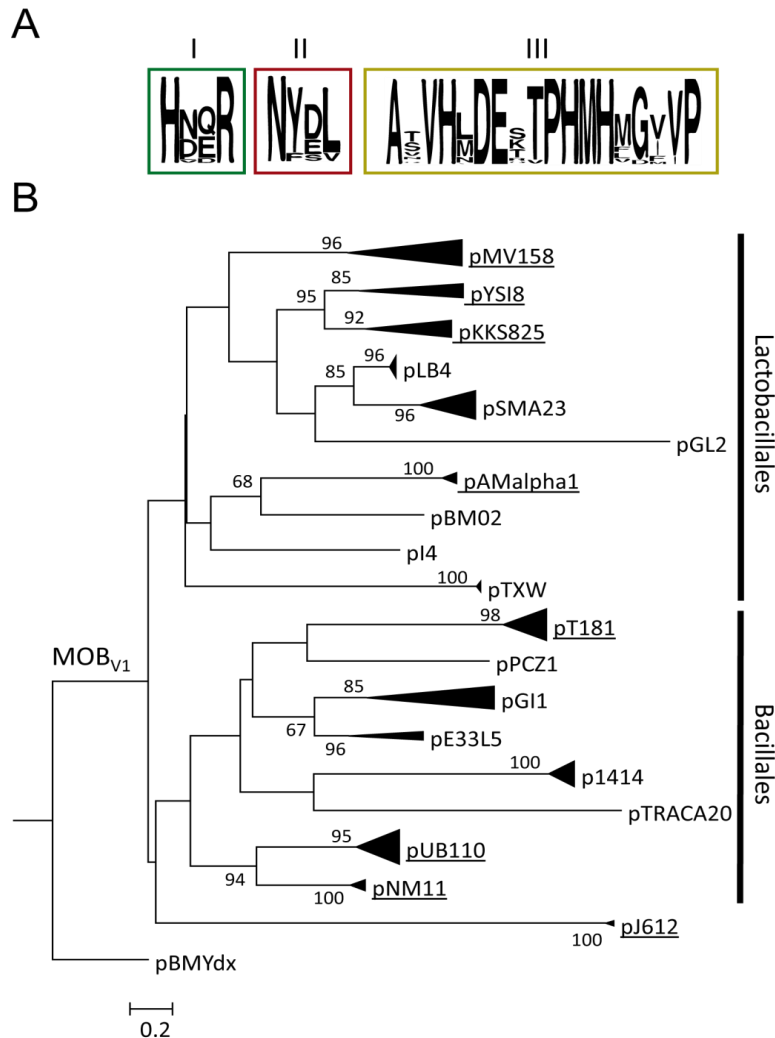


Figura 17. Filogenia de las proteínas homólogas a MobM_{pMV158}.

A. Motivos conservados de la familia de relaxasas MOB_{V1}. Las secuencias de las relaxasas MOB_{V1} (Tabla A1; anexo) se analizaron mediante el programa WebLogo versión 2.8.2 (Crooks et al, 2004). **B.** Búsqueda PSI-BLAST (Altschul et al, 1997) empleando los 300 primeros residuos N-terminales de la relaxasa MobM_{pMV158} (*e-value*: $1 \times E^{-6}$; limitado a 100 resultados no redundantes). Las secuencias homólogas fueron alineadas utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004). La reconstrucción filogenética se llevó a cabo por el método de máxima verosimilitud (ML) utilizando RAXML v7.2.7 (Stamatakis, 2006). 100 árboles de ML fueron ejecutados mediante el modelo JTTGAMMA. Los valores de confianza en cada nodo se calcularon mediante *bootstrap* tras 1000 réplicas; indicando sólo los valores de *bootstrap* > 50%. La relaxasa MOB_{V2} del plásmido pBMYdx (NP_981974.1) se usó como grupo externo para enraizar el árbol. Los grupos altamente relacionados están comprimidos, indicando sólo un miembro para cada grupo. Los grupos de plásmidos que codifican genes de resistencia a antibióticos o virulencia están subrayados. Las barras verticales delimitan los grupos para los cuales la mayoría de miembros pertenecen al orden de Lactobacillales o Bacillales. Para más información sobre los nombres y características de cada uno de los miembros de esta figura ver Tablas 8 y A1.

Capítulo 2

Caracterización del dominio relaxasa de

MobM

La relaxasa MobM es una endonucleasa que reconoce el $oriT_{pMV158}$, donde realiza un corte específico para iniciar la transferencia conjugativa del plásmido. Su dominio relaxasa se encuentra en la región N-terminal, según indica la caracterización de MobMN199, una versión truncada de la proteína que incluye los primeros 199 aminoácidos (Lorenzo-Díaz et al, 2011). Aunque MobMN199 presenta una actividad de corte sobre DNA superenrollado similar a la proteína nativa MobM, no tiene actividad sobre DNA monocatenario. Para profundizar sobre los requerimientos estructurales de MobM a la hora de ejercer su actividad endonucleasa, en este trabajo se llevó a cabo la construcción y purificación de MobMN243, una nueva versión que contiene 44 aminoácidos adicionales en su extremo C-terminal respecto a la proteína MobMN199. Este capítulo muestra los resultados de la caracterización biofísica y bioquímica de MobMN243. Además, se presentan una serie de análisis estructurales que han permitido desvelar un nuevo mecanismo catalítico no visto antes en relaxasas, el cual ha sido validado mediante ensayos funcionales con mutantes puntuales de la proteína MobM.

Parte de este trabajo se realizó en colaboración con los Dres. Radek Pluta y Roeland Boer del grupo de Prof. Miquel Coll, ubicado en el Instituto de Investigación en Biomedicina (IRB) y el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC). Parte de los resultados de este capítulo dieron lugar a la publicación: Fernández-López C, Pluta R, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Espinosa M, Coll M, Lorenzo-Díaz F, Boer RD (2013) Functional Properties and Structural Requirements of the Plasmid pMV158-Encoded MobM Relaxase Domain. *J. Bacteriol.* 195(13):3000.

2.1. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MobMN243

La resolución de la estructura tridimensional de MobMN199 unida a su DNA sustrato y la comparación con las estructuras de otras relaxasas, mostró que el extremo C-terminal de MobMN199 carece de una serie de hélices- α que podrían estar implicadas en el correcto posicionamiento del ssDNA en el centro activo (Figura 12). El diseño de la proteína MobMN243 se basó en los datos obtenidos mediante la predicción de estructura secundaria de MobM. Se comprobó que la región que incluye 44 residuos adicionales respecto a MobMN199 (200-243) contenía dos hélices- α extra que podrían estar implicadas en el adecuado posicionamiento del DNA monocatenario en el centro activo, y por tanto, de su actividad sobre este tipo de sustrato.

Para la construcción de MobMN243, se amplificó un fragmento de DNA de pMV158 con una pareja de cebadores que incluían el cambio para el codón P244 del

gen *mobM* por un codón STOP. Tras clonar el producto resultante en el vector pET-24b, el plásmido resultante se introdujo en la estirpe *E. coli* BL21(DE3), tal y como se describe en Métodos 3.6.1. En este sistema de expresión controlada, la síntesis de la T7-RNAP se induce añadiendo IPTG al medio de cultivo, siendo esta la polimerasa que inicia la transcripción del gen clonado en el vector pET. Para optimizar la producción de la proteína, tras la inducción con IPTG se añadió rifampicina, la cual inhibe específicamente la RNAP de *E. coli* pero no la T7-RNAP (Studier & Moffatt, 1986). Para la purificación de MobMN243 se aplicó el protocolo puesto a punto para la proteína MobMN199 (Lorenzo-Díaz et al, 2011), tal como se describe en Métodos 6.1. Las fracciones proteicas obtenidas en cada paso de purificación se muestran en la Figura 18. Básicamente, tras la precipitación de los ácidos nucleicos con un polímero catiónico (PEI), se procedió a la precipitación de la fracción proteica con sulfato amónico. La muestra obtenida se cargó en una columna de afinidad de heparina y finalmente se sometió a una cromatografía por filtración en gel.

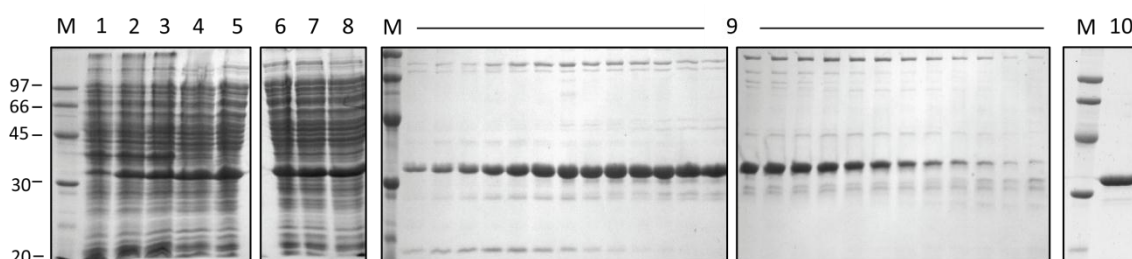


Figura 18. Sobreproducción y purificación de la proteína MobMN243. Los pesos moleculares estándar del marcador (M) se indican en la parte izquierda (en kDa). Los geles 12% SDS-PAGE con las fracciones de los distintos pasos de purificación se cargaron en el siguiente orden: cultivo sin inducir (carril 1), cultivo tras inducción con IPTG (2) y rifampicina (3), sobrenadante tras lisado celular (4), sobrenadante tras precipitación de ácidos nucleicos con PEI (5), sobrenadante tras precipitación con sulfato amónico antes (6) y tras diálisis frente a tampón A con 300 mM de NaCl (7). La fracción proteica soluble tras diálisis (8), fue cargada primero en una columna de afinidad de heparina y sometida posteriormente a elución con gradiente de NaCl (9). Por último, la muestra resultante se separó en una columna de filtración en gel, recogiendo y juntando aquellas fracciones puras de la proteína (10).

Desde los primeros pasos de purificación de la proteína MobMN243, se observó una migración electroforética anómala en geles de SDS-PAGE. La banda correspondiente a la proteína indicaba una masa molecular relativa de entre 30 y 45 kDa (Figura 18), lo que difería de su masa teórica calculada de 28.4 kDa (Figura 19A). Un aumento en la cantidad de SDS en los geles suprimió este efecto, ya que la banda de MobMN243 se desplazó hacia una posición que coincidía con la de su masa teórica (no se muestra). Este fenómeno puede deberse a una alta compactación de la proteína, lo que obliga a un mayor porcentaje de SDS para su total desplegamiento.

No obstante, la secuenciación de los primeros 10 aminoácidos del extremo N-terminal confirmó la identidad de MobMN243, además de la eliminación durante su producción del residuo metionina¹ (tal como ocurre con MobM y MobMN199 en el mismo sistema de expresión). El servidor ProtParam (Tabla 7) permitió calcular su coeficiente de extinción molar $\epsilon = 24410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (lo cual equivale a $A_{280, 0.1\%} = 0.855 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y su punto isoeléctrico (6.2), muy cercano al de la proteína MobM nativa (6.06) y al de la versión truncada MobMN199 (6.01).

2.2. ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE MobMN243

La proteína MobM243 carece de los últimos 251 aminoácidos del extremo C-terminal, donde se encuentra el hipotético dominio de dimerización (Figura 19A). Como primera aproximación al estudio de la oligomerización de MobMN243, se comparó el perfil de elución de cromatografía de filtración en gel (permite separar las proteínas en función de su tamaño/forma molecular) de las tres versiones disponibles de la proteína MobM (Figura 19B).

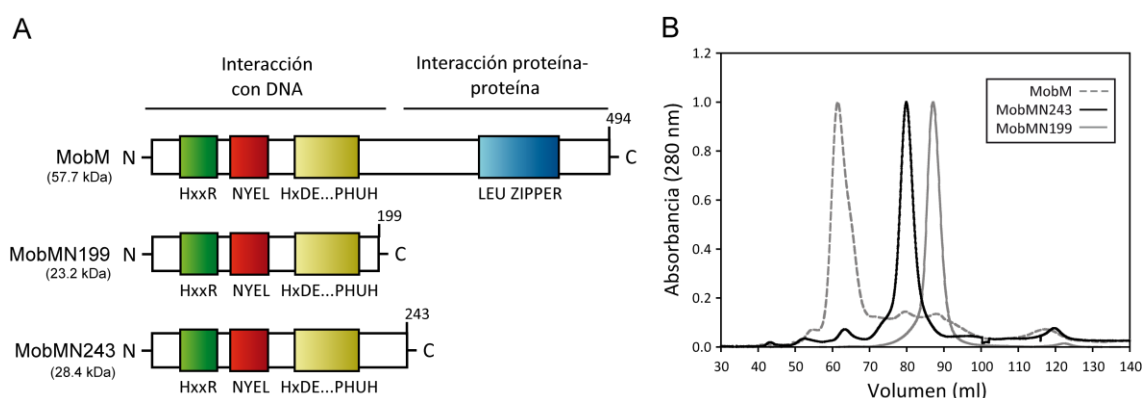


Figura 19. Esquema de las proteínas MobM, MobMN199 y MobMN243 (A) y perfiles de elución en cromatografía en filtración en gel (B). A. La región N-terminal de MobM contiene tres motivos conservados implicados en la interacción con DNA, mientras que la región C-terminal contiene el dominio putativo de dimerización e interacción con otras proteínas. Se indica la masa molecular (izquierda, entre paréntesis) y número de aminoácidos (derecha) de cada proteína. B. Análisis comparativo de los perfiles de elución de filtración en gel de MobM (línea discontinua gris), MobMN243 (línea negra continua) y MobMN199 (línea gris continua). Todas las muestras fueron eluidas a un flujo isocrático de 0.5 ml/min en tampón A con 500 mM NaCl usando una columna *HiLoad Superdex-200* (GE Healthcare).

Las muestras de proteína pura se cargaron en la columna equilibradas en tampón A (Tabla 6) con 500 mM de NaCl y se eluyeron en el mismo tampón con un flujo isocrático de 0.5 ml/min. MobMN243 eluyó en un único pico a los 80.5 ml, mientras que MobM y MobMN199 eluyeron a los 61.5 ml y 87.1 ml, respectivamente.

Dado que MobM y MobMN199 se comportan como dímero y monómero, respectivamente (de Antonio et al, 2004; Lorenzo-Díaz et al, 2011); el perfil de elución de MobMN243 sugiere que esta proteína se comporta como un monómero en solución.

Mediante ultracentrifugación analítica se estudió tanto el estado de oligomerización como las propiedades hidrodinámicas de MobMN243 a dos concentraciones distintas de proteína (10 y 20 μM). Los datos de velocidad de sedimentación indicaron que la muestra analizada contiene una sola especie proteica con un valor $S_{20,w}$ de 2.5 S y un masa molecular media ($M_{w,a}$) de $27,503 \pm 1,000$ Da (Figura 20); lo cual se ajusta muy bien a la masa teórica de un monómero de MobMN243 (28,409 Da, sin metionina inicial). Los resultados de equilibrio de sedimentación a ambas concentraciones fueron muy similares. El mejor ajuste para equilibrio de sedimentación a 10 μM fue de $30,675 \pm 1,000$ Da, mostrando que la proteína se encuentra en forma monomérica (Figura 20) tal como apuntaban los datos de velocidad. El valor del radio friccional obtenido fue $f/f_0=1.29$, indicando que la forma de MobMN243 se desvía del comportamiento esperado para una partícula globular rígida ($f/f_0 \sim 1.0$).

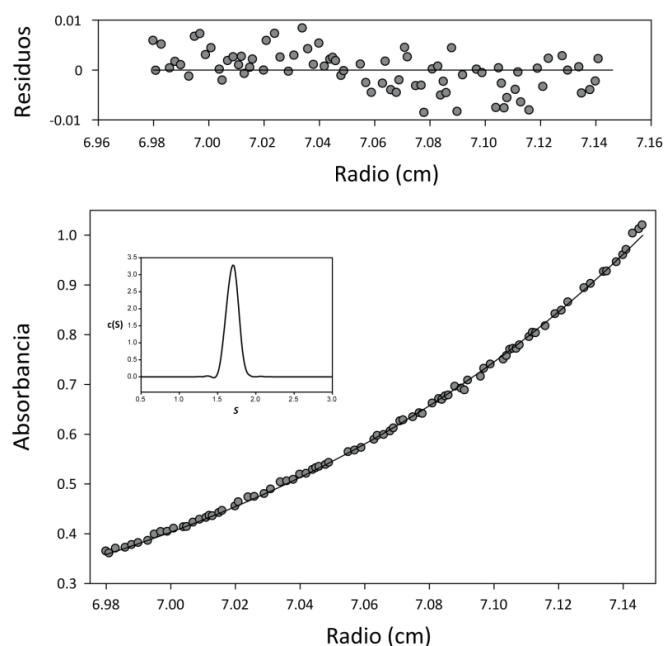


Figura 20. Estudio del estado de oligomerización de MobMN243 mediante ultracentrifugación analítica. Se muestra el equilibrio de sedimentación (35000 rpm, 20°C) de MobMN243 a 10 μM en tampón UA (Tabla 6). La parte de abajo muestra los datos experimentales (círculos) y el mejor ajuste (línea) para una única especie con una masa molecular de 30,675 Da (monómero). La parte de arriba muestra los residuos del ajuste teórico. El gráfico interior muestra la distribución de la misma muestra en el análisis de velocidad de sedimentación (48000 rpm, 20°C), el valor calculado de $S_{20,w}$ fue de 2.5 S.

Estos resultados delimitan la región de dimerización de MobM entre los aminoácidos 243-494. En esta región se encuentra un motivo de cremallera de leucinas (leucina317 – leucina338) (de Antonio et al, 2004), que se postula como responsable de la interacción entre los dos protómeros de MobM en la dimerización.

2.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RELAXASA DE MobMN243

Las reacción de corte sobre un enlace fosfodiéster específico (sitio de corte o *nick site*) llevada a cabo por las relaxasas es el primer paso para iniciar la transferencia de DNA. El $oriT_{pMV158}$ contiene tres repeticiones invertidas (IR1, IR2, e IR3) y el sitio de corte (GT) para la relaxasa MobM (Figura 21). En este apartado se exploran los requerimientos estructurales para la actividad de corte de MobM asociados a la topología del sustrato. Para ello se ha comparado la actividad enzimática de MobMN199 y MobMN243 sobre DNA superenrollado o monocatenario que contenían todo o parte de la secuencia del $oriT_{pMV158}$.

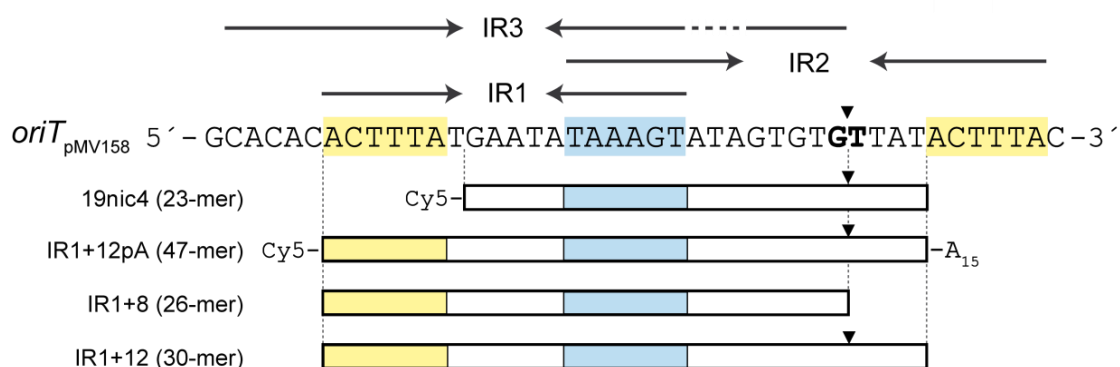


Figura 21. Secuencia de DNA del $oriT_{pMV158}$ y oligonucleótidos usados para la caracterización de la actividad catalítica de MobMN243. Las tres repeticiones invertidas (IR1, IR2, e IR3) se indican con flechas mientras que el sitio de corte (G/T) se marca en negrita y/o con una punta de flecha. Los oligonucleótidos empleados para los ensayos de actividad o estabilidad de MobMN243 se esquematizan en la parte inferior de la figura (Tabla 5). Los sustratos 19nic4 e IR1+12pA están marcados en 5' con el fluoróforo Cy5. El extremo 3' de IR1+12pA, además, contiene una cola de 15 adeninas (A₁₅).

Para los ensayos de corte sobre ssDNA se eligió el oligonucleótido 19nic4, marcado con el fluoróforo Cyanine 5 (Cy5) en su extremo 5' (Figura 21). Este sustrato incluye el brazo derecho del IR1/IR3 (19-nt) y 4 nucleótidos después del sitio de corte del $oriT_{pMV158}$, por lo que los productos esperados tras el corte son dos oligonucleótidos de 19-mer (libre y marcado fluorescentemente) y 4-mer (unido a la proteína). Para realizar este ensayo, se incubaron diferentes concentraciones de MobMN199 y MobMN243 (en un rango entre 60 y 480 nM) con 60 nM de sustrato 19nic4 en

presencia de 8 mM de $MnCl_2$ (véase Métodos 8.2.2.). Las reacciones transcurrieron durante 20 min a 30°C, tal como está descrito para la proteína nativa MobM (de Antonio et al, 2004), analizando el resultado en geles nativos de PAA. En las reacciones con la proteína MobMN199 no se observó corte de DNA. Sin embargo, la banda correspondiente al producto de 19-mer sí se apreció en presencia de MobMN243, incluso a bajas concentraciones de proteína (Figura 22A).

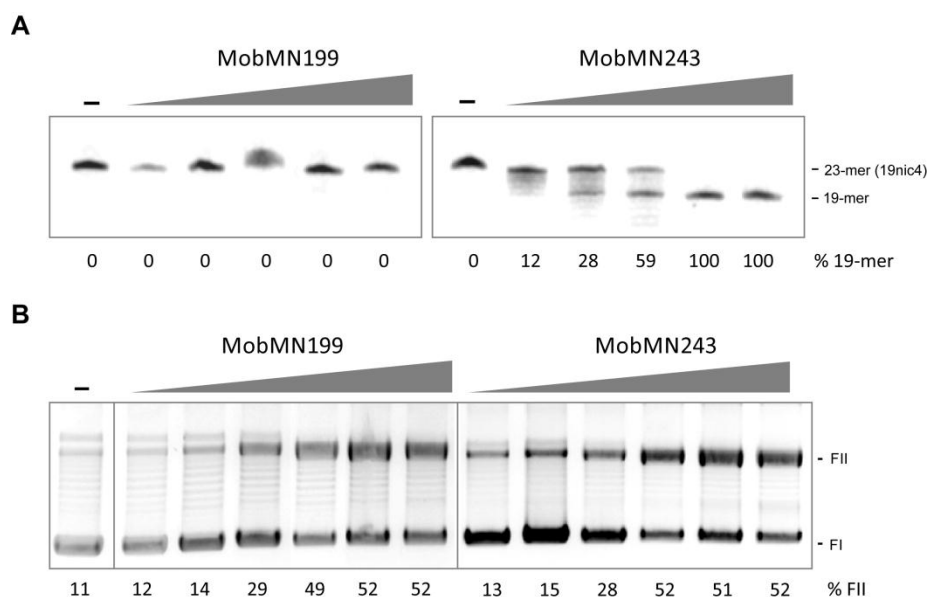


Figura 22. Actividad de corte de MobMN199 y MobMN243. **A.** Actividad de corte de MobMN199 y MobMN243 sobre DNA monocatenario que contiene parte del *oriT*_{pMV158} (oligonucleótido 19nic4; Figura 21). El sustrato 19nic4 (60 nM) se incubó sin (-) o con MobMN199 o MobMN243 (60, 120, 240, 480, y 960 nM) a 30°C durante 20 min, en presencia de 8 mM $MnCl_2$. Los productos del corte son dos oligonucleótidos de 19-mer y 4-mer. Una vez paradas con SDS y proteinasa K, las reacciones fueron analizadas en geles desnaturalizantes de PAA (20%, 7 M urea) y visualizadas con un equipo *Phosphorimager*. **B.** Ensayos de relajación de DNA superenrollado de pMV158 con MobMN199 y MobMN243. Muestras de DNA de pMV158 (8 nM) se incubaron sin (-) o con MobMN199 o MobMN243 (8, 16, 32, 64, 128, o 256 nM) a 30°C durante 20 min, en presencia de 8 mM $MnCl_2$. Tras la parada de las reacciones con SDS y proteinasa K, la generación de formas relajadas (FI) a partir de formas superenrolladas (FII) se analizó en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt (1 mg/ml).

Para determinar la capacidad de convertir DNA superenrollado (FII) en DNA relajado (FI), también se incubaron cantidades crecientes de ambas proteínas (de 8 a 256 nM) con DNA superenrollado de pMV158 (8 nM) en presencia de 8 mM $MnCl_2$ (véase Métodos 8.2.1.). Las muestras fueron incubadas como en el caso del DNA monocatenario, pero el producto de las reacciones se analizó en geles de agarosa. Al contrario de lo obtenido con el ssDNA, ambas proteínas mostraron igual eficiencia de corte sobre DNA superenrollado (Figura 22B). De hecho, los resultados mostraron que ambas relajan DNA de pMV158 con la misma eficiencia que la proteína nativa MobM, convirtiendo más del 60% del DNA superenrollado (FII) en DNA relajado (FI). La imposibilidad para alcanzar el 100% de corte podría explicarse por el equilibrio entre

las actividades corte y el cierre de MobM, observado previamente para otras relaxasas (Llosa et al, 1995; Matson & Morton, 1991; Pansegrau et al, 1990). Por tanto, ambas proteínas truncadas mantienen la actividad endonucleasa, indicando que los residuos requeridos para la actividad de corte se encuentran en los primeros 199 aminoácidos (MobMN199).

2.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS ESTABLES DNA-MobMN243

La reacción de corte de las relaxasas sobre el enlace fosfodiéster están basadas en transesterificaciones, cuyo resultado son intermediarios estables de proteína-DNA y un extremo 3'-OH libre de DNA (Hanai & Wang, 1993; Moscoso et al, 1997). Para visualizar los aductos proteína-DNA formados tras el corte de MobM sobre su DNA sustrato, incubamos MobMN243 con el oligonucleótido IR1-12pA (Figura 21) en condiciones de corte óptimas. Este sustrato monocatenario contiene una cola de poli-A de 15-mer para incrementar el tamaño molecular de los complejos generados de proteína-DNA, y así facilitar la separación electroforética del complejo frente a la proteína libre. Los productos esperados tras el corte de IR1-12pA son dos fragmentos de 26-mer y 21-mer (éste último unido a MobMN243) según se ilustra en la Figura 23A. El análisis de los productos de DNA generados mostró que el corte de MobMN243 sobre IR1-12pA es muy eficiente (Figura 23B). Analizando las mismas reacciones de corte en un gel de SDS-PAGE teñido con SYPRO Ruby, se pudieron detectar dos bandas, una correspondientes a la proteína libre (MobMN243) y otra superior correspondiente al complejo MobMN243-DNA21 (Figura 23C). A pesar de la aparente eficiencia del corte, la cantidad de complejo respecto a la proteína libre fue muy pequeña. Esto se ha visto para otras relaxasas como TrwC_{R388}, donde las moléculas que están implicadas en la formación de los complejos estables con el DNA representan menos del 10% del total (González-Pérez et al, 2007).

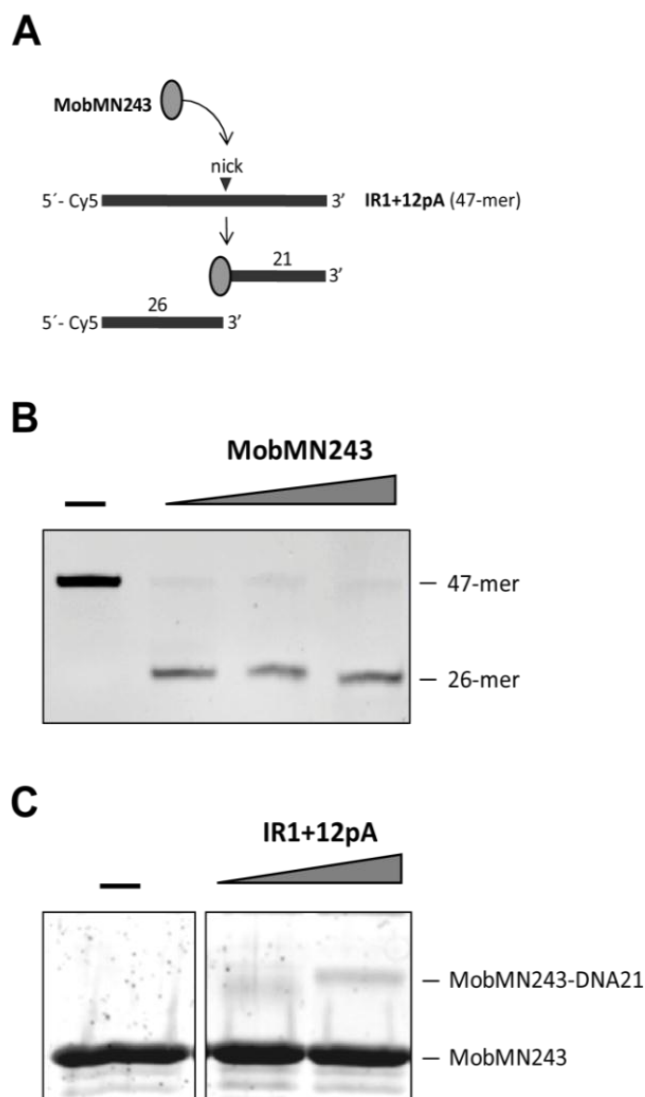


Figura 23. Aislamiento de complejos estables DNA-MobMN243 tras el corte del oligonucleótido IR1-12pA. **A.** Esquema de la reacción de corte y productos esperados de MobMN243 sobre IR1-12pA. **B.** Análisis del DNA. El oligonucleótido IR1-2pA (60 nM) marcado fluorescentemente en 5' (Cy5) fue incubado con diferentes concentraciones de MobMN243 (128, 256, y 512 nM) a 30°C durante 20 min en presencia de 8 mM MnCl₂. La reacción fue parada tras incubación con 0.1% SDS y proteinasa K (0.1 mg/ml) a 37°C durante 30 min. Las muestras se analizaron en un gel desnaturalizante (20% PAA, 7 M urea), analizando el resultado con *Phosphorimager*. **C.** Análisis proteico. MobMN243 (10 µM) fue incubada con el oligonucleótido IR1-12pA (10 µM o 20 µM) en las mismas condiciones que en (B). Las muestras fueron visualizadas en un gel 12% SDS-PAGE teñido con SYPRO Ruby. El complejo de MobMN243 unido al fragmento de 21-mer se identificó sobre la banda de la proteína libre (MobMN243).

2.5. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE MobMN243

Durante la purificación de la proteína MobM nativa se observó cierta inestabilidad (incluso en tampones con alta fuerza iónica) y tendencia a la agregación. En el caso de MobMN243 se observó un comportamiento similar, de hecho, el perfil de bandas de las muestras puras de proteína mostraba siempre una banda con un peso molecular menor. Para determinar si esta banda podría corresponder a una proteína que co-purificaba con MobMN243, se secuenció su extremo N-terminal. La secuencia obtenida fue SYMVARMQ, que correspondió con los residuos N-terminal de MobM (excluyendo el residuo metionina inicial). Este resultado indicó que MobMN243 presenta una inestabilidad intrínseca, al igual que la proteína nativa MobM. Por esta razón, se decidió estudiar la estabilidad de varias muestras de MobM, MobMN243 y MobMN199 en tampón A (Tabla 6) incubadas 2 meses a 4°C en ausencia o presencia

de distintos ligandos (DNA sustrato IR+8, Figura 21; o MnCl_2). Estas condiciones se ajustaron a las empleadas para la obtención de co-cristales para su análisis mediante difracción de rayos X. Tras la incubación de las muestras, éstas se analizaron mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (Figura 24). La incubación de MobM a 4°C durante 2 meses mostró que, a pesar de la aparición de bandas de peso molecular menor, la especie no degradada era la predominante (carril 1). La incubación de MobMN243 a 4°C sin ligandos mostró un perfil de bandas con degradación apreciable (carril 3) en comparación con muestra fresca (carril 2). Tanto la presencia de Mn^{+2} (carril 4), como de DNA sustrato IR1+8 (carril 5), aumentó ligeramente la degradación de MobMN243; sin embargo, la especie principal seguía siendo la muestra no degradada. Por otra parte, se observó un aumento notable de la degradación de MobMN243 cuando se incubaron en conjunto proteína, MnCl_2 y DNA (carril 6). Este fenómeno no ocurrió con la proteína MobMN199 (no mostrado), lo que parece indicar que el DNA sustrato tiene un notable efecto sobre la estabilidad de la región de aminoácidos más allá de residuo 199. Cabe destacar que el producto de degradación de MobMN243 presentaba una migración electroforética similar a MobMN199 (carril 7, muestra fresca), reforzando la idea de que la inestabilidad proteica podría estar localizada a partir del aminoácido 200.

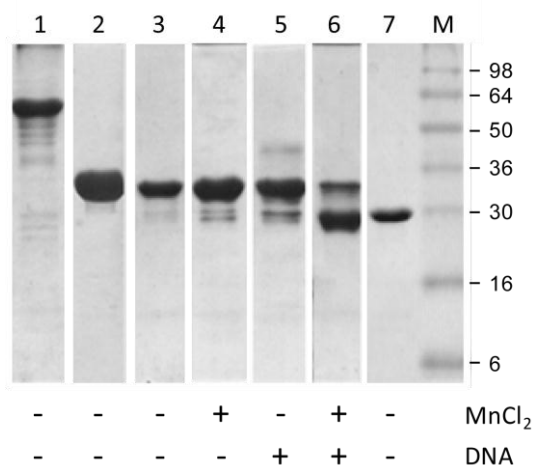


Figura 24. Estabilidad dependiente de ligando de MobMN243 analizada mediante electroforesis SDS-PAGE. Las muestras se analizaron en geles 12% SDS-PAGE en el siguiente orden: carril 1, MobM nativa (57.9 kDa) incubada 2 meses a 4°C; carril 2, muestra fresca de MobMN243 (28.4 kDa); carril 3, MobMN243 incubada 2 meses a 4°C; carril 4, incubada dos meses a 4°C en presencia de 15 mM MnCl_2 ; carril 5, MobMN243 incubada 2 meses a 4°C en presencia de 180 mM de IR1+8; carril 6, MobMN243 incubada dos meses en presencia de 15 mM de MnCl_2 e IR1+8; carril 7, muestra fresca de MobMN199 (23.1 kDa) incluida para comparación. Los marcadores de peso molecular (M) se indican en la derecha del panel (en kDa).

Para acotar la región susceptible de degradación de MobM, varias muestras de MobMN243 fueron analizadas mediante espectrometría de masas con ionización por

nanoelectrospray (ESI-MS). En esta técnica, la ionización de las moléculas se produce por un método muy suave (*electrospray soft ionization*, ESI), por lo que se minimiza la posible fragmentación de las muestras durante su análisis. Los espectros de masas de muestras de MobMN243 sin incubar y tras su incubación con $MnCl_2$ y DNA sustrato (IR1+12) se muestran en la Figura 25. La masa monoisotópica de una preparación fresca de MobMN243 (Figura 25A) se correspondió con el valor teórico (28.4 kDa). En presencia de $MnCl_2$, se observó una degradación parcial de MobMN243, ocurriendo ésta exclusivamente en la región C-terminal de la proteína (aminoácidos Y209 y K193) (Figura 25B). Tras su incubación con $MnCl_2$ y DNA sustrato se observó una degradación total de la proteína, principalmente en la posición K202 y en menor medida en las posiciones A190 y E176 (Figura 25C). Estos resultados confirman que la degradación de MobMN243 se produce principalmente en la región comprendida entre el aminoácido 190 y el 210, tal como sugería el análisis electroforético.

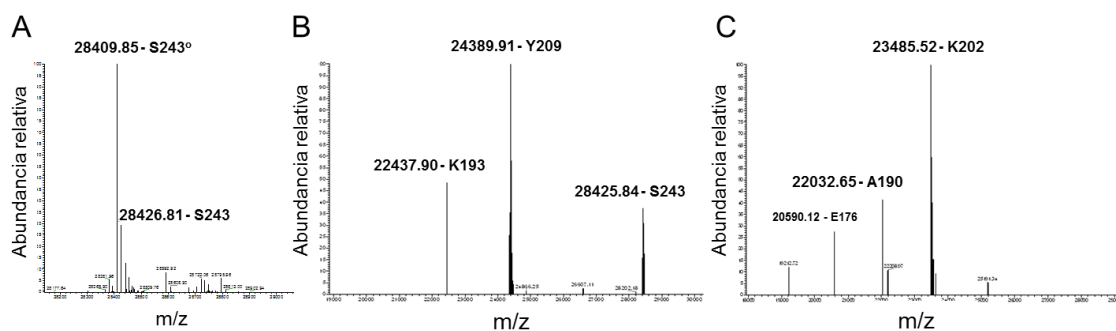


Figura 25. Estabilidad de MobMN243 analizada mediante espectrometría de masas (ESI-MS) antes y después de su incubación con ligando. Se muestran los espectros deconvolucionados masa/carga (m/z) y la masa molecular (en Da) de cada pico. **A.** Muestra no degradada de MobMN243 (sin incubación). Se indican los picos mayoritarios correspondientes a MobMN243 oxidada en una posición (S243^O) y sin oxidar (S243). **B.** Muestra parcialmente degradada de MobMN243 tras su incubación a 30°C y 20 minutos en presencia de $MnCl_2$. Se observan un pico mayoritario (Y209) y otro minoritario (K193), además del pico correspondiente a proteína sin degradar (S243). **C.** Muestra degradada de MobMN243 tras su incubación a 30°C y 20 minutos en presencia de IR1+12 y $MnCl_2$. Se observan un pico mayoritario (K202) y dos minoritarios (A190 y E176).

2.6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL CENTRO ACTIVO DE MobM

Los intentos para obtener cristales con la nueva versión de MobM (MobMN243) resultaron infructuosos, probablemente debido a su inestabilidad intrínseca. Por tanto, se decidió profundizar en la caracterización estructural de esta proteína usando para ello la versión MobMN199 y varios sustratos de DNA que mimetizaban distintas fases de la reacción de corte. Las estructuras obtenidas se depositaron en el PDB (*Protein Data Bank*) con los códigos y resoluciones que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Estructuras resueltas de MobMN199 con distintos sustratos de DNA.

Estructura	Nic0 pH4.6	Nic0 pH5.5	Nic0-PO pH4.6	Nic0-SPO pH6.8	Nic0+1 pH6.5
Código PDB	4LVI	4LVJ	4LVK	4LVL	4LVM
Resolución	1.9 Å	2.2 Å	2.4 Å	2.2 Å	3.1 Å

La estructura tridimensional de la proteína MobMN199 unida a un oligonucleótido que contiene la secuencia definida previamente como *oriT* mínimo (IR1+8) más el grupo fosfato tras el sitio de corte (Nic0-SPO, Figura 26A), confirmó que el plegamiento general de la proteína presentaba cinco cadenas- β antiparalelas (β 1, β 3, β 5, β 4, β 2) flanqueadas a cada lado por una serie de hélices- α (α 6/ α 4 y α 2/ α 1) (Figura 26B). El centro activo se sitúa en la parte central de la lámina de cadenas- β , y en él se pueden identificar la tríada de histidinas del dominio conservado III (H126, H133 y H135) y el glutámico 129 (E129); coordinando todos ellos el metal (Mn^{+2}). Estos residuos se encuentran conservados dentro de la familia de relaxasas MOB_{V1} (Garcillán-Barcia et al, 2009). Debido a su elevado grado de conservación en el motivo II, el residuo propuesto como catalítico para MobM era la tirosina ubicada en la posición 44 (Grohmann et al, 1999). Sin embargo, una inspección de la estructura excluía prácticamente esta posibilidad debido a la lejanía de esta tirosina del centro activo (no se muestra). La histidina en posición 22 (dominio conservado I), en cambio, mostró una disposición óptima como candidata para realizar el ataque nucleofílico sobre el DNA (Figura 26B).

2.6.1. Mecanismo de reacción de MobM

Se resolvieron varias estructuras cristalinas de MobMN199 en complejo con distintos sustratos que incluyen la horquilla de DNA extruida en el *oriT*_{PMV158} reconocida por la proteína (IR1, Figura 21). Estos sustratos consisten en pares de oligonucleótidos anillados que contienen la secuencia del *oriT* mínimo (IR1+8, Figura 26A), pero que excluyen las 4 bases ('GAAT') que formarían el lazo de la estructura secundaria. La eliminación de este lazo facilitó la resolución de las distintas estructuras sin modificar la formación de la horquilla de DNA reconocida por la proteína. Las relaxasas como MobM, reconocen el DNA sustrato y realizan un corte sobre un enlace fosfodiéster específico para iniciar la transferencia del DNA. El resultado de estas reacciones son intermediarios estables de DNA-proteína y un extremo 3'-OH libre de DNA. Los oligonucleótidos se diseñaron de forma que imitan varios estados de esta transesterificación (Figura 26A): i) el oligonucleótido Nic0+1 incluye la timidina

pertenciente al motivo I, que ayuda a posicionar el enlace fosfodiéster que se va a cortar y iii) la H22 del motivo I propuesta como catalítica.

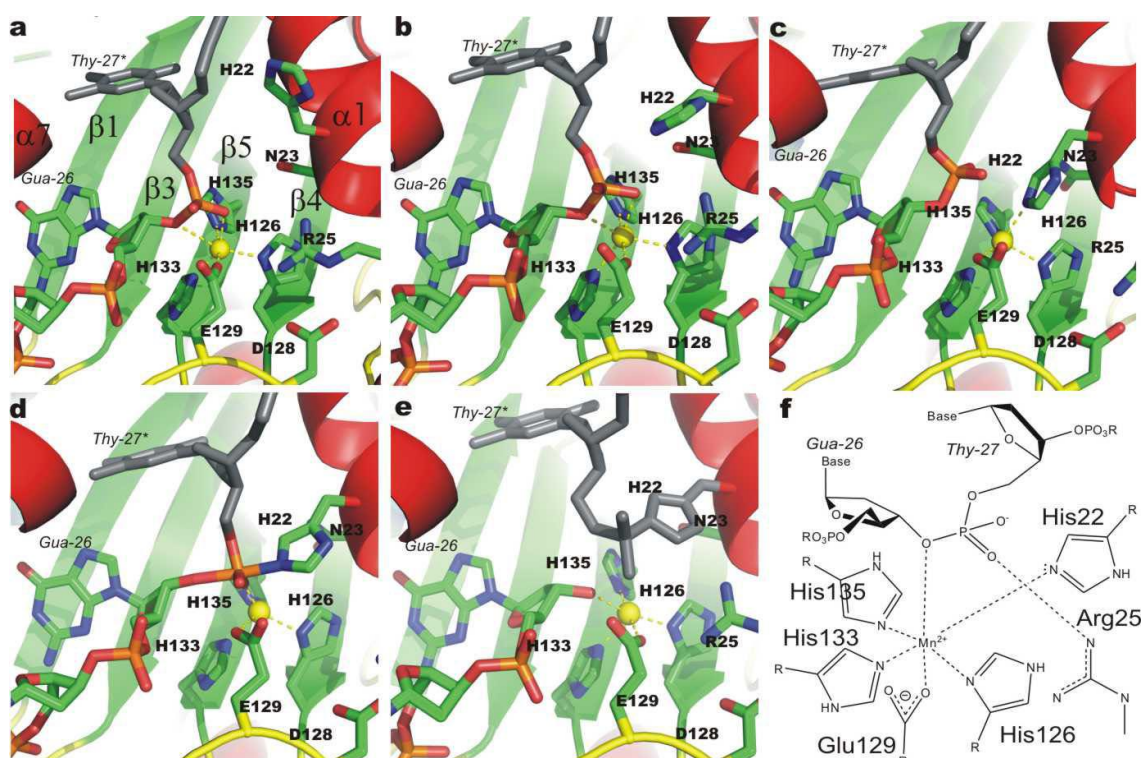


Figura 27. Secuencia cronológica propuesta de la reacción de corte de MobM con las estructuras cristalográficas del centro activo (a-e) y esquema del centro activo basado en las imágenes (f). Los átomos no presentes en la estructura y que se han modelado se muestran en gris. **A.** Nic0-PO a pH 4.6, la histidina 22 catalítica (H22) se encuentra alejada del centro activo. **B.** Nic0-SPO a pH 6.8: H22 se mueve parcialmente hacia el centro activo. **C.** Nic0+1 a pH 6.5: H22 se encuentra en posición para realizar el ataque nucleofílico. **D.** El complejo pentacovalente intermedio de DNA-MobM. **E.** Nic0 a pH 5.5: la H22 cambia de posición, llevándose el DNA unido (modelado). **F.** Esquema de la disposición del centro activo de MobM en base a la secuencia de cristales.

2.6.2. Mutantes del centro activo de MobM

La confirmación de los resultados obtenidos por cristalografía se realizó a través de la construcción de mutantes puntuales del centro activo. Para facilitar la síntesis de los mutantes, se construyó una versión de MobMN199 que incluía seis histidinas en el extremo N-terminal (His-MobMN199). Para ello se usó el vector pQE-1 (QIAGEN), que contiene el promotor del fago T5 (reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*) y el operador *lac*, asegurando así una eficiente represión del promotor en ausencia de inductor (IPTG). Una vez clonado el gen *mobMN199* en el plásmido pQE-1, éste se introdujo en la estirpe *E. coli* M15 que contiene el plásmido pREP4, encargado de reprimir en *trans* el operador *lac* a través de la expresión constitutiva de su represor. Las mutaciones dirigidas en el centro activo de His-MobMN199 se

realizaron usando el kit *GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System* (Fisher Thermo Scientific) y los oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 5.

Primero se comprobó que las colas de histidinas no afectaban a la funcionalidad de la proteína His-MobMN199, encontrando que su actividad de relajación del DNA era equivalente a la proteína sin colas (no se muestra). Después, se construyeron las proteínas con mutaciones puntuales en la H22 (propuesta en este trabajo como catalítica) o la Y44 (previamente propuesta como catalítica) (Garcillán-Barcia et al, 2009). Se decidió sustituir la H22 por una alanina (H22A), residuo de pequeño tamaño y neutro, o por una tirosina (H22Y), la cual presenta un grupo hidroxilo susceptible de atacar el enlace fosfodiéster del DNA (tal como se demostró para otras relaxasas) (Boer et al, 2006). Por otra parte, la Y44 se sustituyó por una fenilalanina (Y44F), que sólo difiere respecto a la tirosina en que carece del grupo hidroxilo en el anillo aromático. Todas las proteínas se purificaron tal como se detalla en Métodos 6.2 para su uso en ensayos funcionales.

Los ensayos *in vitro* incluyeron experimentos de relajación de DNA de pMV158 y comprobación de la formación del consecuente aducto covalente proteína-DNA. Para ello, primero se incubó DNA superenrollado de pMV158 tanto con la proteína His-MobMN199 (WT), como con las proteínas mutantes, realizando todas las reacciones en las mismas condiciones (véase Métodos 8.2.). La formación de DNA relajado (FII) a partir del DNA superenrollado (FI) por parte de las proteínas se analizó tras cargar las muestras en geles de agarosa (Figura 28A). Las mismas reacciones (8 nM de DNA de plásmido y 250 nM de proteína) también se incubaron con SDS y KCl a baja temperatura, para favorecer así la precipitación selectiva de los complejos estables DNA-MobM formados tras el corte (Métodos 8.3.). Estas muestras se centrifugaron para analizar los ácidos nucleicos de sobrenadantes y precipitados en geles de agarosa (Figura 28B). La proteína silvestre (WT) y mutante Y44F fueron capaces de relajar y formar complejos covalentes con pMV158 con la misma eficiencia. Esto confirmó definitivamente que el residuo Y44 no es el residuo catalítico. Por otra parte, con ninguno de los mutantes de la H22 se obtuvo un incremento de formas relajadas respecto al control negativo. Tampoco se recuperaron formas relajadas producto de los posibles complejos covalentes con el mutante H22A. En conclusión, tanto los ensayos de relajación, como los de precipitación de complejos, confirmaron el papel esencial de la histidina 22 en la actividad de la proteína. El papel de otros residuos del centro activo como el glutámico 129 (E129), que coordinaría el metal Mn^{+2} , o la arginina 25 (R25), que parece ser importante en la estabilización del intermediario pentacovalente del corte (Figura 27f); también se comprobó mediante ensayos de relajación (Figura 28A). La mutación de estos residuos provocó una pérdida de

actividad total (R25A) o prácticamente total (E129A, E129Q) de la proteína. Estos resultados, unidos a los obtenidos con métodos cristalográficos, indicarían que ambos residuos son esenciales en la correcta conformación del centro activo para la actividad catalítica de MobM.

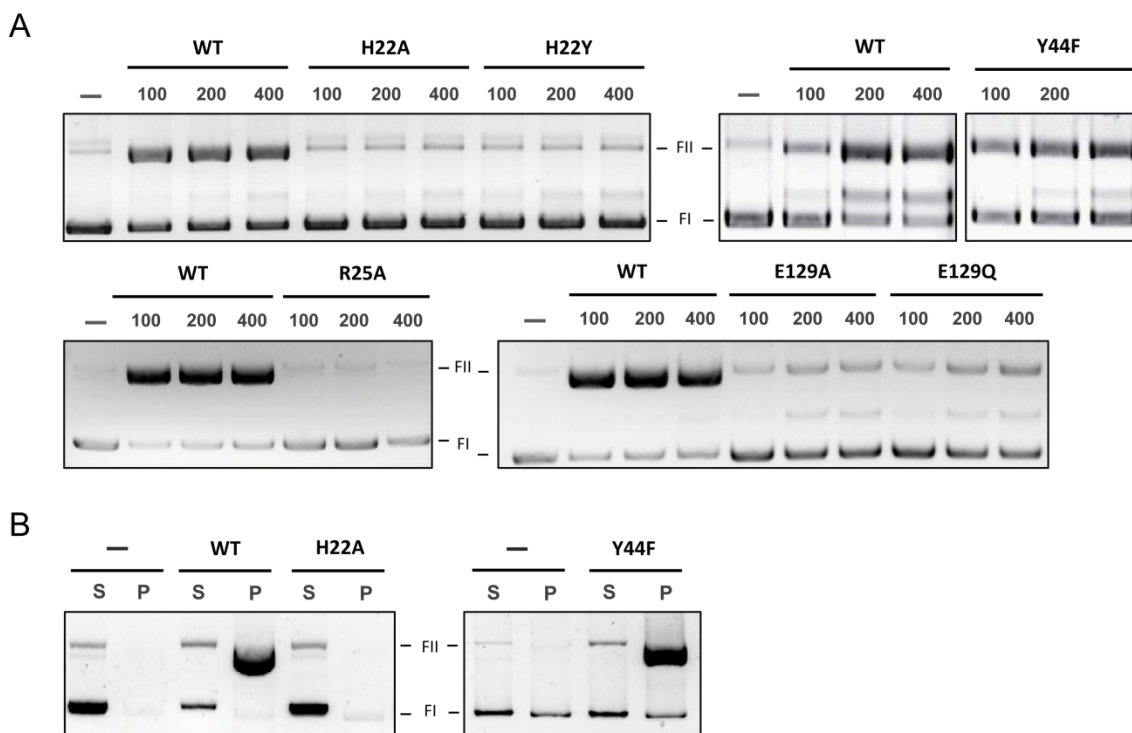


Figura 28. Actividad de corte (A) y formación de aductos covalentes (B) de mutantes del centro activo de His-MobMN199 sobre pMV158. **A.** Ensayos de relajación de DNA de pMV158 con His-MobMN199 silvestre (WT) y mutantes: H22A, H22Y, Y44F, R25A, E129A y E129Q. Se incubaron 8 nM de pMV158 sin (-) o con (100, 200, 400 nM) de proteína suplementado con 8 mM $MnCl_2$ a 30°C durante 20 min. **B.** Análisis de la formación de aductos covalentes de His-MobMN199 con pMV158 analizados tras la relajación y el tratamiento con SDS y KCl. La banda correspondiente a las formas FII en los precipitados (P) indica la formación del aducto covalente; tal como se puede observar con las proteínas silvestre (WT) y mutante Y44F. La generación de formas relajadas (FII) a partir de formas superenrolladas (FI) se analizó en geles de agarosa 1% teñidos con GelRed 1X en ambos paneles.

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, se comprobó el papel de los residuos H22 e Y44 de MobM en la movilización del plásmido pMV158. Para ello se realizaron ensayos *in vivo* en los que se comparó la capacidad de movilización del plásmido pMV158 silvestre con la de dos derivados que incluían las mutaciones H22A o Y44F en el gen *mobM*: los plásmidos pMV158H22A y pMV158Y44F. En estos experimentos de conjugación en filtro, se emplearon como donadoras células de *S. pneumoniae* 708 (Tabla 2) que contenían el plásmido auxiliar pAM β 1 (Tabla 4) y que se transformaron con el plásmido silvestre o mutantes (véase Métodos 9). Como receptor, se empleó la estirpe *E. faecalis* OG1RF (Tabla 2). Los resultados mostraron que mientras que los plásmidos pMV158 y pMV158Y44F tenían

una frecuencia de transferencia similar (del orden de 10^{-5}), no se recuperó ni un solo transconjugante en los mismos experimentos realizados con pMV158H22A (frecuencia $<10^{-10}$, es decir, por debajo del límite de detección experimental). Por tanto, tomados en conjunto, los resultados de la estructura y los ensayos funcionales de MobM muestran que el residuo H22 es esencial para la actividad endonucleasa de la proteína; y además, apoyan su papel como el residuo catalítico que realiza el ataque nucleofílico sobre el DNA sustrato.

Capítulo 3

Interacción de MobM con el módulo de replicación y control de pMV158

El análisis de las interacciones entre MobM y el plásmido pMV158 mostró que la proteína se une a la región que incluye el $oriT_{pMV158}$, tanto para iniciar la transferencia plasmídica (Farías & Espinosa, 2000), como para regular su propia síntesis (Lorenzo-Díaz et al, 2012). Mediante microscopía electrónica se descubrió que, además, MobM reconoce otra región del plásmido pMV158 no detectada hasta el momento. Este nuevo sitio de unión, que se ha denominado sitio secundario o sitio II, se mapeó dentro del módulo de replicación y control, en concreto en la región promotora del gen que codifica el RNAII antisentido. Este capítulo explora las propiedades de la unión de MobM al sitio II. Para ello se llevó a cabo la caracterización de la unión *in vitro* de MobM a esta secuencia, tanto sobre DNA monocatenario como superenrollado. También se analizó el papel regulador de MobM sobre el módulo de replicación de pMV158 y, en consecuencia, sobre el número de copias plasmídicas.

Los estudios de interacciones DNA-proteína por microscopía electrónica mostrados en este capítulo fueron realizados por la Dra. Alicia Bravo en el laboratorio del Dr. Rudi Lurz, en el Instituto de Genética Molecular Max-Planck (Berlín, Alemania). Un manuscrito en preparación recoge los resultados de este capítulo: Fernández-López C, Lorenzo-Díaz F, Lurz, Bravo A, Espinosa M (2015) Intramolecular cross-talks between plasmid-encoded mobilization and replication machineries.

3.1. MAPEO DE LAS INTERACCIONES GLOBALES ENTRE MobM Y EL PLÁSMIDO pMV158

El estudio de las interacciones de la proteína MobM con su DNA diana incluyó un análisis mediante microscopía electrónica de la unión de MobM al scDNA del plásmido pMV158. Los complejos pMV158-MobM se prepararon en presencia o ausencia de $MgCl_2$, condiciones en las que de manera respectiva se favorece la unión y corte del DNA, o únicamente la unión. Una vez fijados con glutaraldehído, los complejos se trataron con la enzima de restricción de sitio único *StuI*, de manera que, tomando como referencia la posición de este sitio (coordinada 4626), se pudiera determinar la localización del sitio de unión de MobM sobre el plásmido (Figura 29). Los resultados mostraron que tanto en presencia como en ausencia del catión, MobM se unía a una región dentro del $oriT_{pMV158}$ que incluye el sitio de corte de la proteína (sitio I, 3585-3596), coincidiendo con el lugar mapeado previamente como posición de corte (3595-3596) (Grohmann et al, 1998; Guzmán & Espinosa, 1997). Curiosamente, los datos obtenidos mostraron MobM presentaba un sitio de unión secundario (sitio II)

no detectado anteriormente, localizado aproximadamente a 1740 pares de bases del extremo de la molécula de DNA de pMV158 (Figura 29).

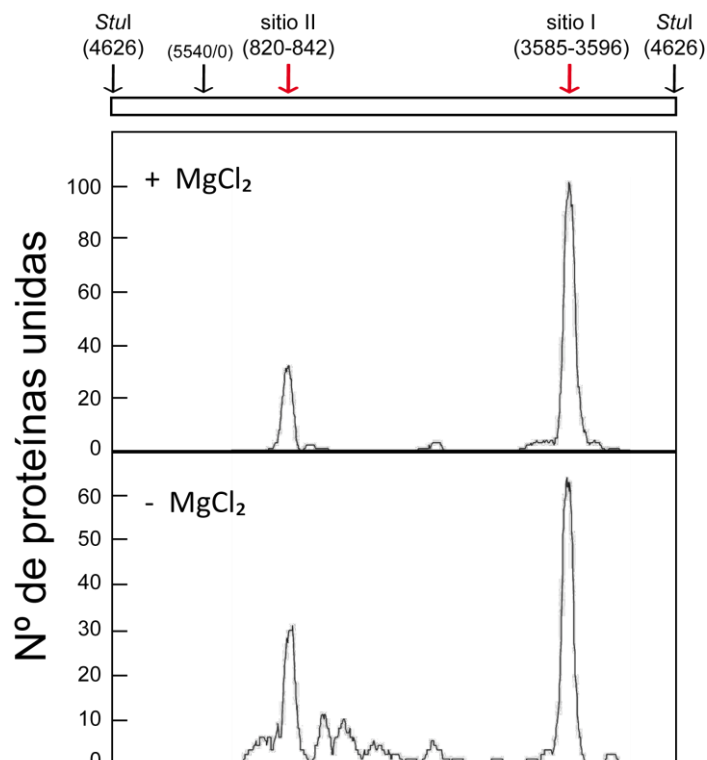


Figura 29. Distribución de los sitios de unión de MobM sobre el plásmido pMV158 obtenidos mediante microscopía electrónica. Los complejos DNA-proteína se incubaron con una enzima de restricción de sitio único en pMV158 (*Stul*) desde donde estimaron las coordenadas de unión de la proteína en las diferentes condiciones del ensayo, según se detalla en Métodos 8.1.

Tras examinar las regiones correspondientes al sitio de unión secundario de MobM desde los dos extremos de la molécula de DNA de pMV158, se vio que en uno de los casos esta región se incluía dentro del gen *mobM* (coordenadas 3808-3830), y en el otro dentro del operón formado por *repB-copG* (coordenadas 820-842). En concreto, la cadena retrasada de ésta última región contenía la región promotora del *mall* antisentido (*PctII*). Tras una inspección de la secuencias de DNA de ambas regiones, se descubrió que la secuencia del promotor *PctII* presentaba homología con el sitio de unión primario de MobM. En la Figura 30A se muestra el alineamiento entre el oligonucleótido IR1+8, el cual representa la secuencia mínima de unión de MobM al *oriT*_{pMV158} (Lorenzo-Díaz et al, 2011), con parte del promotor *PctII*. Las repeticiones invertidas presentes en IR1+8 ‘CTTTA’ y ‘TAAAG’ se encontraron también en la secuencia del promotor del *mall*. Además, la predicción de la estructura secundaria de ambas secuencias indica que la estructura tallo-lazo que formarían es muy similar (Figura 30B).

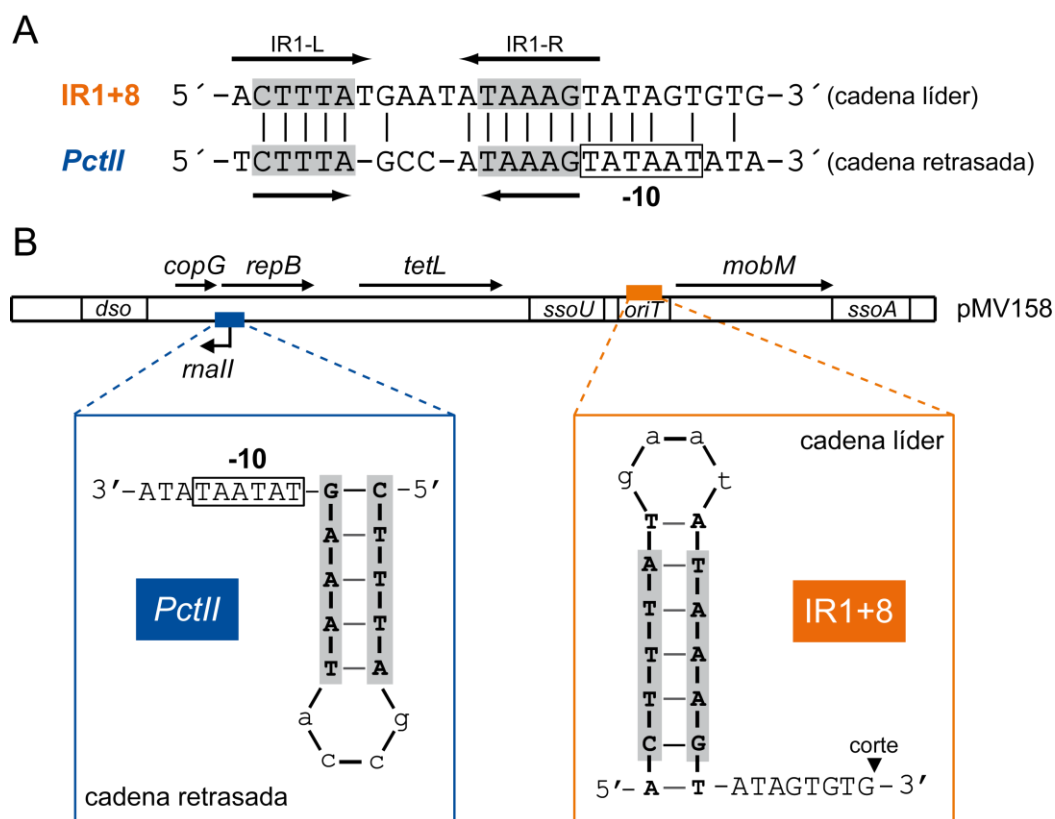


Figura 30. Identificación *in silico* del sitio II de interacción entre MobM y el DNA del plásmido pMV158. A. Alineamiento de secuencias del sitio I (IR1+8; coordenadas 3570-3595) y II (*PctII*; coordenadas 863-840) de unión de MobM. La caja -10 del *PctII* se delimita con recuadro y las repeticiones invertidas en las dos secuencias están sombreadas en gris. **B.** Localización de los sitios de unión de MobM en el DNA del plásmido pMV158 y comparativa entre las estructuras secundarias predichas (programa *mfold*; Tabla 7) que formarían ambas secuencias.

3.2. INTERACCIÓN *IN VITRO* ENTRE MobM Y EL PROMOTOR DEL RNAII

Para confirmar los datos obtenidos mediante microscopía electrónica y análisis *in silico*, se procedió a caracterizar la interacción de la proteína MobM a una secuencia de DNA que incluyese el promotor del *mall* (*PctII*). Dado que MobM presenta una baja afinidad por sustratos de DNA de doble cadena lineal (Lorenzo-Díaz, 2010), el estudio de las interacciones específicas de MobM con el sitio secundario se abordó empleando sustratos de DNA monocatenario y superenrollado.

3.2.1. Unión de MobM al promotor *PctII* sobre DNA monocatenario

La unión de MobM al sitio II sobre DNA monocatenario que contenía la secuencia del promotor *PctII* se estudió a través de ensayos de competición mediante EMSA. Para ello se usó la versión truncada MobMN199, que incluye el dominio

relaxasa de la proteína MobM, involucrado en el reconocimiento e interacción con el DNA (véase Introducción) y cuya afinidad por el sitio I ya se había caracterizado previamente mediante ensayos de competición con EMSA (Lorenzo-Díaz et al, 2011). En este experimento se comparó la capacidad de unión de MobMN199 a dos oligonucleótidos: i) IR1+8 (Figura 30A; Tabla 5), que incluye la secuencia del sitio I de unión; y ii) *PctII* (Figura 30A; Tabla 5), que incluye la secuencia del sitio II de unión. Para ello, se evaluó la capacidad de estos dos sustratos para competir en la unión a MobMN199 con el oligonucleótido IR3 (Tabla 5), marcado con el fluoróforo Cy5 en su extremo 5'. Previamente ya se había demostrado que MobMN199 presenta una alta afinidad de unión por el oligonucleótido IR3 (Lorenzo-Díaz et al, 2011).

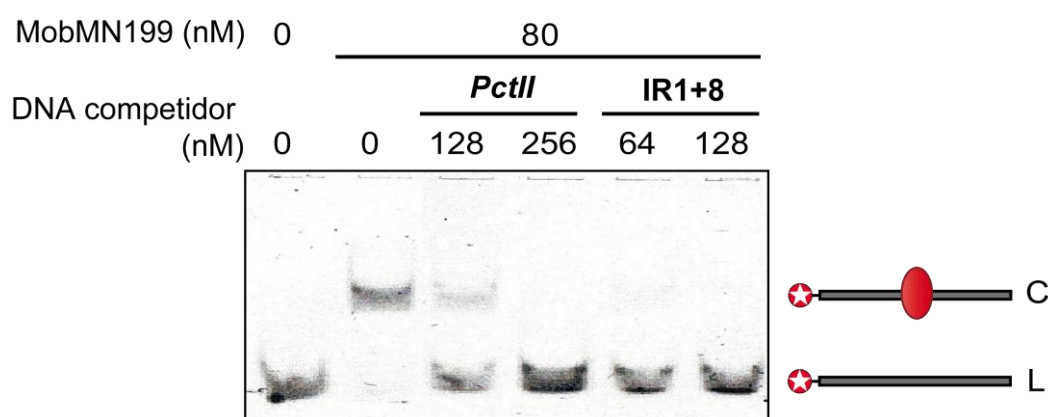


Figura 31. Ensayo de competición por la unión de MobMN199 entre los oligonucleótidos IR3 y *PctII* o IR1+8. Se prepararon mezclas que contenían una concentración fija de DNA marcado IR3 (2 nM) y diferentes cantidades del oligonucleótido competidor sin marca (*PctII* o IR1+8). A continuación, se incubaron las muestras sin o con proteína MobMN199 (80 nM) durante 30 min a 25°C. Por último, las muestras se analizaron en geles nativos de PAA al 10%. La posición de las bandas correspondientes al complejo IR3-proteína (C) o IR3 libre (L) se indica en la derecha del gel.

Las mezclas que contenían el oligonucleótido IR3 y distintas cantidades del oligonucleótido competidor (*PctII* o IR1+8) se incubaron con la proteína MobMN199 durante 20 min a 24°C; y los complejos formados se analizaron mediante electroforesis en un gel nativo de PAA al 10% (Figura 31). La movilidad electroforética en un gel nativo del oligonucleótido marcado IR3 variará en función a si se encuentra en estado libre (L) o bien formando complejos con MobMN199 (C). De esta forma, en presencia de un DNA competidor al que se una MobMN199, se esperaría una mayor proporción de IR3 libre. El resultado de este ensayo reveló que, aunque en menor medida que IR1+8, el oligonucleótido que incluía parte del promotor *PctII* es capaz de competir por la unión específica de MobMN199. Por tanto, y al menos sobre DNA monocatenario, la proteína MobM se une específicamente al sitio II previamente detectado mediante microscopía electrónica.

3.2.2. Unión de MobM al promotor *PctII* sobre DNA superenrollado

La caracterización de la unión de MobM a la región del DNA donde se ubica el sitio II también se llevó a cabo mediante *footprinting* con DNasa I usando como molde DNA superenrollado. Mediante esta técnica, se analizan las regiones protegidas del DNA (huella o *footprint*) por la unión de una proteína, en este caso MobM, frente a la acción enzimática de la DNasa I. Como sustrato para este estudio se usó DNA superenrollado del plásmido pAS, un derivado de pMV158 que carece del sitio I de unión de MobM (*oriT_{pMV158}*), pero no del sitio II (Ruiz-Cruz et al, 2010).

La preparación de complejos DNA-proteína se realizó mediante la incubación de varias concentraciones de proteína MobM (1 o 2 μ M) con DNA superenrollado de pAS durante 25 min a 24°C. Después del periodo de incubación, las muestras se trataron con 0.3 U de DNasa I, tras lo que se realizó la extensión de la cadena retrasada del plásmido con el oligonucleótido marcado radiactivamente FP-rnall-2 (Tabla 5). Los productos de la extensión se analizaron en geles desnaturizantes (PAA 8%, 7 M urea), junto con las reacciones de secuencia (A, G, C, T) obtenidas con el plásmido pAS y el mismo cebador (véase Métodos 8.5.).

En la Figura 32 se muestra el resultado de este ensayo. La comparación de la distribución y densitometría de las bandas obtenidas con la muestra de DNA libre (gris), respecto a la obtenida con el DNA incubado con MobM (rojo), permitió acotar las regiones de interacción entre MobM y el DNA, ya que en estas zonas se observó una disminución de la intensidad de las bandas respecto a la muestra control. El patrón de protección indica que MobM se une principalmente a una región que comprende la caja -10 del promotor *PctII* (posiciones entre +2 y -19, tomando como referencia el sitio de inicio de la transcripción del *rnall*). Por otra parte, en presencia de MobM también se observó una alteración de la densidad de las bandas en las regiones que flanquean la caja -35 del *PctII*. Tal como se esperaba, el análisis mediante *footprinting* en las mismas condiciones realizado en esta región del DNA pero en la cadena líder (FP-rnall-1, Tabla 5), no mostró un patrón de protección claro por parte de la proteína MobM (no se muestra). La combinación de estos datos, con los obtenidos mediante ensayos de competición con DNA monocatenario, confirmaron que MobM se une *in vitro* específicamente a la región del *PctII* que comprende la caja -10 y la secuencia adyacente situada a 5' a la misma.

3.3. EFECTO *IN VIVO* DE LA INTERACCIÓN ENTRE MobM Y EL PROMOTOR *PctII*

Una vez probada la unión específica de MobM a la región que comprende el *PctII*, se valoró la posible influencia de esta unión en el módulo de replicación y control de pMV158.

La secuencia del RNAlI es complementaria a una región del RNA mensajero *copG-repB* que contiene las señales de inicio de la traducción de *repB* (López-Aguilar & del Solar, 2013; Lopez-Aguilar et al, 2015; López-Aguilar et al, 2013). Por tanto, a través de la inhibición de la traducción de la proteína iniciadora de la replicación RepB, el RNAlI es uno de los elementos responsables del control de la replicación del plásmido pMV158 (Figura 9) (del Solar et al, 1997; Lopez-Aguilar et al, 2015). Estudios previos habían mostrado que MobM es capaz de reprimir su propia síntesis a través de la unión a una secuencia incluida dentro del *oriT*_{pMV158} (Lorenzo-Díaz et al, 2012). Basándonos en estos datos, se podría pensar que la secuencia del promotor *PctII* también podría ser reconocida por MobM, provocando con su unión la inhibición de la expresión del gen *rnalI*. Este efecto se trasladaría en una caída en los niveles de RNAlI, que a su vez permitirían una mayor traducción de RepB, y por tanto, un aumento del número de copias plasmídicas (para más detalles véase Introducción).

3.3.1. Regulación transcripcional del promotor *PctII* por MobM

Para comprobar si MobM podría ejercer un control sobre la transcripción del RNAlI, como primera aproximación experimental se analizó el efecto de la inducción de la síntesis de MobM sobre el promotor *PctII*. Para ello, se construyeron fusiones transcripcionales del *PctII* o un promotor control (*Pmob2*) con el gen *lacZ* (cuyo producto es la enzima β -galactosidasa) en células de *E. coli*, que posteriormente se usaron en ensayos de actividad β -galactosidasa. El plásmido pRNAlI (Tabla 4) contiene la fusión transcripcional del promotor *PctII* con el gen *lacZ* (véase Métodos 11). Por otra parte, el plásmido p Δ ORI (Tabla 4) que contiene el promotor *Pmob2* del gen *mobM* fusionado con el gen *lacZ* se usó como control (Lorenzo-Díaz et al, 2012). Ensayos previos del laboratorio mostraron que MobM no tenía efecto regulador sobre la región clonada de este promotor, ya que carece una región *upstream* necesaria para la unión de MobM. Los plásmidos pRNAlI y p Δ ORI se transformaron por separado en las estirpes de *E. coli* JM109(DE3) que contenían: i) el plásmido pLGM2 (expresión de *mobM*; Tabla 4), o ii) el plásmido pET-5 (no expresa *mobM*; Tabla 4). Los ensayos de regulación transcripcional se realizaron mediante la expresión controlada por IPTG del gen *mobM* desde el plásmido pLGM2 (Tabla 4). De esta forma, si la expresión y

posterior unión de MobM al promotor clonado, supone un impedimento para su reconocimiento por parte de la RNAP de *E. coli*, la expresión del gen *lacZ* debería reprimirse y los niveles de β -galactosidasa deberían disminuir.

La representación de los resultados obtenidos se puede ver en la Figura 33. La inducción de MobM reduce unas 10 veces los niveles de β -galactosidasa en las células que contienen el pRNAII (contiene el promotor *PctII*), pero no sobre los cultivos control (con el promotor *Pmob2*). Esto sugiere que MobM reprime específicamente la expresión desde el promotor del RNAII, al menos en células de *E. coli*.

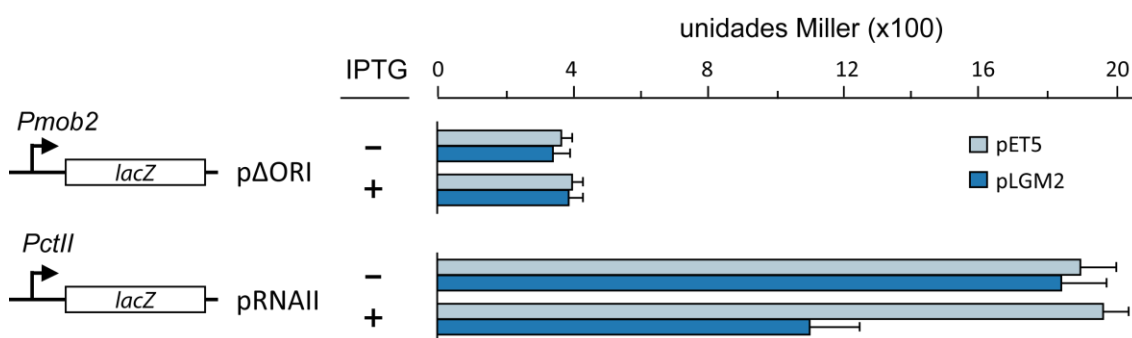


Figura 33. Análisis del efecto de MobM sobre la regulación transcripcional del promotor *PctII*. La medida de la actividad β -galactosidasa se realizó en cultivos de *E. coli* JM109(DE3) portadores de los plásmidos con las fusiones transcripcionales p Δ ORI, control negativo; o pRNAII, con promotor *PctII*. A su vez estas estirpes contenían los plásmidos pLGM2 (gen *mobM* inducible por IPTG; azul oscuro) o pET-5 (sin gen *mobM*; azul claro). La actividad β -galactosidasa se midió creciendo los cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 1 mM de IPTG para la inducción de *mobM*. Los valores se expresan en unidades Miller y son el resultado de la media de valores de tres ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. Nótese que las diferencias en intensidad de señal (unidades Miller) entre los plásmidos p Δ ORI y pRNAII pueden deberse a la distinta eficiencia del promotor que contienen.

3.3.2. Control de la expresión del RNAII por MobM en *S. pneumoniae*

Para validar el efecto represor de MobM sobre la síntesis del RNAII en cultivos de *S. pneumoniae*, se construyó un derivado del plásmido pMV158 en el que se eliminó el sitio de unión primario (*oriT*_{pMV158}) y la región promotora del gen *mobM*, sustituyéndolos por una secuencia que incluía: i) dos terminadores transcripcionales en tándem (*T1T2*) (Brosius et al, 1981), y ii) un promotor inducible por fucosa (*PfcsK*) (Chan et al, 2003). De esta forma, con los terminadores *T1T2* se aseguraría una eficiente terminación de la transcripción del gen *tetL* situado *upstream* de *mobM*, y además, con el promotor *PfcsK* se podría controlar la expresión de *mobM* mediante la adición de un inductor (fucosa) (Ruiz-Cruz et al, 2010). Para realizar esta construcción se empleó una estrategia de PCR con oligonucleótidos solapantes (véase Figura 14). Usando DNA de los plásmidos pMV158 y pAST-*PfcsK* como moldes, se construyó el plásmido pMVT-*PfcsK* (Figura 34, Tabla 4). Por otra parte, usando como moldes los

plásmidos pMV158 y pAST se construyó el plásmido control pMVT (Figura 34, Tabla 4), que contiene la misma secuencia que pMVT-*PfcsK* pero sin región promotora para el gen *mobM*. Estos plásmidos se recuperaron en *S. pneumoniae* 708 (Tabla 2) para la realización de los siguientes experimentos.

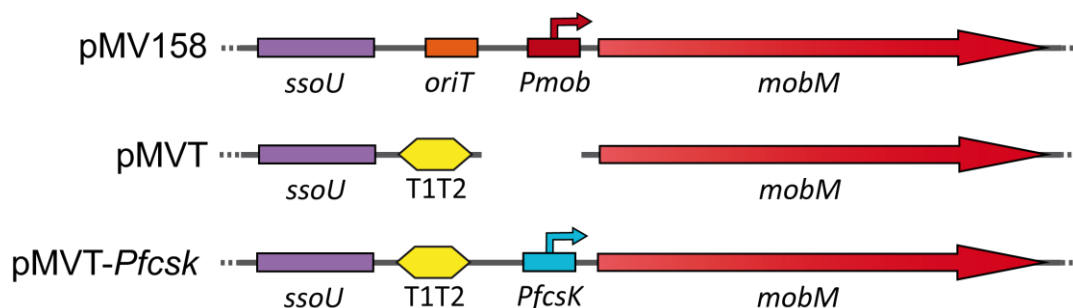


Figura 34. Mapa genético de parte del plásmido pMV158 y sus derivados pMVT y pMVT-*PfcsK*. Mediante PCR se amplificó la secuencia del plásmido pMV158 excluyendo el origen de transferencia (*oriT*) y promotor *Pmob2* del gen *mobM*. En la región delecionada de pMV158, se clonaron dos fragmentos distintos: i) uno que incluía los terminadores transcripcionales T1 y T2 (Brosius et al, 1981) obteniendo el plásmido pMVT (Tabla 4), y ii) otro que incluía tanto T1 y T2 como el promotor inducible por fucosa *PfcsK* (Chan et al, 2003) para obtener el plásmido pMVT-*PfcsK* (Tabla 4).

El primer paso tras la construcción de estirpes de *S. pneumoniae* con estos plásmidos, fue comprobar la síntesis de la proteína MobM en respuesta a fucosa. Para ello se realizaron ensayos de *Western blot*. La detección de MobM con anticuerpos policlonales anti-MobM se llevó a cabo sobre extractos proteicos totales de cultivos de *S. pneumoniae* que contenían el plásmido pMVT o pMVT-*PfcsK* (Figura 34), crecidos en ausencia o presencia de fucosa. Tal como se observa en la Figura 35, en los cultivos de *S. pneumoniae*/pMVT (sin promotor para *mobM*), no se observa producción de la proteína MobM (carriles 2, 3, 4). En los cultivos crecidos sin fucosa con el plásmido que contiene el gen *mobM* bajo control del promotor inducible por fucosa (pMVT-*PfcsK*) (carril 5), se aprecia una producción mínima de MobM, debida posiblemente a escapes ya detectados previamente en este sistema (Ruiz-Cruz et al, 2010). Por otra parte, en los mismos cultivos con inductor, se observan cantidades crecientes de proteína en función de la cantidad de fucosa añadida al medio (carriles 6 y 7).

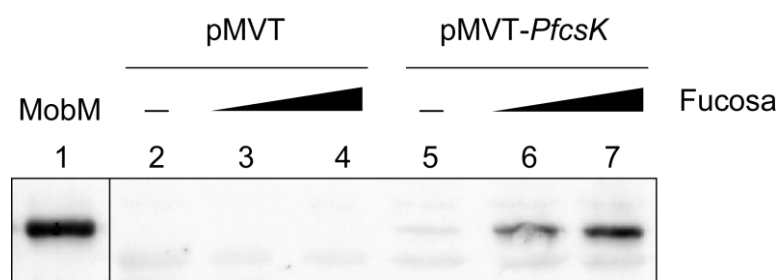


Figura 35. Western blot mostrando la expresión de *mobM* inducida por fucosa. Los cultivos de neumococos que contenían los plásmidos pMVT o pMVT-*PfcsK* se crecieron hasta una $DO_{650} = 0.6$ sin (-) o con diferentes cantidades de fucosa: 0.5% (carriles 3 y 6) y 1% (carriles 4 y 7). Los extractos totales de proteínas se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12%, tras lo que se llevó a cabo el *Western blot* usando anticuerpos policlonales anti-MobM. Una muestra de proteína MobM pura (400 ng; carril 1) se cargó como control.

3.3.3. Niveles intracelulares de mRNAs codificados por pMV158 en respuesta a inducción de MobM

Un ensayo de *primer extension* semicuantitativo nos permitió comprobar cómo afectaba la inducción de MobM en los niveles de transcritos del módulo de replicación y control de pMV158 (en concreto, en el RNAlI y el mRNA de *copG-repB*). Partiendo del RNA total de cultivos de *S. pneumoniae*/pMVT-*PfcsK* crecidos en ausencia o presencia de fucosa, se realizó la síntesis del cDNA con una mezcla de cebadores marcados radiactivamente en el extremo 5'. Estos cebadores marcados anillan en los transcritos de *tetL*, *mobM*, *copG-repB* o RNAlI; siendo el producto de cada uno de ellos de un tamaño distinto: 102 nt, *tetL*; 73 nt, *mobM*; 56 nt, *copG-repB*; 30 nt, RNAlI. El resultado obtenido se ilustra en la Figura 36, donde los valores de la densitometría de las bandas obtenidas con cada producto se normalizaron respecto al de la tetraciclina (*tetL*). Se eligió este transcrito como control ya que previamente se había demostrado que la expresión de *tetL* no se ve afectada por la inducción de MobM (Lorenzo-Díaz et al, 2012). En ausencia de fucosa, se puede detectar la banda correspondiente al producto de *mobM* (carril 4), cuya densidad aumenta significativamente (20 veces) en presencia de fucosa (carril 8). A su vez, la inducción de MobM provocó una disminución de 2 veces la cantidad del RNAlI detectado (véanse los carriles 4 y 8, sin y con fucosa respectivamente). Aunque se pudo detectar la banda del producto de *copG-repB* en los cultivos sin y con inductor (56 pb; carriles 4 y 8), la señal se encontraba por debajo del rango mínimo de cuantificación por lo que no se pudo valorar el efecto de MobM sobre este transcrito. Por tanto, la correlación entre el aumento en la expresión de *mobM* y la disminución en los niveles de RNAlI confirmaría que MobM actúa, ya sea directa o indirectamente, reprimiendo transcripcionalmente la expresión del RNAlI desde el promotor *PctII*.

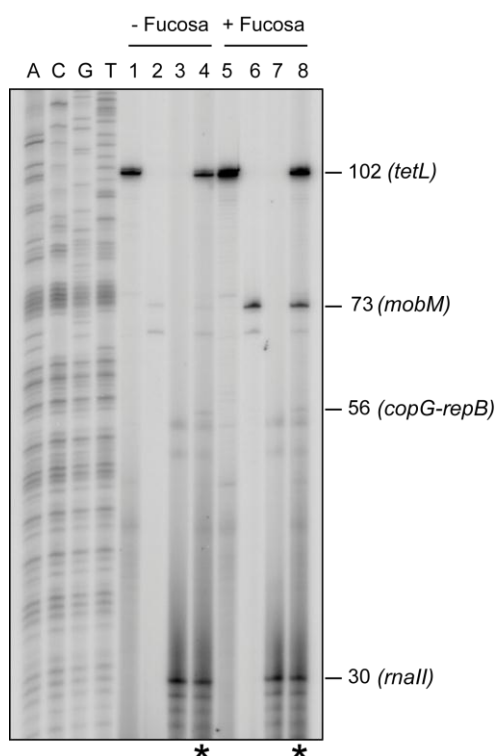


Figura 36. Análisis por *primer extension* sobre RNA total aislado de células de *S. pneumoniae* 708 que contenían el plásmido pMVT-*PfcsK*. Los cultivos de neumococo se crecieron en ausencia (-) o presencia (+) de fucosa hasta una DO = 0.4. Los cebadores PE-*tetL* (carriles 1 y 5), PE-*mobM* (carriles 2 y 6), PE-*rnalI* (carriles 3 y 7) o todos ellos (carriles 4 y 8) se utilizaron para extender el RNA diana en cada caso. Las reacciones de secuenciación (A, G, C, T) se realizaron usando como molde el DNA del fago M13 y demás material provisto por el kit *Sequenase v2.0 DNA Sequencing kit* (USB-Affimetrix). Todos los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de 8% PAA – 7 M urea. Los tamaños (en nucleótidos) de cada producto de extensión del cebador se indican a la derecha del gel. La cuantificación de las bandas se realizó con ayuda del software QuantityOne (Bio-Rad) en los carriles marcados con asteriscos.

3.3.4. Número de copias plasmídicas en respuesta a síntesis de MobM

Para valorar el efecto de la inducción de MobM sobre el número de copias plasmídicas, se prepararon extractos totales de DNA de cultivos de *S. pneumoniae* que contenían los plásmidos pMVT o pMVT-*PfcsK* (Figura 34), crecidos en ausencia o presencia de inductor (fucosa). El contenido de DNA de cada extracto se separó en un gel de agarosa al 1% que contenía BrEt (Figura 37). La cuantificación de las bandas de DNA cromosómico (crom), y plasmídicas (FI y FII) permitió el cálculo de número de copias plasmídicas por equivalente cromosómico (N_{av}) en cada extracto (parte inferior de Figura 37).

En las tres condiciones sin expresión de *mobM* (cultivos sin inducir de ambos plásmidos o con inductor de pMVT), se estimó un N_{av} de aproximadamente 20. En cambio, en los cultivos de pMVT-*PfcsK* inducidos, se observa un incremento en la intensidad de las bandas plasmídicas respecto a los mismos cultivos sin inducir. De hecho, el cálculo de N_{av} mostró que el incremento en los niveles de MobM provocaba

un aumento del número de copias de pMVT-*PfcsK* por equivalente cromosómico de más de 10 veces.

En este capítulo se muestra cómo el incremento en los niveles de MobM inhiben la expresión del *mall*, reduciendo la cantidad de RNAII disponible para unirse a su DNA diana. Como se menciona anteriormente, esta diana incluye la secuencia con las señales necesarias para la traducción de RepB. Así, los bajos niveles de RNAII permitirían una mayor síntesis de la proteína iniciadora de la replicación RepB, aumentando, tal como observamos, el número de copias plasmídicas.

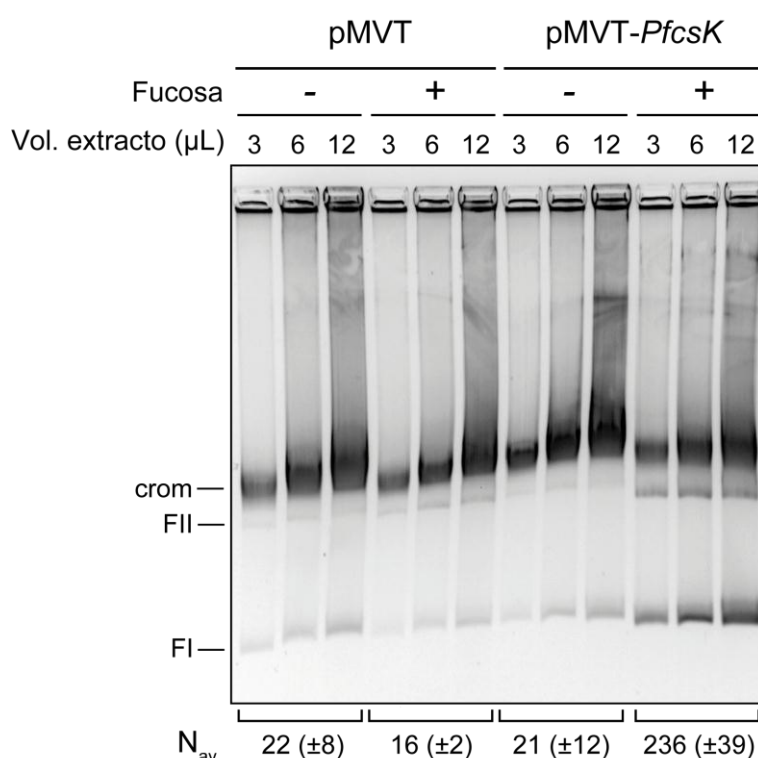


Figura 37. Efecto de la inducción por fucosa de MobM en el número de copias plasmídicas. Como sustrato se usaron cultivos que contenían los siguientes plásmidos: pMVT (control, *mobM* carece de promotor) o pMVT-*PfcsK* (contiene el gen *mobM* bajo control de un promotor inducible por fucosa) (ver Figura 35). Se obtuvieron preparaciones de DNA total mediante extractos crudos de los cultivos de *S. pneumoniae* con los distintos plásmidos, tal como se describe en Métodos 3.1. Las diferentes formas de DNA se analizaron en geles de agarosa al 1% que contenían EtBr (1 µg/ml). Se cargaron cantidades crecientes de cada extracto (3, 6, 12 µL) y se compararon muestras de cultivos sin inducir (-, 0%) e inducidos con fucosa (+, 1%). La migración de las formas cromosómicas (crom), plásmido superenrollado (FII) y plásmido relajado (FI) se indican a la izquierda del gel. El número de copias plasmídicas por equivalente cromosómico se calculó tal como se indica en Métodos 10, y los valores obtenidos con sus correspondientes desviaciones estándar (entre paréntesis) se muestran en la parte inferior de la figura.

Capítulo 4

Un nuevo elemento movilizable en *S.*

agalactiae

S. agalactiae, la bacteria de donde se aisló originalmente el plásmido pMV158, contiene una gran cantidad de elementos genéticos móviles codificados en su genoma. En este capítulo se estudia un nuevo elemento genético movilizable (IME*rpsI*) que se encuentra integrado en el cromosoma de esta bacteria. Este elemento codifica una proteína homóloga a la relaxasa MobM del plásmido pMV158 que hemos denominado MobSag. A través de ensayos *in vivo* se analizó la capacidad del IME*rpsI* tanto para escindir-se del cromosoma como para movilizarse conjugativamente. La proteína MobSag se purificó para la caracterización *in vitro* de sus propiedades biofísicas y bioquímicas mediante ensayos de dicroísmo circular y de actividad de corte sobre DNA superenrollado. Una vez establecidas las condiciones de actividad óptimas, se determinó el dinucleótido específico de corte de MobSag mediante una aproximación metodológica rápida y sencilla basada en el uso de fluoróforos.

La secuenciación del genoma de *S. agalactiae* HRC se realizó en colaboración con el Dr. Fabián Lorenzo Díaz en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (Universidad de La Laguna, Tenerife). El análisis del IME*rpsI* se realizó durante una estancia en el laboratorio del Dr. Philippe Glaser, en el Institut Pasteur (París, Francia). Un manuscrito en preparación recoge los resultados de este capítulo: Fernández-López C, Lorenzo-Díaz F, Douarre PE., Báez A, Flores C, Glaser P, Espinosa M (2015) Relaxase-mediated conjugative transfer of a streptococcal Integrative and Mobilizable Element.

4.1. ELEMENTO MOVILIZABLE E INTEGRATIVO *rpsI* (IME*rpsI*)

La clasificación de elementos conjugativos en familias MOB está definida en base a la homología de los 300 aminoácidos del extremo amino-terminal (dominio relaxasa) de las proteínas iniciadoras de la conjugación que codifican (véase Introducción) (Garcillán-Barcia et al, 2009). En el Capítulo 1 se mostró una actualización del inventario de plásmidos de la familia MOB_{V1}, cuya relaxasa representante es MobM_{pMV158}. Una nueva búsqueda con el programa PSI-BLAST y los 300 aminoácidos N-terminales de MobM_{pMV158}, pero en este caso extendida a cromosomas bacterianos, reveló la existencia de una proteína putativa homóloga (63% identidad; 85% similitud) localizada en el cromosoma *S. agalactiae*. Esta proteína está codificada por un gen, al que denominamos *mobSag*, que se encuentra dentro de un putativo elemento movilizable (IME*rpsI*). A su vez, este elemento se encuentra integrado en la región 3' del gen *rpsI*, el cual codifica la proteína S9 que forma parte de la subunidad ribosomal 30S (Brochet et al, 2008a).

Para la caracterización del *IMErpsI* se usó un aislado clínico de *S. agalactiae* que hemos denominado HRC (cedida por T. Coque y F. Baquero del Hospital Ramón y Cajal; Tabla 2) y cuyo genoma completo fue secuenciado en el transcurso de este trabajo (véase Métodos 4.3.3.).

El *IMErpsI* de la estirpe HRC tiene alrededor de 9 kb de longitud y se encuentra flanqueado por dos sitios de recombinación sitio-específica (*attachment sites; att*) de 50 pb. Dentro del *IMErpsI* se encuentran varios marcos de lectura abiertos identificados como (de 5' a 3'; Figura 38A): una recombinasa sitio-específica (Phage_integrase; PF00589), un regulador transcripcional de la familia Cro/C1 (HTH_3; PF01381), una arsenato reductasa (ArsC; PF03960), una proteína iniciadora de la replicación por círculo rodante (RCR) (Rep_trans; PF02486), una proteína tipo Mob (Mob_Pre; PF01076) que denominamos MobSag, y un sistema toxina-antitoxina de la familia RelBE (RelB; PF04221 y RelE; PF06296). Al analizar en detalle las regiones flanqueantes al gen *mobSag*, en este trabajo también se han identificado: un putativo origen de transferencia (*oriT*), las cajas -10 y -35 de un posible promotor transcripcional, un posible sitio de unión a ribosomas (Shine-Dalgarno) y un putativo origen de replicación de cadena retrasada de tipo A (*ssrA*) (Figura 38B). Por tanto, esta región cromosómica contiene los dos componentes que caracterizan a un módulo de movilización: el *oriT_{IMErpsI}* y un gen que codifica la proteína hipotética de tipo Mob (MobSag). Este casete génico podría ser el encargado de la diseminación de este elemento mediante un mecanismo de transferencia conjugativa por movilización. Debido a que no se identificaron otros genes involucrados en la transferencia conjugativa, como el de la proteína acopladora (T4CP) o el sistema de secreción de tipo 4 (T4SS), para la transferencia del *IMErpsI* se precisaría de un elemento auxiliar que los aportase.

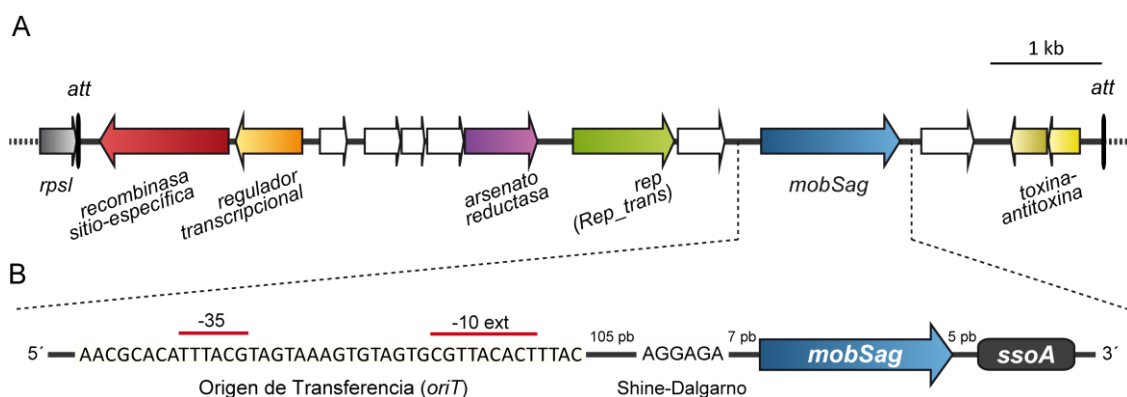


Figura 38. Organización genética del IMErpsI (9,153 pb) ubicado en el cromosoma de *S. agalactiae* HRC. **A.** Los marcos de lectura abiertos (ORFs) con funciones identificadas se representan con flechas coloreadas mientras que los de función desconocida se indican con flechas blancas. La localización de los sitios reconocidos por la recombinasa sitio-específica y que delimitan el IME (*attachment sites*, *att*) se muestran con dos líneas negras. **B.** Mapa detallado del módulo de movilización (1,555 pb) del IMErpsI. Se muestran la secuencia del origen de transferencia (*oriT*), Shine-Dalgarno, el gen *mobSag* (1,257 bp), y el origen de replicación de cadena retrasada tipo A (*ssoA*). Sobre la secuencia del origen de transferencia (*oriT*) las cajas -10 extendida y -35 del posible promotor (líneas rojas).

4.1.1. Escisión y circularización del IMErpsI

El primer paso para la movilización de un elemento integrado en cromosoma es su escisión y subsecuente circularización. Este proceso se llevaría a cabo a través del reconocimiento por parte de la recombinasa de los sitios de recombinación sitio-específica (*att*) que flanquean el IMErpsI. El abordaje experimental para la identificación de estas formas extracromosómicas se realizó a través de una estrategia de PCR, usando un par de cebadores que anillan de forma divergente dentro del IMErpsI. De esta forma, sólo se obtendría un producto de amplificación en el caso de existir formas circulares del elemento (Figura 39A). Además del aislado HRC, se seleccionaron diez estirpes de *S. agalactiae* representativas de distintos grupos filogenéticos: Spain-IP-33, H36B, CCH208800879, 2603V/R, 18RS21, BM132, Spain-54, NEM316, Madagascar-IP-7 y COH1 (Tabla 2). La estirpe COH1, al carecer de IMErpsI en su genoma, se usó como control negativo; mientras que la estirpe NEM316, en la que previamente se habían identificado formas extracromosómicas de IMErpsI (Brochet et al, 2008a), se usó como control positivo. Cuando los distintos cultivos alcanzaron una DO de 0.5, se llevó a cabo la extracción de DNA genómico (Métodos 3.2.). Para las amplificaciones por PCR se usó la misma cantidad de DNA de cada estirpe y la pareja de cebadores cIME (Tabla 5), de forma que la aparición de una banda de 500 pb indicaría la presencia de formas escindidas. La identidad de los productos de amplificación fue comprobada mediante electroforesis y secuenciación. Tal como se puede apreciar en la Figura 39B, un total de ocho de las 11 estirpes

analizadas presentaron formas extracromosómicas del IMErpsI. Por tanto, las únicas estirpes donde no se detectó el elemento escindido fueron 2603V/R y Spain-54.

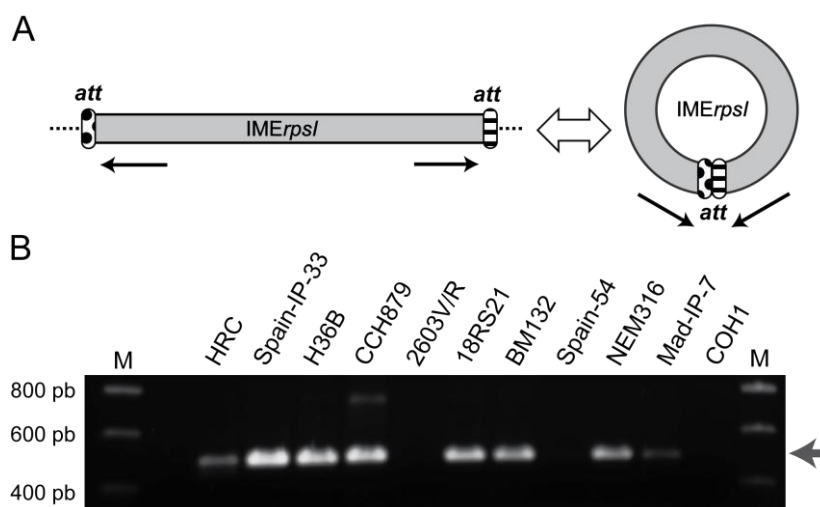


Figura 39. Identificación de formas extracromosómicas del IMErpsI en diferentes estirpes de *S. agalactiae*. **A.** Esquema de la escisión del IMErpsI del cromosoma. Los cebadores usados para la detección de formas circulares se indican con flechas negras. **B.** Análisis electroforético de los productos de PCR para la detección de formas circulares de IMErpsI en diferentes estirpes de *S. agalactiae*. Las reacciones de amplificación incluyeron 500 ng de DNA genómico de cada una de las estirpes y los cebadores cIME-F y cIME-R (Tabla 5). Se incluyó una estirpe como control positivo (NEM316) y otra como control negativo (COH1). El nombre de las estirpes CCH208800879 y Madagascar-IP-7 se encuentra abreviado en la figura como CCH879 y Mad-IP-7, respectivamente. La letra 'M' muestra la posición del marcador de pesos moleculares.

4.1.2. Transferencia por movilización de IMErpsI

Una vez comprobada la capacidad de escisión del IMErpsI en nuestra estirpe de interés, HRC, se decidió analizar su habilidad para transferirse mediante conjugación entre bacterias. Para ello se emplearon las herramientas disponibles en nuestro laboratorio para el análisis de transferencia plasmídica entre neumococos (Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009a; Nieto & Espinosa, 2003). Se clonó el módulo de movilización del IMErpsI ($oriT_{IMErpsI}$, *mobSag* y *ssoA*) de la estirpe HRC en el plásmido pMV158, empleando una estrategia combinada tal como se detalla a continuación. Primero, se eliminó el módulo de movilización de pMV158 ($oriT_{pMV158}$, *mobM* y *ssoA*) y se incluyó una diana *StuI* en su lugar, dando lugar al plásmido pMVS (Figura 40; Tabla 4). Después se clonó el módulo de movilización cromosómico en la diana de extremos romos *StuI* de pMVS. De entre los dos plásmidos recombinantes resultantes (con el inserto clonado en las dos orientaciones posibles), se seleccionó el que presentaba el módulo de movilización en la misma orientación que pMV158 (5'- $oriT_{pMV158}$ -*mobSag*-*ssoA*-3'). Este plásmido, que se denominó pMVSag (Figura 40; Tabla 4), presentará

las funciones replicativas de plásmido pMV158 y las funciones movilizativas del *IMErpsI*.

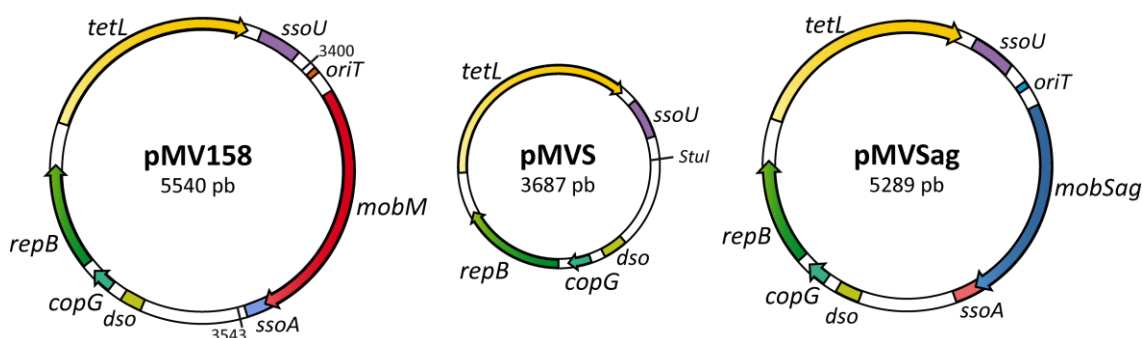


Figura 40. Mapa genético del plásmido pMV158 y sus derivados pMVS y pMVSag. La región que contiene los orígenes de replicación de cadenas líder (*dso*) y retrasadas (*ssoA* y *ssoU*), además del origen de transferencia (*oriT*), se indican con rectángulos. Los genes y su dirección de síntesis se indican con flechas: *copG* y *repB* encargadas de la replicación y su control, *tetL* involucrada en la resistencia al antibiótico tetraciclina, *mobM* y *mobSag* que codifican las proteínas de movilización MobM y MobSag (respectivamente). Las líneas negras en pMV158 (coordenadas 3400-3543) delimitan la región que ha sido deletada para construir el plásmido pMVS. El sitio de restricción *StuI* generado en pMVS también se indica sobre el mapa de este plásmido.

En los ensayos de transferencia conjugativa se usó como estirpe donadora *S. pneumoniae* 708, auxótrofa para maltosa y portadora del plásmido pAM β 1 (autotransferible); en la que se introdujo, por separado, cada uno de los plásmidos a ensayar: pMVS, pMVSag o pMV158 (Figura 40). La cepa *S. pneumoniae* MP3008 (resistente a novobiocina) fue la elegida como receptora. Las conjugaciones se realizaron en filtros de 0.22 μ m (Millipore) sobre placas de AGCH-agar que contenían además DNasa I para descartar la posible adquisición de DNA por transformación (véase Métodos 9.1.).

La Tabla 10 resume las frecuencias de conjugación obtenidas con cada uno de los plásmidos. La eficiencia de transferencia de pMVSag, aun siendo menor que la de pMV158, indicó que el módulo de movilización del *IMErpsI* es funcional *in vivo*. Además, el hecho de no recuperar ningún transconjugante en los mismos ensayos realizados con el plásmido pMVS (que carece de *oriT* y gen *mob*), probó que los elementos necesarios para la movilización de pMVSag por el plásmido pAM β 1 se encuentran en la región cromosómica clonada.

Tabla 10. Transferencia conjugativa de los plásmidos pMVS, pMVSag y pMV158.

Plásmido	Frecuencia de movilización conjugativa ^a
pMVS	N.D.
pMVSag	$1.5 (\pm 5) \times 10^{-5}$
pMV158	$2.2 (\pm 3) \times 10^{-4}$

^aLas estirpes donadora y receptora usadas fueron *S. pneumoniae* 708 con el plásmido auxiliar pAM β 1 y *S. pneumoniae* MP3008, respectivamente. Las frecuencias de movilización se expresan como el ratio entre el número de células transconjugantes y el número de células receptoras, con las desviaciones estándar entre paréntesis. N.D. No detectado.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MobSag DEL IMErpsI

Al igual que en los ensayos de movilización, para la caracterización de la proteína codificada por el gen *mobSag* se usó la estirpe HRC de *S. agalactiae* (Tabla 2). La proteína cromosómica MobSag tiene 418 aminoácidos y una masa molecular estimada de 48.6 kDa. Por homología con otras proteínas de la familia Tra/Mob (Francia et al, 2004a; Garcillán-Barcia et al, 2009) se vio que presentaba una región N-terminal muy conservada. De hecho, la comparación entre las secuencias aminoacídicas de esta región de MobSag con las de otras relaxasas de la familia MOB_{V1} (Figura 41), permitió identificar en esta nueva relaxasa los tres motivos característicos de la familia (Garcillán-Barcia et al, 2009): i) motivo I (HxxR) de función desconocida, ii) motivo II (NY(D/E)L) con el teórico residuo catalítico, y iii) motivo III (HxDEx(T/S/N)PHUH) encargado de coordinar un catión divalente. La mitad N-terminal de MobSag, por tanto, contiene los motivos que podrían estar encargados de reconocer y cortar sobre el DNA sustrato (Figura 41). Por otra parte, en la región C-terminal de esta proteína también se identificó una cremallera de leucinas (residuos 346-367: LSQENRKLKDKVKMLDEQVKIL), también presente en MobM_{pMV158} (de Antonio et al, 2004; Grohmann et al, 2003) y que podría estar implicada en interacciones proteína-proteína (Figura 41A).

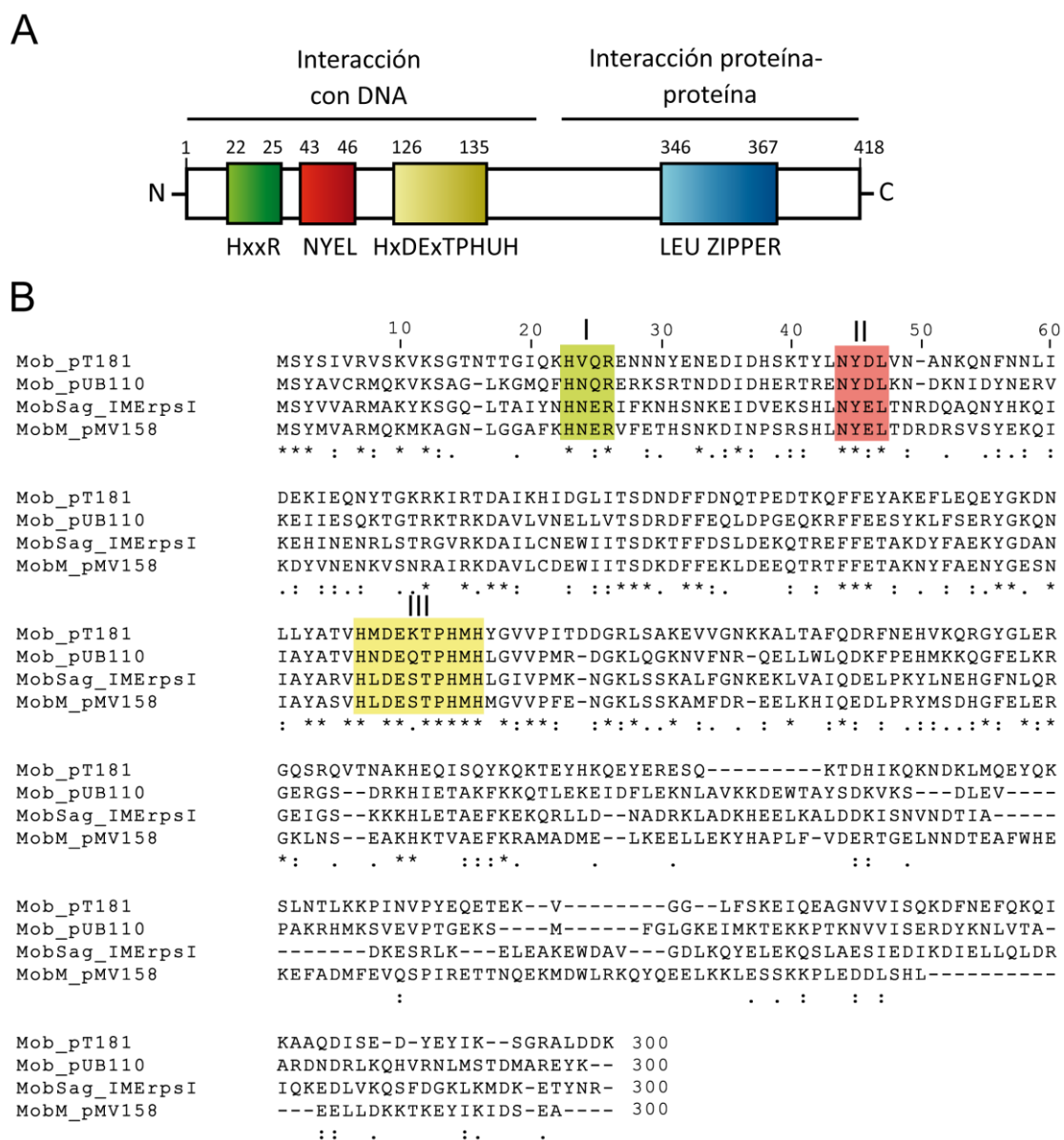


Figura 41. Dominios conservados de la proteína MobSag. **A.** La región N-terminal contiene los tres dominios típicos de la familia de relaxasas MOB_{V1} (Garcillán-Barcia et al, 2009) que podrían estar involucrados en interacción y procesamiento del DNA. El dominio C-terminal presenta una cremallera de leucinas (*Leu zipper*), probablemente involucrada en interacciones proteína-proteína. Las posiciones de los residuos de cada dominio y del inicio y fin de proteína se indican en la parte superior. **B.** Alineamiento múltiple de la región N-terminal (1-300) de la proteína MobSag y varias relaxasas representativas de la familia MOB_{V1} . Se muestran las secuencias de los primeros 300 aminoácidos N-terminales de las relaxasas: MobSag del *IMErpsI* de la estirpe HRC, MobM del plásmido pMV158 (AAA25387.1), Mob de pT181 (NP_040472.1) y Mob de pUB110 (ACC96134.1). Se indican los tres motivos conservados de la familia MOB_{V1} con cuadros de color (I, II y III). El alineamiento se realizó con el programa Clustal Omega (Tabla 7).

4.2.1. Purificación de la proteína MobSag

Para la purificación de la proteína MobSag se clonó el gen *mobSag* del IME $rpsI$ en el vector de sobreexpresión pET-24b de *E. coli*, obteniendo así el plásmido pMobSag (véase Métodos 3.6.3.1.). Este sistema de expresión es el mismo que el usado en el caso de MobMN243 (Capítulo 2); donde el promotor $\Phi 10$ del fago T7 reconocido específicamente por la T7-RNAP es el que controla la expresión de la proteína diana. La estirpe *E. coli* BL21(DE3), que contiene integrada una copia del gen de la T7-RNAP bajo el promotor inducible por IPTG *lacUV5*, fue transformada con el plásmido recombinante pMobSag (Tabla 4). Para optimizar la producción, tras la inducción de la proteína con IPTG se añadió rifampicina, que inhibe específicamente la RNAP de *E. coli* pero no la T7-RNAP (Studier & Moffatt, 1986). La inducción proteica se analizó mediante SDS-PAGE en muestras obtenidas antes y después de la adición de IPTG y rifampicina a los cultivos. En las muestras inducidas se observó una banda con mayor intensidad que presentaba una movilidad electroforética que correspondía con la masa molecular teórica esperada para MobSag (48.6 kDa).

La estrategia de purificación de MobSag se basó en el protocolo puesto a punto para MobMN199 (Lorenzo-Díaz et al, 2011), usado también para la versión MobMN243 (Capítulo 2). Este método se basa en una precipitación de los ácidos nucleicos con PEI (un polímero catiónico), seguido de un paso de cromatografía de afinidad (heparina), y una cromatografía de filtración en gel (véase Métodos 6.1.).

La secuenciación del extremo amino terminal mediante degradación de Edman confirmó la identidad de la proteína purificada. Los primeros 10 aminoácidos coincidieron con la secuencia esperada para MobSag si se excluye la metionina inicial (SYVVARMAY). Con ayuda del servidor ProtParam (Tabla 7) se estimaron otros parámetros de la proteína como el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 34380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; equivalente a $A_{280,0.1\%} = 0.708 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) o el punto isoeléctrico ($pI = 9.02$), resultado de 69 residuos cargados negativamente y 77 positivamente. Este valor básico de punto isoeléctrico es frecuente en proteínas de unión a DNA. A su vez, para obtener una idea aproximada del tamaño/forma de la proteína, comparamos el perfil de elución en filtración en gel obtenido con MobSag con el de su homóloga MobM eluída en las mismas condiciones (Figura 42A) y con los de varios estándares proteicos con radios de Stokes conocidos (Figura 42B). A partir de los volúmenes de elución de MobM y MobSag se pudieron calcular sus valores de coeficientes de partición K_{av} (véase Métodos 7.6.); con los que se pudieron inferir los radio de Stokes correspondientes para cada una: 43 Å MobSag y 46 Å MobM. Tanto MobM como MobSag presentaron un radio muy cercano al de la proteína alcohol deshidrogenasa

(45 Å), cuyo peso molecular es de 150 kDa. Mediante ultracentrifugación analítica se demostró que proteína MobM es un dímero en solución (115.7 kDa) (de Antonio et al, 2004). Teniendo en cuenta estos datos y la diferencia de tamaño entre MobM y MobSag, todo parece indicar que el comportamiento en solución de MobSag también se acerca al de un dímero (valor teórico 97.2 kDa).

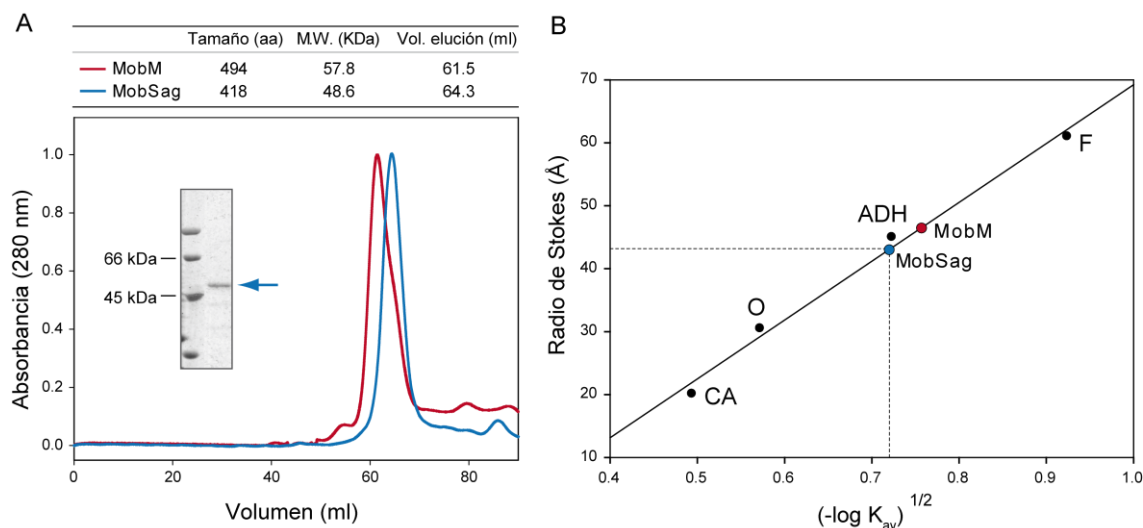


Figura 42. Cromatografía de filtración en gel de MobM y MobSag. **A.** Perfil de elución de las fracciones proteicas de MobM y MobSag obtenidas tras la cromatografía de afinidad y aplicadas en tampón A (Tabla 6) con 500 mM de NaCl en una columna Superdex-200 (GE-Healthcare) y a un flujo isocrático de 0.5 ml/min. En la tabla superior se indican el tamaño (número de aminoácidos), masa molecular y volumen de elución de cada proteína. La imagen interior muestra el análisis 12% SDS-PAGE de las fracciones puras concentradas de MobSag (flecha) junto a un marcador de masa molecular. **B.** La columna Superdex-200 fue calibrada con varias proteínas con radio de Stokes y masa molecular conocidos: ferritina (F; 61 Å, 440 kDa), alcohol deshidrogenasa (ADH; 45 Å, 150 kDa), ovalbúmina (O; 30.5 Å, 43 kDa) y anhidrasa carbónica (CA; 20.1 Å, 29 kDa). Cada proteína se preparó según las recomendaciones de la casa suministradora; eluyéndose con el mismo tampón y flujo usados en el panel (A).

4.2.2. Análisis de la estructura secundaria de MobSag

La estructura secundaria de MobSag se analizó primero mediante métodos computacionales basados en la secuencia aminoacídica de la proteína, y se contrastó luego de forma experimental por análisis de dicroísmo circular. Según los programas de predicción utilizados (Tabla 11), MobSag presenta un alto contenido en hélices- α (más del 65%) frente a cadenas- β (7%). La distribución de los elementos predichos con el programa SABLE (Adamczak et al, 2005) se muestran sobre la secuencia de la proteína MobSag en la Figura 43A. Se aprecia una alternancia de hélices- α y cadenas- β en la región N-terminal, lo cual es típico del dominio relaxasa de las proteínas de la familia HUH (Chandler et al, 2013).

Para confirmar las predicciones de estructura secundaria, se realizó un análisis por dicroísmo circular de la proteína. Para ello se recogió el espectro de MobSag (20 μM) en un rango de longitudes de onda de 185 a 260 nm (UV lejano) a 4°C, presentó dos mínimos de elipticidad a 208 y 222 nm (Figura 43B), característico de proteínas con alto contenido en hélice- α . Mediante la deconvolución de los datos registrados con varios programas (SELCON3, CONTIN CDDSTR, K2D) se pudo determinar la composición en estructura secundaria, estableciendo un consenso que se acerca a la estimación inicial del análisis bioinformático basado en la secuencia aminoacídica (Tabla 11).

Tabla 11. Contenido en estructura secundaria de MobSag.

		Hélice- α	Cadena- β	Giros	Desordenado
Programa predicción	SABLE	66.9	7	N.D.	26.1
	JPred3	66.9	8.6	N.D.	24.5
	PSIPred	66.2	5.8	N.D.	28
	PredictProtein	73.9	7.2	N.D.	ND
Media \pm D.E.		68.5\pm3.6	7.2\pm1.1	N.D.	26.2\pm1.8
Método deconvolución	SELCON3	42.7	15.3	46.6	25.5
	CONTIN	53.8	7.9	33.4	4.9
	CDSSTR	62	10	13	15
	K2D	63	6	N.D.	
Media \pm D.E.		55.4\pm9.4	9.8\pm4	31.0\pm16.9	15.1\pm10.3

Los datos y las desviaciones estándar se expresan en porcentaje. D.E. Desviación Estándar; N.D. No determinado.

Por otro lado, los análisis por dicroísmo circular a diferentes temperaturas nos permitieron estudiar la estabilidad térmica de MobSag. La desnaturalización proteica en respuesta a cambios de temperatura produce cambios en la elipticidad que se pueden registrar mediante este método. Estas variaciones se midieron en el UV lejano (190-260 nm) a temperaturas de 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C con una velocidad de 50°C/h. La proteína MobSag presentó una pérdida de elipticidad apreciable a partir de los 30°C, siendo ésta mucho más acentuada a partir de los 40°C (Figura 44). Tras alcanzar el máximo de temperatura (90°C), la muestra se enfrió hasta la temperatura inicial (4°C) y se recogió otro espectro (línea discontinua, Figura 44). En éste, se observa una recuperación parcial en la señal de dicroísmo, equivalente al espectro obtenido a 50°C durante la desnaturalización térmica.

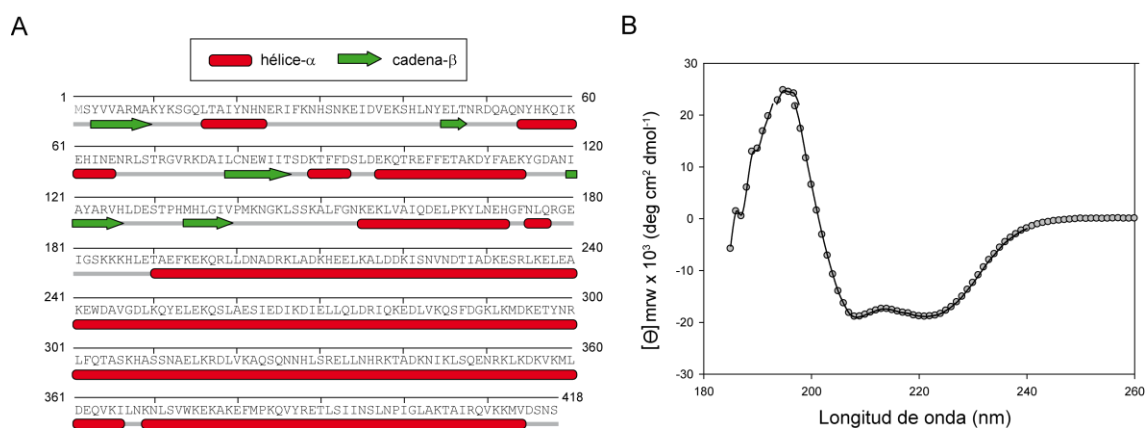


Figura 43. Análisis de la estructura secundaria de MobSag. **A.** Predicción *in silico* de la distribución de los elementos de estructura secundaria según el programa SABLE (Adamczak et al, 2005) indicando la secuencia aminoacídica (las hélices- α en rojo y cadenas- β en verde). **B.** Espectro de dicroísmo circular de MobSag (20 μM) a 4°C en la región de ultravioleta lejano (185-260 nm). Los datos se obtuvieron con una cubeta de cuarzo de 0.2-mm de paso óptico y en tampón DC (Tabla 6). Cada espectro es el resultado de 4 acumulaciones con una velocidad de barrido de 50 nm/min. La señal de fondo se corrigió mediante sustracción del espectro obtenido con tampón DC en las mismas condiciones. Los datos experimentales (esferas grises) se ajustaron usando el método CDSSTR (línea negra continua).

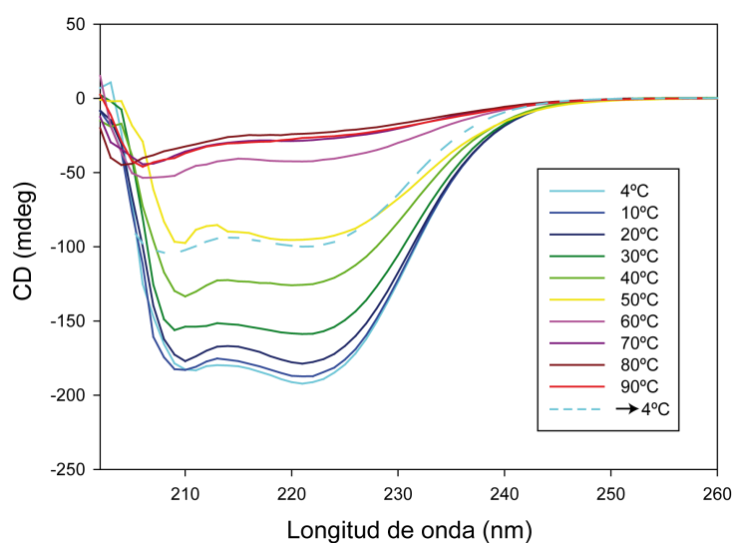


Figura 44. Análisis de la estabilidad térmica de MobSag. Se midieron los cambios en la estructura secundaria de MobSag (en base a los cambios de elipticidad a 218 nm) con los cambios de temperatura. Se recogió el espectro en el ultravioleta lejano (190-260 nm) de la proteína (20 μM) durante los procesos de desnaturalización térmica (líneas sólidas) y renaturalización (muestra calentada y enfriada a 4°C; línea discontinua). Para la recolección de estos datos se usó una cubeta de cuarzo de 1-mm de paso óptico y tampón DC (Tabla 6).

4.2.3. Análisis de la actividad relaxasa de MobSag

La función de las relaxasas comienza con el reconocimiento del *oriT* sobre el DNA circular superenrollado, donde realizan un corte específico de secuencia y cadena para iniciar la transferencia conjugativa. Como resultado de este corte, el DNA pierde su superenrollamiento y pasa a estar relajado. Por tanto, para caracterizar la actividad relaxasa de MobSag, se realizaron ensayos donde se midió la capacidad de la proteína para relajar el plásmido pMVSag (Figura 40). Este plásmido contiene el *oriT*_{IMErpsI}, que se encuentra localizado a 114 pb *upstream* del codón de inicio del gen *mobSag* y cuya secuencia abarca 42 pb y tiene un % en A+T del 64%, cercano al contenido total en el genoma (65%). Si comparamos la secuencia de este origen con la del presente en el plásmido pMV158 (*oriT*_{pMV158}), vemos que ambos contienen tres repeticiones invertidas parcialmente solapantes (IR1, IR2 e IR3; Figura 45A).

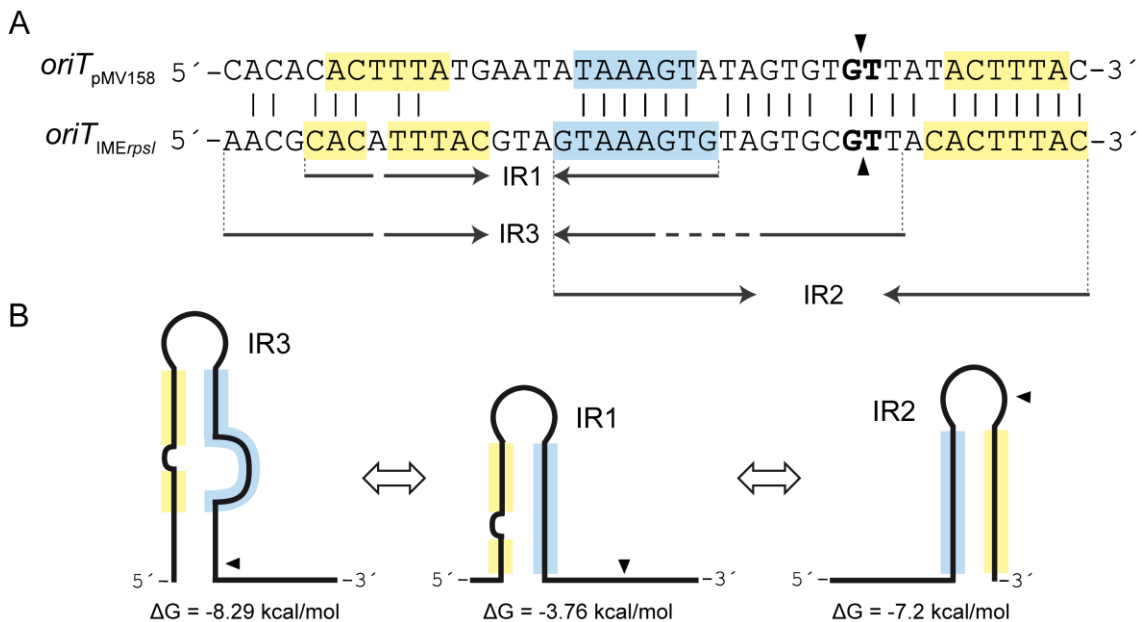


Figura 45. Origen de transferencia del IMErpsI (*oriT*_{IMErpsI}). **A.** Alineamiento de las secuencias de la cadena transferente (líder) del *oriT*_{pMV158} y *oriT*_{IMErpsI}. En amarillo se muestran las repeticiones directas a ambos lados del *oriT* y en azul la repetición invertida central. Las flechas indican las posibles repeticiones invertidas (IR1, 2 y 3) que se encuentran en *oriT*_{IMErpsI}. La posición del dinucleótido GT de corte demostrado para pMV158 (Guzmán & Espinosa, 1997), y predicho para IMErpsI, se indican con una punta de flecha. **B.** Representación de las posibles estructuras secundarias (IR1, 2 y 3) que se pueden formar en la cadena transferente (líder) del *oriT*_{IMErpsI}, calculadas con el programa *mfold* (Tabla 7). La posición del sitio de corte predicho se indica con una punta de flecha.

De forma análoga a lo que ocurre en pMV158, el *oriT*_{IMErpsI} contiene una secuencia de 8 pb (5'-CACTTTAC-3') que se encuentra repetida en el brazo izquierdo del IR1/IR3 y el derecho del IR2; y cualquiera de estas dos secuencias podrían aparear con la repetición invertida central 5'-GTAAAGTG-3' para formar distintas

estructuras secundarias (Figura 45A). La Figura 45B representa las posibles estructuras tallo-lazo que adoptarían las tres repeticiones invertidas del *oriT*_{IME_{rpst} y que podrían estar involucradas en la interacción con la proteína MobSag.}

Dentro de la secuencia 5'-GTGCGT-3' del *oriT*_{IME_{rpst}, conservado en los *oriT*s de la familia de relaxasas MOB_{V1} (Capítulo 1), el tercer dinucleótido 'GT' se postula en este trabajo como el sitio de corte para MobSag (Figura 45A). Para los ensayos de actividad *in vitro*, la proteína MobSag se incubó con plásmido superenrollado pMVSag (Figura 40) en tampón B (Tabla 6) que contenía 8 mM de catión Mn⁺²; es decir, con condiciones similares a las descritas para MobM (Lorenzo-Díaz et al, 2011). El gel de la Figura 46A muestra el resultado de estas reacciones con cantidades crecientes de proteína, donde se observa que el corte es proporcional a la dosis de enzima empleada. La máxima actividad se obtuvo con una relación molar DNA:proteína de 1:6. Como control también se incluyó una muestra en la que se usó como sustrato un plásmido que carecía de *oriT* (pMVS; Figura 40). En este caso no se observó relajación, confirmando que la actividad relaxasa de MobSag es específica de secuencia. Debido probablemente a un equilibrio entre las reacciones de corte y cierre de las relaxasas, la proporción de moléculas de DNA superenrollado relajadas descrita para otras proteínas como MobM_{pMV158} o TrwC_{R388} no supera el 65% (Fernández-López et al, 2013a; Llosa et al, 1995; Varsaki et al, 2003). En el caso de MobSag se observa una eficiencia de corte mayor del 80% (Figura 46A). Esto podría indicar que la reacción de corte de MobSag se encuentra favorecida frente al cierre, al menos bajo las condiciones de ensayo utilizadas en este trabajo.}

Respecto a otros parámetros de la reacción, como tiempo y temperatura, se vio que ambos afectaban a la actividad de la proteína (Figura 46B). Las condiciones óptimas se encontraron combinando tiempos de incubación de 20 minutos y una temperatura de 50°C. Esta elevada temperatura de actividad difiere de la descrita para otras relaxasas como las anteriormente mencionadas MobM_{pMV158} o TrwC_{R388}, con temperaturas óptimas cercanas a la fisiológica (37°C) (de Antonio et al, 2004; Llosa et al, 1995). En cambio, se acerca las temperaturas óptimas de MbeA_{ColE1} (Varsaki et al, 2003) o TraA_{pIP501} (Kopeck et al, 2005), próximas a los 45°C. La causa de este efecto podría ser que una mayor temperatura favorezca, o bien la extrusión de alguna de las estructuras secundarias en el *oriT*_{IME_{rpst} reconocida por la proteína para el corte, o bien cambio en la conformación de la proteína que ayude al reconocimiento y/o corte del sustrato.}

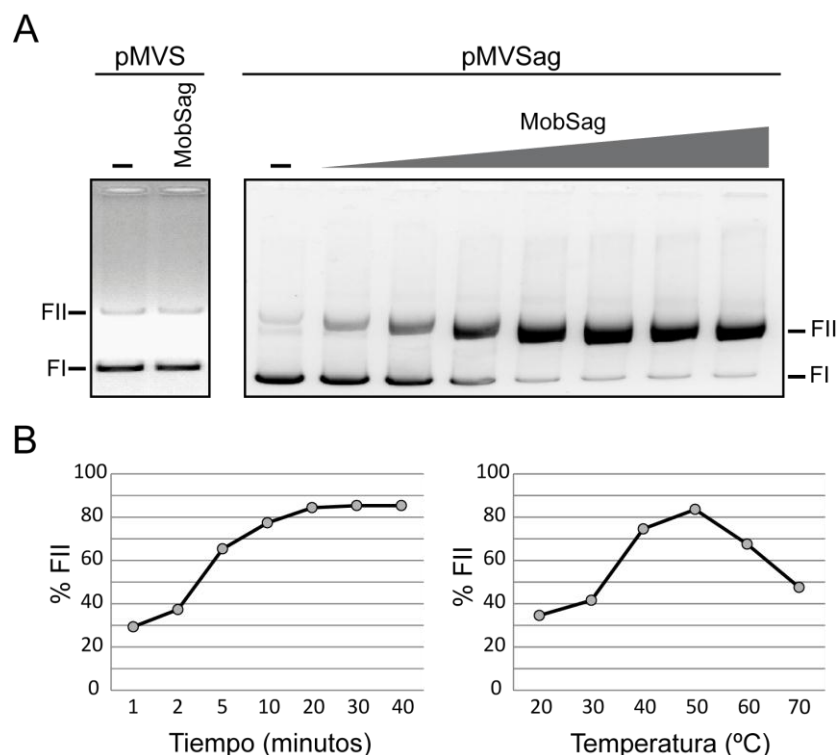


Figura 46. Caracterización de la actividad de corte de la proteína MobSag. **A.** DNA superenrollado de los plásmidos pMVS o pMVSag (8 nM) se incubaron sin (-) y con MobSag en tampón B (Tabla 6) durante 20 minutos a 50°C. Las concentraciones de proteína usadas fueron: 418 nM con pMVS (parte izquierda del gel); y 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 418 nM con pMVSag (parte derecha del gel). **B.** DNA superenrollado del plásmido pMVSag (8 nM) se incubó con 256 nM de MobSag MobSag en tampón B y: i) 50 °C y diferentes tiempos de incubación (izquierda) o ii) diferentes temperaturas y un tiempo de 20 minutos (derecha). La formación de formas relajadas del plásmido (FII) a partir de superenrolladas (FI) se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed 1X. La cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el software QuantityOne (Bio-Rad). Para el cálculo de % FII, a las cantidades de formas relajadas (FII) tras la incubación con MobSag se le restaron las obtenidas en las muestras sin tratar con proteína.

4.2.4. Determinación del sitio de corte en *oriT_{IMErpsI}*

Tal como se menciona en el apartado anterior, el *oriT_{IMErpsI}* muestra tres repeticiones invertidas (IR1, IR2 e IR3) y un dinucleótido 5'-GpT-3' que se postula como sitio de corte para MobSag (Figura 45). La determinación clásica del sitio de corte para las relaxasas se realiza mediante reacciones de *primer extension*, empleando como molde una muestra de DNA cortado por la proteína y un oligonucleótido específico marcado radiactivamente (Guzmán & Espinosa, 1997; Llosa et al, 1995). En colaboración con el Dr. Philippe Glaser, en este trabajo se ha optimizado un protocolo no radiactivo, menos laborioso y de rápida ejecución para este fin. En concreto, el sitio de corte se determinó por el método de secuenciación Sanger, usando la extensión del DNA con terminadores (ddNTPs) marcados fluorescentemente donde la secuencia nucleotídica extendida puede leerse en forma de cromatograma. El diseño de este experimento se basa en una reducción de la señal fluorescente en la

posición del nucleótido siguiente al corte producido por la relaxasa. Si el corte de la proteína es específico, tanto de secuencia como de cadena, sólo se apreciaría esta caída en la señal en una única posición y sólo en una de las cadenas. En cambio, con la secuenciación de la misma región pero de la cadena no cortada (o de una muestra del plásmido sin tratar con proteína), se obtendría un cromatograma sin variaciones significativas en la señal.

La preparación del sustrato antes de su secuenciación incluyó la incubación de 8 nM de plásmido pMVSag (Figura 40) en ausencia o presencia de proteína MobSag (256 nM) y en condiciones óptimas para el corte (50°C, 20 min). Tras la incubación y parada de las reacciones, las muestras se cargaron en un gel de agarosa preparativo que contenía GelRed 1X. La separación electroforética entre las formas relajadas y superenrolladas del plásmido, permitió extraer de gel las bandas correspondientes sólo a las formas relajadas, tanto de la muestra sin tratar como tratada con MobSag. El DNA purificado se envió al servicio Secugen S.L. (CIB, CSIC) con dos cebadores distintos para la secuenciación de ambas cadenas del plásmido.

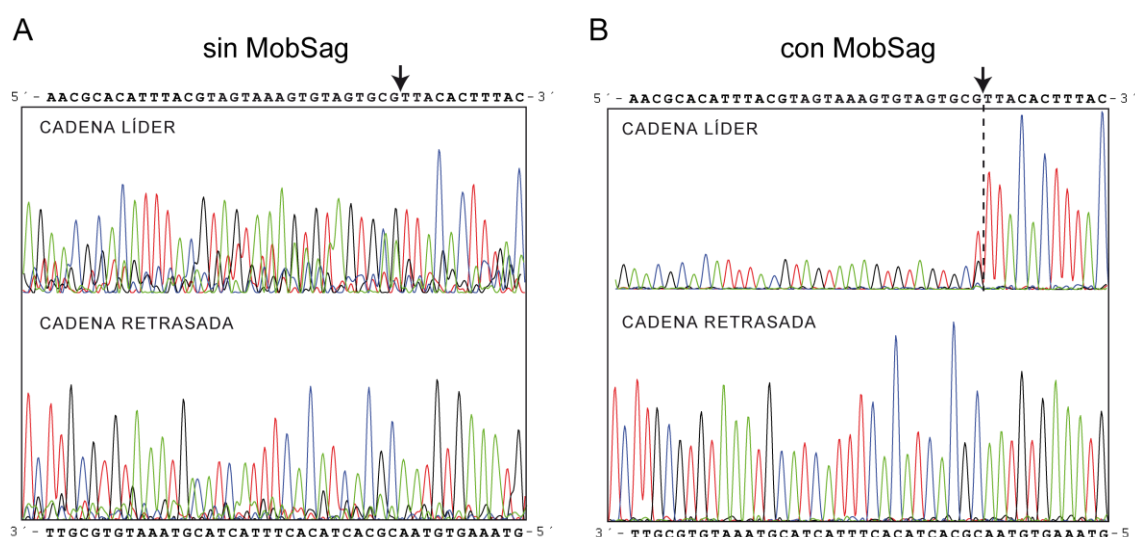


Figura 47. Cromatogramas de la secuencia de DNA del origen de transferencia de pMVSag (*oriT_{IMErpsI}*) en muestras incubadas sin (A) y con (B) MobSag. Antes de su secuenciación se incubaron 8 nM de plásmido superenrollado pMVSag sin y con (256 nM) MobSag en condiciones óptimas para el corte (véase Métodos 8.2.1.). Las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed 1X, tras lo que se purificó la banda correspondiente al plásmido relajado en las muestras sin y con proteína. La secuenciación del DNA relajado se realizó por el método de Sanger usando los cebadores nickSag-F y nickSag-R (Tabla 5), tras lo que se obtuvieron los cromatogramas con la lectura de las secuencias de ambas cadenas del plásmido (líder y retrasada). Encima y debajo de cada cromatograma se muestra la secuencia de DNA leída, donde el sitio de corte se indica con una flecha vertical y una línea discontinua.

Las secuencias de DNA obtenidas se pueden leer en los cromatogramas que se muestran en la Figura 47. Como se puede observar, en comparación con el método radiactivo, el uso de esta estrategia no supuso pérdida de resolución para definir con exactitud el sitio de corte. La baja proporción de formas relajadas de plásmido en las muestras sin proteína (debidas probablemente al estrés mecánico o la acción de otras endonucleasas), provocó que la señal cromatográfica fuese menos clara y presentase más 'ruido de fondo' (Figura 47A). Sin embargo, no se observan caídas significativas en los picos de la señal, como sí ocurre después del nucleótido G (del dinucleótido GT propuesto como sitio de corte) en la cadena líder de la muestra tratada con MobSag (Figura 47B). Por tanto, mediante este experimento se confirmó que la proteína MobSag realiza un corte específico tanto de cadena (líder) como de sitio (5'-GpT-3').

DISCUSIÓN

Promiscuidad de los plásmidos de la familia MOB_{V1}

La clasificación de plásmidos en base a las secuencias de sus relaxasas conjugativas (MOB) proporciona una perspectiva global sobre los procesos de transferencia genética mediante conjugación. El estudio de estos procesos facilita información sobre las rutas de diseminación y transmisión de resistencias a antibióticos o factores de virulencia entre bacterias (Garcillán-Barcia et al, 2009). La familia de plásmidos MOB_{V1}, representada por pMV158, se encuentra ampliamente distribuida en distintos *phyla* bacterianos, aunque se encuentra mayoritariamente en Bacteroidetes y Firmicutes (Francia et al, 2004b). A éste último pertenecen algunas de las bacterias patógenas resistentes a antibióticos con más relevancia para la salud pública, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus faecalis* (Lanza et al, 2015).

La familia MOB_{V1} se compone de plásmidos pequeños y únicamente movilizables, es decir, que carecen de otros genes asociados a la transferencia conjugativa que no sean el gen que codifica la relaxasa *mob*. A pesar de que esto podría sugerir una movilidad limitada, estos plásmidos han mostrado tener una gran plasticidad a la hora de usar distintos aparatos de conjugación (Fernández-López et al, 2014; Lorenzo-Díaz et al, 2014). Tal es así que tres de las ocho familias filogenéticas de sistemas conjugativos definidas hasta ahora (MPF_{FATA}, MPF_{FA}, MPF_T) (Guglielmini et al, 2011) son capaces de movilizar plásmidos MOB_{V1}. Concretamente, el plásmido pMV158 ha sido movilizado entre bacterias G+ con funciones provistas por plásmidos auxiliares con sistema MPF_{FATA} como pIP501 y pAMβ1 (Grohmann et al, 1999; Priebe & Lacks, 1989; van der Lelie et al, 1990), e incluso a la bacteria G- *Escherichia coli* mediante plásmidos con sistema MPF_T como RP4 y R388, pero no por el plásmido F (MPF_F) (Farías & Espinosa, 2000). Otros plásmidos, como pC194 y pUB110, han sido movilizados por elementos auxiliares con sistemas MPF_{FA} como Tn916 (Lee et al, 2012; Naglich & Andrews, 1988).

Por otra parte, dado que el *oriT*_{pMV158} es el único elemento en *cis* necesario para la transferencia del plásmido pMV158 (Farías & Espinosa, 2000), se podría asumir que cualquier plásmido que contenga un *oriT* es potencialmente movilizable. Este podría ser el caso de los plásmidos pXY3 (Zhou et al, 2010) y pCI411 (Coffey et al, 1994) (no incluidos en la Tabla 8), que sólo parecen contener un *oriT* sin presencia de gen *mob*. Este fenómeno se ha demostrado para el plásmido pWBG749 de *S. aureus*, capaz de movilizar *in trans* a otros plásmidos que contienen un *oriT* similar pero que carecen de genes tipo *mob* (O'Brien et al, 2015). Trabajos previos también demostraron que tanto

pC194, como derivados de pUB110 y pTA1060 sin *oriT* ni *mob*, son eficientemente movilizados a través del aparato conjugativo de ICEBs1 sin la intervención de la relaxasa $\text{Nick}_{\text{ICEBs1}}$, aunque requiriendo la proteína iniciadora de la replicación RC de ICEBs1 (Lee et al, 2012). Estos datos indicarían que la estrategia de búsqueda de relaxasas para detectar plásmidos MOB_{V1} podría estar infravalorando la población real de elementos móviles y sus posibilidades de transferencia.

Replicación y conjugación de plásmidos MOB_{V1} bajo una perspectiva evolutiva

La mayoría de los plásmidos MOB_{V1} replican mediante el mecanismo de círculo rodante (RCR), aunque también se han encontrado con replicación tipo *theta* o incluso integrados en transposones movilizables (Lorenzo-Díaz et al, 2014). Las relaxasas MOB_{V1} se relacionan con proteínas iniciadoras RCR de los tres subgrupos: Rep_1 (PF01446), Rep_2 (PF01719) y Rep_trans (PF02486). La comparativa de la filogenia entre las proteínas Rep y Mob de los plásmidos de la familia MOB_{V1} permitió analizar si existía alguna relación entre ellas (Figura 48). La mayoría de relaxasas codificadas en plásmidos Rep_2 RCR se agrupan en Lactobacillales mientras que las codificadas en plásmidos Rep_1 RCR se agrupan en Bacillales (Figura 48). Sin embargo, algunos iniciadores Rep_1 también se encontraron en la rama de Lactobacillales, tales como los del grupo de pSMA23 representado en la Figura 17. Dentro del grupo de pSMA23 también existen algunas excepciones: el plásmido pCD034-2 codifica una proteína Rep_2 en lugar de Rep_1, una indicación de que han podido existir eventos recientes de recombinación que condujeron a nuevas combinaciones Rep-Mob. Además, eventos anteriores de recombinación podrían haber dado lugar a reorganizaciones en los plásmidos de Bacillales de MOB_{V1} , ya que las relaxasas presentes en este grupo están relacionadas con proteínas iniciadoras de los tres subgrupos RCR (Figura 48A).

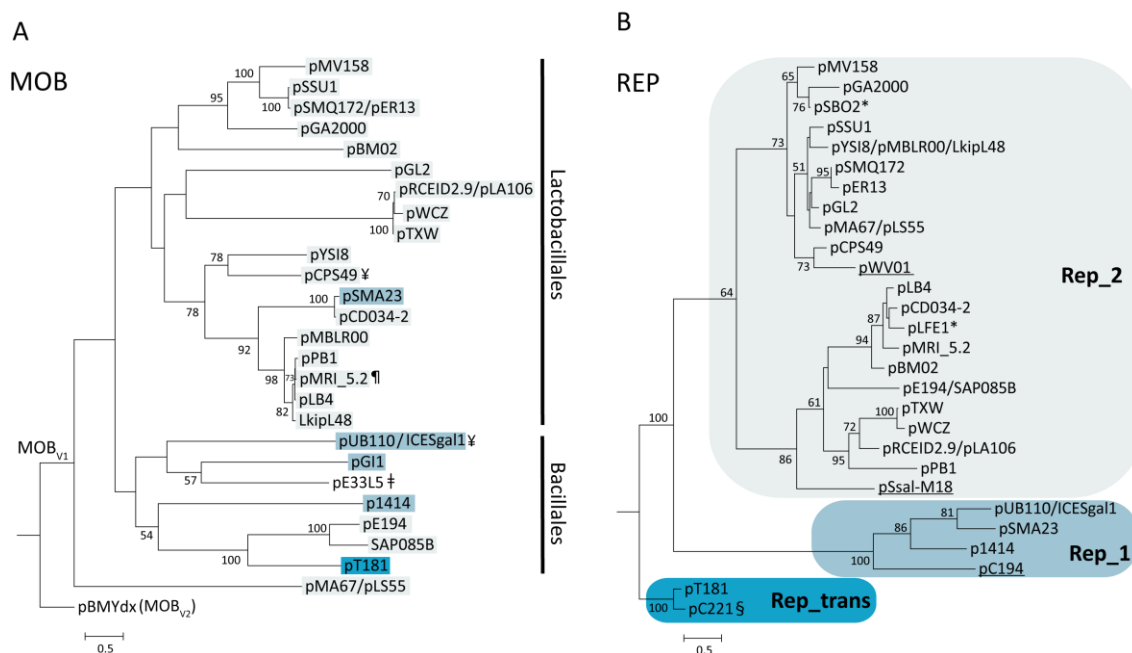


Figura 48. Filogenia de las proteínas Rep (RCR) y Mob (MOB_{V1}) de plásmidos representativos. Los plásmidos utilizados para trazar las relaciones evolutivas de sus proteínas relaxasa (Mob) y de iniciación de replicación (Rep), así como los detalles para la construcción de los árboles filogenéticos, se detallan en (Lorenzo-Díaz et al, 2014). **A.** Árbol filogenético de las relaxasas MOB_{V1} construido con los 300 primeros residuos del extremo N-terminal de MobM_{pMV158}. Cada plásmido se sombrió en azul según el subgrupo de proteína iniciadora RCR, tal como se indica en la leyenda del panel B. La relaxasa MOB_{V2} del plásmido pBMYdx se usó como grupo externo. Los siguientes símbolos indican: ‡, el plásmido pE33L5 no codifica un iniciador RCR sino una proteína iniciadora de la replicación tipo HTH₃₆ (PF13730); ¥, este elemento no pertenece al orden taxonómico indicado por las barras; ¶, el plásmido pMRI_5.2 también codifica una proteína RCR Rep₁. **B.** Árbol filogenético de las proteínas iniciadoras RCR representativas. Una paleta de colores azules se utiliza para indicar grupos que contienen diferentes familias RCR: Rep₁ (PF01446); Rep₂ (PF01719); y Rep_{trans} (PF02486) con los plásmidos pT181 y pC221, que se utilizaron como grupos externos para enraizar el árbol. El símbolo § indica que el plásmido movilizable pC221 codifica una relaxasa de la familia MOB_{P7} en vez de MOB_V. El asterisco (*) muestra que, de acuerdo a sus secuencias anotadas en *GenBank*, tanto pSBO2 como pLFE1 codifican relaxasas MOB_V truncadas, por lo que no se incluyeron en el árbol filogenético MOB (panel A); tampoco los plásmidos subrayados (pWV01, pSsal-M18 y pC194), ya que no codifican ninguna relaxasa. Los plásmidos pGB2001, pGB2002, pRW35 y p5580 no se incluyeron en la figura ya que tienen exactamente la misma relaxasa Mob y proteína de replicación Rep que pGA2000, representado en el árbol.

Una proporción importante (un tercio) de plásmidos MOB_{V1} codifican más de una proteína iniciadora de la replicación (algunos también más de una relaxasa) (Lorenzo-Díaz et al, 2014), lo que sugiere una alta frecuencia de formación de cointegrados plasmídicos. Precisamente, es conocida la habilidad de los plásmidos RCR que contienen relaxasas de promover la recombinación sitio-específica del DNA en el *oriT*, dando lugar a cointegrados plasmídicos durante la movilización conjugativa (Gennaro et al, 1987; Novick et al, 1984; Projan & Novick, 1988). Un ejemplo es el plásmido estafilocócico pE194, capaz de integrarse en el cromosoma de *Bacillus subtilis* mediante un mecanismo de recombinación independiente de RecA, y usando una secuencia

homóloga de solamente 6-14 pb (Dempsey & Dubnau, 1989). También se han observado indicios de fenómenos similares en una nueva familia de IMEs encontrada en estreptococos, que parecen haberse integrado mediante recombinación en el *oriT* de otros elementos conjugativos de la familia Tn916/ICESt3 (Puymege et al, 2015). El reconocimiento de *oriTs* heterólogos por parte de relaxasas MOB_{V1} (Fernández-López et al, 2013a) también podría ser un factor que favoreciese los cointegrados, potenciando todavía más la dispersión en un amplio rango de huéspedes. Estos datos indican que la recombinación parece ser una posible causa de las distintas topologías encontradas dentro de los dendrogramas de las proteínas Rep y Mob (comparativa de los paneles A y B de la Figura 48). A pesar de la ausencia de fuerte coevolución entre proteínas Rep y Mob, hay una clara tendencia a encontrar redes troncales estables Rep₂-MOB_{V1} y Rep₁-MOB_{V1} adaptadas a diferentes órdenes taxonómicos. En general, se podría pensar que los plásmidos son moléculas de DNA resultado del intercambio de varios casetes genéticos, evolucionando cada uno de forma independiente (Osborn et al, 2000). Sin embargo, los resultados de este trabajo, junto a estudios similares (Smillie et al, 2010), apuntan a que algunas combinaciones de módulos prevalecen sobre otras, sugiriendo una intercomunicación entre ellos.

A pesar de la relevancia de esta familia de plásmidos y sus huéspedes, todavía se desconocen muchos aspectos de la bioquímica de su transferencia. Sería interesante explorar el nivel de reconocimiento de *oriTs* heterólogos entre distintas relaxasas e incluso por parte de proteínas Rep RC, la formación de cointegrados, o cómo está regulada la transferencia en los casos de los plásmidos que contienen más de una relaxasa.

El dominio relaxasa de MobM

La región N-terminal de la proteína MobM (dominio relaxasa) está involucrada en su actividad endonucleasa, tanto en el reconocimiento específico como en la actividad de corte y cierre del DNA que contiene el *oriT*_{pMV158} (Fernández-López et al, 2014; Lorenzo-Díaz et al, 2011). Para el estudio de este dominio, caracterizado por tres motivos aminoacídicos conservados (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009), se construyeron varias versiones truncadas N-terminales de MobM (Figura 19). En la Tabla 12 se resumen las principales características de la proteína nativa y los derivados truncados estudiados hasta ahora.

Tabla 12. Propiedades de MobM y sus derivados truncados.

Proteína	Nº de residuos ^a	Masa molecular (Da) ^b	Estado de oligomerización	Actividad sobre DNA	
				Superenrollado (dsDNA)	Monocatenario (ssDNA)
MobM	493	57,692	Dímero	Si	Si
MobMN199	198	23,195	Monómero	Si	No
MobMN243	242	28,409	Monómero	Si	Si

^a Número de residuos aminoacídicos excluyendo la metionina1, procesada con el sistema de expresión usado en este trabajo.

^b Masas determinadas por MALDI-TOF (MobM) o ESI-MS (MobMN199 y MobMN243); sin Met1 en todos los casos.

La caracterización previa de MobM y MobMN199 mostró que estas proteínas se comportaban en solución como dímero y monómero, respectivamente (de Antonio et al, 2004; Lorenzo-Díaz et al, 2011). La versión MobMN243 estudiada en este trabajo mostró ser un monómero, lo que confirma que la región de dimerización de MobM se encuentra delimitada entre los residuos 243-494 de la región C-terminal, posiblemente a través de la cremallera de leucinas situada en esta región (317-338) (Grohmann et al, 2003).

En cuanto a la actividad catalítica, los ensayos con MobMN199 y MobMN243 mostraron que ambas proteínas mantenían la actividad endonucleasa, ya que relajaron DNA superenrollado con la misma eficiencia. Sin embargo, sólo se detectaron productos de corte usando como sustrato DNA monocatenario en el caso de MobMN243. Esto indicaría que los residuos entre 200 a 243 podrían ser importantes en el posicionamiento del DNA en el centro activo y que los requerimientos mínimos para un corte eficiente también dependen de la topología del DNA. Estos requisitos han sido analizados para otras relaxasas conjugativas de las familias MOB_F y MOB_Q. Los primeros 275 residuos de la relaxasa TrwC (plásmido R388) son capaces de catalizar el corte sobre DNA monocatenario, aunque un fragmento más largo (348 residuos) se requiere para producir el corte en sustratos de DNA superenrollado (Llosa et al, 1996). En el caso de MobA (plásmido R1162), se ha demostrado que una versión N-terminal de la proteína con 184 residuos corta tanto sobre DNA monocatenario como superenrollado (Monzingo et al, 2007).

Los análisis de estabilidad proteica mostraron que la región 200-243 de MobM, presenta una inestabilidad intrínseca que se ve incrementada en presencia de ligandos (DNA sustrato y catión). Todavía se desconoce cómo podría afectar esta degradación al proceso conjugativo, pero estudios previos han mostrado que la susceptibilidad a la degradación proteica puede estar relacionada con la flexibilidad (Tsvetkov et al, 2008).

Estos datos sugieren que los dominios N- y C-terminales de MobM estarían unidos por región flexible central que podría actuar a modo de bisagra. El aumento de la degradación de la región central tras la unión de sustrato podría deberse a una mayor exposición al solvente debido a un cambio en la conformación, que además, podría actuar como un transductor de la señal (unión de sustrato) entre los dos dominios de la proteína. Una arquitectura similar se ha visto para la proteína de replicación RepB del plásmido pMV158, compuesta por un dominio N-terminal de unión a DNA conectado mediante una región flexible al dominio de hexamerización C-terminal (Boer et al, 2009). Asimismo, la estructura de la relaxasa NES también mostró que esta proteína está dividida en dos dominios funcionales separados por una región central (Edwards et al, 2013), que comparada con la secuencia y estructura secundaria de MobM, incluiría la región C-terminal de MobMN243.

Por tanto, se podría sugerir que la región N-terminal de MobM está dividida en al menos dos subregiones, donde los primeros 190 a 200 aminoácidos son relevantes para la actividad de corte del DNA, mientras que la región de los aminoácidos 200 a 243 actuaría como un modulador de actividad y una bisagra que permite un cambio en las orientaciones relativas de los dominios N- y C-terminales de MobM durante el procesamiento del sustrato.

Nuevo mecanismo catalítico en las relaxasas MOB_v

Uno de los rasgos comunes de las relaxasas conjugativas es la presencia de una o dos tirosinas catalíticas en su centro activo. Este residuo es el encargado de realizar el ataque nucleofílico sobre el DNA, tanto en el inicio de la transferencia (corte) como en la terminación (cierre) (Lanka & Wilkins, 1995; Pansegrau & Lanka, 1996a; Pansegrau et al, 1993). La familia MOB_v, representada por MobM_{pMV158}, se ha considerado que pertenece al grupo de relaxasas con una Y catalítica (Figura 7) (Garcillán-Barcia et al, 2009). Las relaxasas de este grupo formarían un dímero funcional en la que las Ys catalíticas de cada uno de los monómeros estarían implicadas en el inicio y terminación de la conjugación, tal como se ha demostrado para la proteína Tral_{RP4} (Pansegrau & Lanka, 1996a). Publicaciones anteriores a este trabajo han propuesto que la Y catalítica de MobM se encuentra en la posición 44, en el motivo II (Figura 11) (Grohmann et al, 1999). Sin embargo, tanto la estructura como los mutantes realizados en este trabajo descartaron este papel. En el caso de la

relaxasa Mob_{pBHR1} de la subfamilia MOB_{V2}, las mutaciones puntuales de todas las Ys de la proteína no alteraron la eficiencia de movilización del plásmido (Szpirer et al, 2001). De hecho, una de las características que más llama la atención tras comparar las secuencias de las relaxasas de la familia MOB_V es la falta de una tirosina conservada entre todas ellas (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009), sosteniendo la idea de que esta familia podría presentar un mecanismo catalítico distinto.

La superposición de los residuos del centro activo de MobM con la de otras relaxasas de estructura conocida como las de la familia MOB_F (TrwC_{R388} y TraI_F) o MOB_Q (NES_{pLW043} y MobA_{R1162}) mostró una gran similitud en su organización, principalmente con la familia MOB_Q (Figura 49). Los datos obtenidos con la estructura y comprobados mediante ensayos de actividad con mutantes señalaron, de manera sorprendente, a la H22 como el residuo catalítico de MobM_{pMV158}. Este residuo se localiza en el motivo I (función desconocida hasta ahora), que junto con el motivo III (involucrado en la coordinación del metal), son los que presentan mayor grado de conservación dentro de la familia MOB_V (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009). A pesar de que no hay ninguna relaxasa descrita cuyo residuo catalítico sea una histidina, existen otras proteínas que lo usan como nucleófilo en ataques a enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, las histidina-kinasas o algunas endonucleasas de la familia de las enzimas de restricción (Besant & Attwood, 2010; Chan et al, 2011; Fersht & Kirby, 1967). Hay que tener en cuenta que el enlace entre una H y el grupo fosfato del DNA presenta propiedades distintas al mediado por la Y. Aunque todavía se desconocen las ventajas fisiológicas que podría aportar esta diferencia, se sabe, por ejemplo, que este enlace es sensible a pHs ácidos (Besant & Attwood, 2010). Esto podría estar relacionado con la abundancia de relaxasas MOB_V en bacterias G⁺ (Smillie et al, 2010). En bacterias G⁻ el espacio del periplasma no presenta mecanismos de control del pH (se encuentra al mismo pH que el medio) (Slonczewski et al, 2009), por tanto, la transferencia del DNA mediada por una relaxasa con una H catalítica podría fallar en G⁻ debido a la exposición del complejo DNA-proteína a un posible entorno ácido. Otra de las características del enlace de la histidina con el DNA es que tiene una alta energía. Esto lo hace más inestable y por tanto fácil de transferir rápidamente a un segundo sustrato (como la hebra de DNA en la reacción de cierre) (Kee & Muir, 2012; Robinson & Stock, 1999). Dado que las relaxasas MOB_V suelen encontrarse seleccionadas evolutivamente en plásmidos de pequeño tamaño (Smillie et al, 2010), se podría hipotetizar que la H facilitaría la reacción de cierre del DNA en este tipo de sustratos, ya que con plásmidos grandes, el complejo DNA-proteína sería

más susceptible de rotura durante el proceso de transferencia del DNA (al ser éste más prolongado).

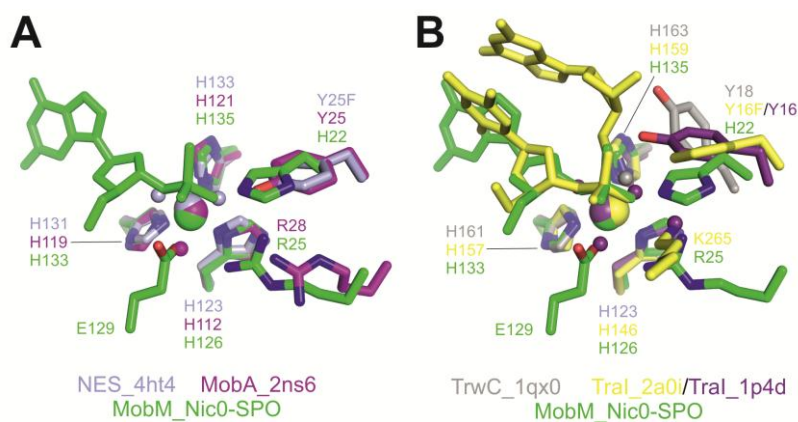


Figura 49. Superposición del centro activo de MobM (Nic0-SPO) con el de otras relaxasas. A. Comparación con la familia MOB_Q de relaxasas con una sólo tirosina en el centro activo (NES y MobA de los plásmidos pLW1043 y R1162, respectivamente). **B.** Comparación con la familia de relaxasas MOB_F con dos tirosinas en el centro activo (TrwC y Tral de los plásmidos R388 y F, respectivamente). Los códigos PDB de cada estructura se indican en la figura excepto para MobM (Nic0-SPO; PDB: 4LVL). Figura cedida por R. Pluta (Pluta, 2014).

Coordinación entre los módulos de replicación y conjugación en plásmidos movilizables RCR

Los plásmidos movilizables que replican por círculo rodante suponen un modelo interesante ya que contienen dos proteínas con actividad de tipo topoisomerasa (Rep y Mob/Tra) que son capaces de cortar y relajar scDNA en dos regiones distintas de la misma molécula (*oriT* y *dso*, respectivamente). Esto supone que la actividad de una de las proteínas sobre el plásmido superenrollado excluye a la otra de cortar su sustrato y viceversa. Por tanto, este tipo de plásmidos deben presentar algún tipo de mecanismo que coordine ambos procesos (Zechner et al, 2000).

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que los módulos de replicación-control (LIC) y movilización (MOB) del plásmido pMV158 están comunicados a través de la proteína MobM. Resultados previos habían demostrado que MobM es capaz de regular su expresión a través de la unión a su propio promotor (Lorenzo-Díaz et al, 2012). En el presente trabajo se ha visto que MobM se une a una región que incluye el promotor *PctII*, inhibiendo la transcripción del RNAlI (Figura 50). La secuencia del

RNAII es complementaria a una región intergénica del RNA mensajero *copG-repB* que incluye las señales para la iniciación de la traducción de RepB (cuya síntesis está desacoplada a la de CopG) (del Solar et al, 1997; Lopez-Aguilar et al, 2015; López-Aguilar et al, 2013). Por tanto, la disminución en la síntesis de RNAII mediada por MobM, permite un aumento en la traducción de la proteína iniciadora de la replicación RepB y, consecuentemente, un incremento en el número de copias plasmídicas. Estos resultados corroboran observaciones previas del laboratorio en la diferencia del número de copias entre pMV158, 31 copias por célula, respecto a su derivado pLS1, con 22 copias (Hernández-Arriaga et al, 2012; Lorenzo-Díaz & Espinosa, 2009b). El plásmido pLS1 es un derivado de pMV158 que carece de un fragmento de 1.1 kb que contiene el módulo MOB (Lacks et al, 1986; Priebe & Lacks, 1989; Stassi et al, 1981). La ausencia de la proteína MobM en pLS1 supondría que los niveles de RNAII fueran mayores, de manera que el número de copias plasmídicas disminuye por la reducción en la síntesis de proteína RepB.

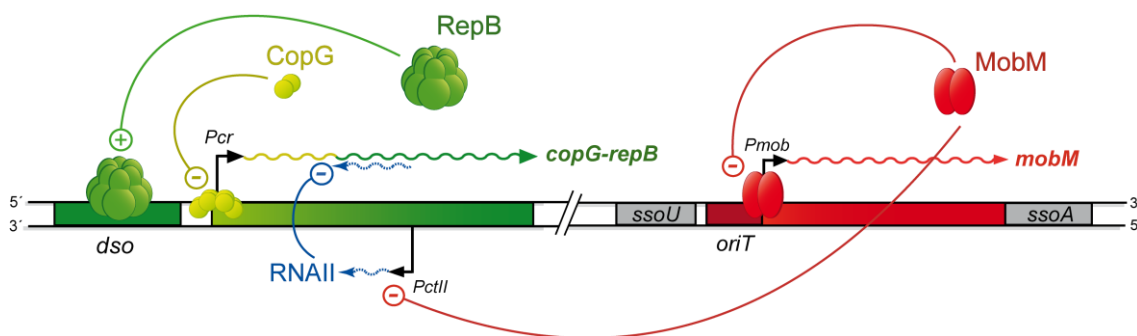


Figura 50. Integración de los circuitos de regulación del módulo de movilización y replicación-control del plásmido pMV158. CopG y RepB se transcriben en el mismo mRNA. CopG se une a su DNA diana, y reprime la transcripción de *Pcr*, inhibiendo su propia síntesis y también la de RepB. El RNAII es complementario a una región que incluye las señales necesarias para la síntesis de RepB, por lo que actúa como un regulador negativo a nivel traduccional. Cuando MobM se une a la región promotora del RNAII, inhibe la síntesis de RNAII y aumenta la traducción de RepB, consecuentemente se incrementa el número de copias plasmídico en la célula.

Existen otros sistemas en los que se ha demostrado la comunicación entre diferentes módulos de un mismo plásmido. Por ejemplo, se ha visto que el sistema de estabilidad *stbABC* del plásmido R388 no sólo interviene en el mantenimiento del plásmido, sino que también está involucrado en la conjugación del mismo (Guynet et al, 2011). En concreto, la delección del gen *stbA* provoca una disminución en la frecuencia de la transferencia conjugativa y un aumento en la tasa de pérdida del plásmido, mientras que la delección de *stbB* anula por completo la conjugación pero sin afectar a la estabilidad. En el caso del plásmido R1, se ha demostrado que el módulo

de mantenimiento toxina-antitoxina (*kis-kid*) es capaz de modular la replicación del plásmido (Lopez-Villarejo et al, 2015). En este sistema, es la antitoxina Kis la encargada de actuar como intermediaria entre los dos módulos cuando el número de copias plasmídicas decae.

Los plásmidos pequeños de alto número de copias como pMV158, no presentan sistemas de reparto (*active partitioning systems*), por lo que su herencia en la división bacteriana se supone dependiente de una repartición al azar (Reyes-Lamothe et al, 2014). El aumento en el número de copias de pMV158 mediado por MobM, podría favorecer la herencia de plásmido en las células hijas y además, aseguraría sustrato para los procesos de replicación y conjugación. De esta manera, MobM contrarrestaría la pérdida de copias plasmídicas por falta de replicación (las moléculas relajadas por MobM no podrían replicar) y/o por la transferencia a nuevas células (quedaría sólo una cadena, en principio improductiva para la replicación). Aunque no es necesario para la transferencia conjugativa (Kingsman & Willetts, 1978), no se puede descartar que MobM sea capaz de iniciar la replicación RC desde el extremo 3'-OH del DNA que genera tras su corte sobre el *oriT*. Este fenómeno se ha demostrado, por ejemplo, para el ICEBs1, un elemento aislado de *Bacillus subtilis* y cuya relaxasa NickK inicia tanto la conjugación como la replicación RC de este elemento (Lee et al, 2010). Los resultados obtenidos con los ICEs de la familia SXT/R391 y el plásmido R1162, sugieren que sus relaxasas (Tral y MobA, respectivamente) también podrían iniciar la replicación desde el *oriT*, siendo éste además un papel importante en la estabilidad de los elementos conjugativos (Becker & Meyer, 2012; Carraro et al, 2015). En este sentido, cabe destacar que las proteínas Rep RC y Mob/Tra presentan un mecanismo de acción parecido e incluso una estructura tridimensional del dominio de interacción con el DNA común, con una lámina de cinco cadenas- β antiparalelas rodeada de varias hélices- α (Gomis-Rüth & Coll, 2006).

En vista de los datos que disponemos hasta ahora, la relaxasa MobM podría ser considerada una proteína multitarea, ya que participa en varios procesos: i) iniciación de la conjugación, ii) regulación de su propia síntesis, y iii) regulación del número de copias plasmídicas. Respecto a esta última función recién desvelada, sería interesante realizar un análisis exhaustivo de las secuencias de los promotores del RNAll y *oriTs* de plásmidos movilizables que replican por RC en búsqueda de homologías. De esta manera, se obtendría algún indicio de si este mecanismo de interacción cruzada LIC-MOB a través de la relaxasa es exclusivo de pMV158 o se encuentra generalizado en otros plásmidos.

MobSag es una nueva relaxasa de la familia MOB_V

A pesar de que en los genomas procariotas hay una sobrerrepresentación de elementos intracromosómicos frente a plásmidos, los estudios sobre relaxasas conjugativas codificadas en cromosoma son todavía escasos (Guglielmini et al, 2011). La proteína MobSag codificada por el *IME_{rpsI}* y caracterizada en este trabajo, presenta un dominio N-terminal que comparte homología de secuencia con el de otras relaxasas de la familia MOB_V. De hecho, en esta región se han identificado los tres motivos característicos de la subfamilia MOB_{V1}, teóricamente involucrados en la interacción y procesamiento del DNA (Figura 41) (Chandler et al, 2013; Garcillán-Barcia et al, 2009). Por otra parte, la baja conservación encontrada en su dominio C-terminal es también característica de las relaxasas conjugativas (Francia et al, 2004b; Garcillán-Barcia et al, 2009). Esta región se postula como la involucrada en la interacción con otros componentes de la maquinaria conjugativa (T4CP y/o T4SS), por lo que la divergencia de secuencia podría reflejar la especificidad de esta interacción (Zechner et al, 2000).

Los resultados de este trabajo demuestran que la proteína MobSag presenta actividad relaxasa tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que es capaz de relajar DNA superenrollado de un plásmido que contiene su diana (*oriT_{IME_{rpsI}}*) y mediar la transferencia conjugativa del mismo. El corte que realiza sobre el *oriT_{IME_{rpsI}}* es específico de cadena y sitio, además, resultados preliminares han mostrado que la proteína es capaz de formar un complejo estable con el DNA recién cortado. En general, las condiciones óptimas de su actividad de relajación *in vitro*, al igual que su contenido en estructura secundaria, son comparables a las descritas para otras relaxasas (de Antonio et al, 2004; Kopec et al, 2005; Llosa et al, 1995; Varsaki et al, 2003). Los ensayos de estabilidad térmica revelaron que tras el incremento de temperatura y posterior enfriamiento de MobSag, sólo se obtiene una recuperación parcial del espectro de diámetro circular. Esto podría indicar que los cambios estructurales inducidos por la temperatura son sólo parcialmente reversibles, probablemente a causa de la existencia de varios dominios de plegamiento con diferentes capacidades de renaturalización. Sería interesante evaluar si estos cambios afectan a la capacidad catalítica de MobSag y si la presencia de ligandos como el catión divalente aumentaría su estabilidad en estos ensayos, tal como se observó en el caso de la relaxasa MobM (Lorenzo-Díaz et al, 2011).

Las regiones *upstream* (*oriT_{IME_{rpsI}}*) y *downstream* (*ssoA*) del gen *mobSag* también mostraron homología con los presentes en el plásmido pMV158. Esto,

sumado a que ambos elementos fueron aislados de la misma bacteria, sugiere que hubo un evento de recombinación entre plásmido y cromosoma (Lorenzo-Díaz et al, 2014). En el *IMErpsI* no se encontraron otros componentes involucrados en la transferencia conjugativa como la T4CP o T4SS, por lo que al igual que ocurre con pMV158, la transferencia de este elemento hacia una célula receptora requiere de la maquinaria auxiliar aportada por el cromosoma o por un plásmido. En este trabajo se demostró que el módulo MOB del *IMErpsI* es funcional *in vivo* asistido por la maquinaria conjugativa del plásmido pAMβ1 (MPF_{FATA}). En condiciones naturales, la movilización de *IMErpsI* podría estar asistida por elementos conjugativos integrados en el cromosoma de GBS tales como Tn916 (Achard & Leclercq, 2007) o ICE_515_ *tRNA*^{Lys} (Puymege et al, 2013), los cuales ya se ha demostrado que son capaces de movilizar otros elementos codificados en el mismo cromosoma.

Distribución y diversidad del *IMErpsI* en *S. agalactiae*

Los genomas secuenciados de *S. agalactiae* han mostrado una gran abundancia en ICEs e IMEs, sugiriendo una importante contribución de estos elementos en la flexibilidad genética que presenta esta bacteria (Brochet et al, 2008a; Brochet et al, 2008b; Tettelin et al, 2005). El *IMErpsI*, objeto de estudio en este trabajo, fue identificado por primera vez en seis de las ocho estirpes de GBS analizadas (Brochet et al, 2008a). Atendiendo a su organización genética, *IMErpsI* contiene todos los elementos necesarios para su escisión del cromosoma (*atts* y recombinasa), replicación (Rep) y movilización conjugativa (*oriT* y Mob); lo que le otorgaría la capacidad de dispersarse vertical y horizontalmente. Además, tal como se ha visto para los ICEs de la familia SXT (Wozniak & Waldor, 2009), la presencia de un operón toxina-antitoxina indicaría que *IMErpsI* también puede ser heredado de manera estable (Goeders & Van Melderren, 2014).

Se ha realizado un estudio filogenético del genoma de la estirpe HRC, secuenciado en este trabajo, sumado al de 239 estirpes de GBS clasificadas en siete complejos clonales (CCs). De esta manera se puede obtener una perspectiva global de la diseminación del *IMErpsI* atendiendo a su distribución y variabilidad en la población (Tabla 13; Figura 51) (Fernández-López et al, 2015b). Este elemento se encuentra en aproximadamente la mitad de las estirpes analizadas, repartido principalmente en los CCs: CC1, CC6-8-10, CC19 y CC22. Dentro de los 112 *IMErpsI*

identificados, un alineamiento de secuencia nucleotídica permitió clasificar este elemento en diez tipos (denominados de la 'A' a la 'J') que muestran entre un 88 y un 99% de identidad entre ellos (Fernández-López et al, 2015b). La organización genética en todos los casos es muy similar a la descrita para el *IMErpsI* de HRC, conservándose tanto la organización como la función de los ORFs identificados (Figura 38).

Tabla 13. Distribución del *IMErpsI* en los complejos clonales de GBS.

Tipo de <i>IMErpsI</i> ^a	Número de aislados							Total	
	CC1	CC6-8-10	CC17	CC19	CC22	CC23	CC26		otros
A (HRC)	29	2	1	1					32
B (RBH11)	3	18		29	5	6			56
C (CZ-NI-004)	1								1
D (Spain-54)				3					2
E (CRBIP22.117)				1					1
F (CZ-NI-007)		1				1			2
G (CRBIP22.113)						1			1
H (Madagascar-IP-7)						1			1
I (B42VD)						1			1
J (CCH208800621)	8								7
Con <i>IMErpsI</i>	41	21	1	34	5	10			112
Sin <i>IMErpsI</i>	2		80	6		37	6	8	128
Total	43	21	81	40	5	27	6	8	240

^aSe indica entre paréntesis la estirpe representativa de cada tipo de *IMErpsI*.

Por otra parte, la distribución del *IMErpsI* en el cladograma (Figura 51) sugiere que en algunos casos la adquisición de este elemento fue producto de la integración y posterior expansión clonal (por ejemplo, tipo B en CC-6-8-10). Sin embargo, también se observaron casos que apuntan a un evento de adquisición independiente, como el tipo C o A presentes en una única estirpe dentro del CC1 o CC17, respectivamente. En general, la presencia del *IMErpsI* del mismo tipo en distintos CCs sugiere que este elemento se ha transmitido horizontalmente. Un estudio complementario en el que se analizasen la presencia de putativos T4CP y T4SS en los genomas de estas estirpes aportaría una visión más amplia sobre las posibles vías de transferencia conjugativa del *IMErpsI*.

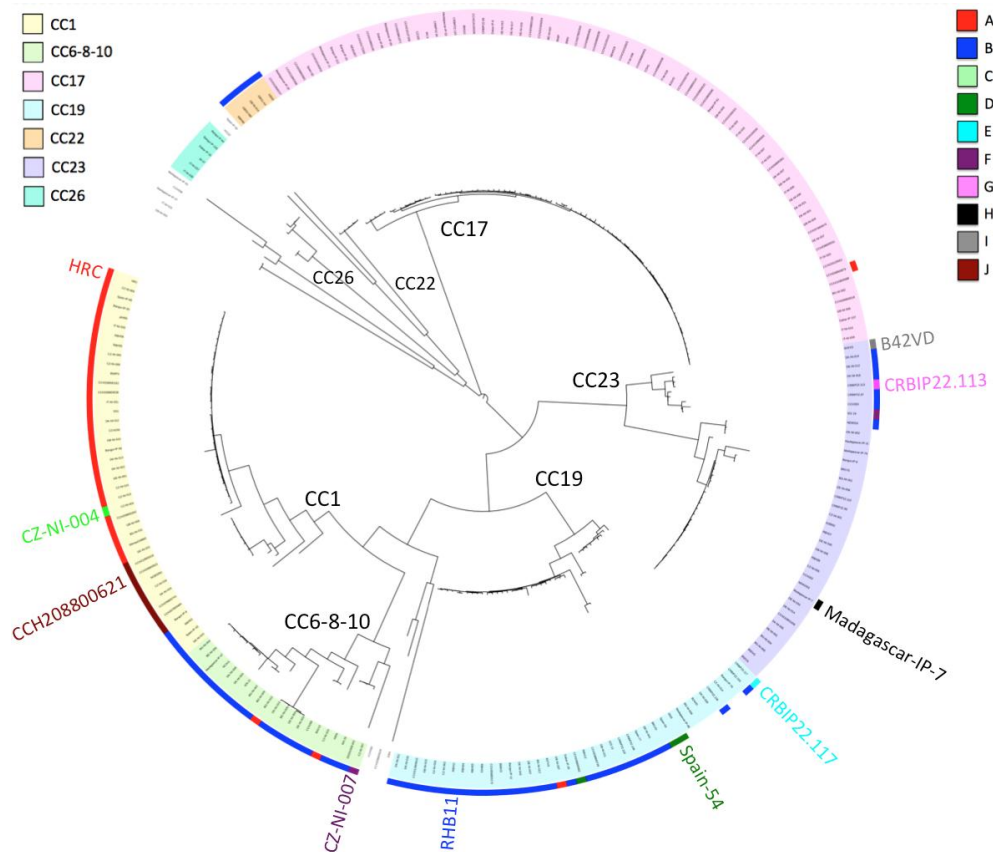


Figura 51. Filogenia del core del genoma y distribución del IMErpsI en los distintos complejos clonales de GBS. La filogenia del core del genoma de 240 estirpes de GBS se realizó usando el programa *Parsnp* del *Harvest suite* (Treangen et al, 2014). El core del genoma de todas las estirpes se ha alineado usando como secuencia de referencia el genoma de 2603V/R (NC_004116) con MUSCLE. Las regiones de recombinación se filtraron utilizando PhiPack y la filogenia fue reconstruida con FastTree2. El árbol fue anotado utilizando ITOL: *Iterative Tree Of Life* (Letunic & Bork, 2011). Los siete complejos clonales se representan con fondos de colores (interior) y los 10 tipos diferentes de IMErpsI se destacan con líneas de color (exterior). Se indica el nombre de una estirpe representativa de cada uno de los tipos de IMErpsI en el exterior del círculo. Figura cedida por Pierre-Emmanuel Douarre (Fernández-López et al, 2015b).

Además de la transferencia dentro de una misma especie, se ha demostrado que algunos ICEs como ICE*Sd3396* de *Streptococcus dysgalactiae* (Smyth et al, 2014), pueden transferirse horizontalmente desde y hacia otras especies del mismo género. El IMErpsI se ha encontrado en otros dos estreptococos distintos a GBS: *S. dysgalactiae* y *Streptococcus gallolyticus*. A pesar de que todavía no hay evidencias experimentales, estos datos indicarían que este elemento no sólo tiene la capacidad de moverse entre estirpes de *S. agalactiae*, sino que también es capaz de colonizar otras especies.

En un principio, los ICEs y derivados se definieron como elementos sin capacidad para replicar autónomamente, opuestamente a los plásmidos, que contenían su propio sistema de replicación. Sin embargo, existe la posibilidad de que

los ICEs repliquen (Lee et al, 2010), y de que los plásmidos puedan ser integrados en el cromosoma del hospedador por recombinación (Lorenzo-Díaz et al, 2014). La historia evolutiva de plásmidos autotransferibles e ICEs indica que a menudo se interconvirtieron entre ellos, de forma que si la presión selectiva es suficientemente fuerte, un plásmido podría integrarse en el cromosoma bacteriano convirtiéndose en un ICE o viceversa (Garcillan-Barcia & de la Cruz 2013; Guglielmini et al, 2011). La dosis génica podría jugar un papel fundamental en este equilibrio, ya que las formas plasmídicas suelen tener mayor número de copias que los elementos integrados (que en principio, sólo presentarían una copia por célula). De esta forma, el plásmido podría suponer una ventaja en determinadas circunstancias en las que la bacteria requiriese, por ejemplo, de mayores dosis de una determinada toxina, resistencia a antibiótico, u otro factor codificado por el plásmido.

Por tanto, la línea que separa plásmidos y elementos integrados parece cada día más borrosa, dando paso a la idea de un conjunto de genes que tienen la capacidad de moverse a través de los genomas, moldeando la diversidad y evolución de los organismos procariotas.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron un total de 97 relaxasas de la familia MOB_{V_1} codificadas por 93 plásmidos. Todos estos plásmidos son movilizables y aislados de bacterias G+, principalmente del *phylum* Firmicutes. Presentan un tamaño medio de 5.1 kb. Un 80% contienen proteínas de replicación por círculo rodante y casi la mitad (45%) codifican resistencias a antibióticos u otros factores.
2. Los *oriTs* de los plásmidos MOB_{V_1} contienen tres repeticiones invertidas y un sitio de corte conservado cuya secuencia consenso es 5'-GTGxG↓T-3' (siendo 'x' una G, T o C y '↓' el sitio de corte). Entre las secuencias de las relaxasas de los plásmidos MOB_{V_1} únicamente hay un alto grado de conservación en los tres motivos de su dominio N-terminal.
3. Los requerimientos estructurales de $MobM_{pMV158}$ para la actividad de corte sobre el DNA dependen de la topología del sustrato. Para el corte sobre DNA superenrollado se requieren los primeros 200 residuos N-terminales de la proteína, mientras que sobre DNA monocatenario se necesita una región adicional (200-243) importante para posicionar el sustrato en el centro activo. Esta región es inestable y su degradación se acentúa en presencia de sustrato (catión y DNA).
4. $MobM_{pMV158}$ tiene como residuo catalítico la histidina 22. Esta es la primera relaxasa conjugativa que se describe que utiliza un residuo distinto al de tirosina para realizar el ataque nucleofílico sobre el DNA.
5. $MobM_{pMV158}$ reconoce dos regiones distantes en el DNA del plásmido pMV158: i) el sitio primario (sitio I), que contiene el *oriT*_{pMV158} y ii) el sitio secundario (sitio II), localizado en la región promotora del *rnall*. La proteína MobM se une específicamente al sitio II, inhibiendo la transcripción del *rnall*, reduciendo los niveles intracelulares del RNAll y produce un incremento en el número de copias del plásmido (N_{av}). Creemos que esta es la primera evidencia de una comunicación intramolecular entre el módulo de movilización y replicación-control de un plásmido movilizable que replica por círculo rodante.
6. El elemento integrado IME*rpsI* tiene capacidad para escindirse del cromosoma de su huésped, *S. agalactiae*. La distribución del IME*rpsI* en la población de esta bacteria sugiere que este elemento se ha diseminado vertical y horizontalmente.

7. En el *IME_{rpsI}* se ha identificado un módulo de movilización que contiene un *oriT* (*oriT_{IME_{rpsI}}*) y una proteína relaxasa (MobSag) que pertenecen a la familia MOB_{V1}.

8. La proteína MobSag presenta actividad relaxasa *in vitro* ya que es capaz de cortar sobre DNA superenrollado de un plásmido que contiene su diana (*oriT_{IME_{rpsI}}*). La actividad de corte máxima (80%) se alcanzó con una relación molar DNA:proteína 1:6, a 50°C durante 20 minutos, en presencia de catión Mn⁺². Este corte es específico de cadena (líder) y sitio (5'-GTGCG↓T-3', siendo '↓' el enlace fosfato a escindir).

9. MobSag presenta actividad relaxasa *in vivo* ya que media la transferencia conjugativa de un plásmido que contiene el *oriT_{IME_{rpsI}}*.

CONCLUSIONS

1. We have identified 97 relaxases encoded by 93 plasmids that belong to the MOB_{V1} relaxase family. All plasmids are mobilizable and were isolated from G+ bacteria, mainly from *phylum* Firmicutes. They have an average size of 5.1 kb. Up to 80% of these plasmids encode rolling-circle replication initiator proteins and almost half (45%) harbour antibiotic-resistance or other determinant genes.
2. The *oriT* sequences of plasmids of the MOB_{V1} family contain three inverted repeats and a conserved *nick* site (consensus sequence 5'-GTGxG↓T-3', 'x' denoting G, T or C; '↓' being the *nick* site). Among the relaxase protein sequences of MOB_{V1} plasmids, only the three motifs of the N-terminal domain are highly conserved.
3. The structural requirements for MobM_{pMV158} nicking activity depend on the substrate DNA topology. The first 200 N-terminal residues of the protein are required to cleave supercoiled DNA, whereas an additional region (200-243) is important to place the substrate into the protein active center. This hinge region is unstable and its degradation is increased in presence of cations and/or DNA.
4. The catalytic residue of MobM_{pMV158} is the histidine at position 22. This is the first report on a relaxase that uses a residue other than tyrosine to perform the DNA nucleophilic attack.
5. MobM_{pMV158} recognizes two distant regions in the DNA of plasmid pMV158: i) the primary site (site I), that contains the *oriT*_{pMV158}, and ii) the secondary site (site II) located in the *rnall* promoter region. Binding of MobM protein to site II results in: hindering transcription of *rnall*; reducing the intracellular levels of RNAll, and increasing plasmid copy number (N_{av}). We believe that this is the first report of an intramolecular communication between the mobilization and the replication-control genetic modules of a plasmid.
6. The chromosomally integrated element IME*rpsI* is able to excise from the chromosome of its host, *S. agalactiae*. IME*rpsI* distribution in the population of this bacterium suggests that this element has spread vertically and horizontally.
7. Within the IME*rpsI*, we have identified a mobilization module containing an *oriT*_{IME*rpsI*} and relaxase protein (MobSag) belonging to the MOB_{V1} family.

8. MobSag protein has *in vitro* relaxase activity since it is able to nick supercoiled DNA of a plasmid harbouring its target, *oriT_{IME_{rpsI}}*. The maximum cleavage activity (80%) has been achieved with a molar ratio DNA:protein 1:6, 50°C and 20 min. The nicking activity of MobSag is leading-strand and site-specific (5'-GTGCG↓T-3'; '↓' being the scissile phosphate).

9. MobSag also presents *in vivo* relaxase activity since it mediates the conjugative transfer of a plasmid that contains its *oriT_{IME_{rpsI}}*.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard A, Leclercq R (2007) Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **189**: 4328-4331
- Adamczak R, Porollo A, Meller J (2005) Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **59**: 467-475
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**: 3389 - 3402
- Alvarez-Martinez CE, Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808
- Andrade MA, Chacón P, Merolo JJ, Morán F (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* **6**: 443-454
- Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 271-281
- Becker EC, Meyer R (2012) Origin and fate of the 3' ends of single-stranded DNA generated by conjugal transfer of plasmid R1162. *Journal of Bacteriology* **194**: 5368-5376
- Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guedon G (2014) Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 720-760
- Besant PG, Attwood PV (2010) Histidine phosphorylation in histones and in other mammalian proteins. *Methods Enzymol* **471**: 403-426
- Bhatty M, Laverde Gomez JA, Christie PJ (2013) The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol* **164**: 620-639
- Boer DR, Ruíz-Masó JA, López-Blanco JR, Blanco AG, Vives-Llàcer M, Chacón P, Usón I, Gomis-Rüth FX, Espinosa M, Llorca O, del Solar G, Coll M (2009) Plasmid replication initiator RepB forms a hexamer reminiscent of ring helicases and has mobile nuclease domains. *EMBO J* **28**: 1666-1678
- Boer R, Russi S, Guasch A, Lucas M, Blanco AG, Perez-Luque R, Coll M, de la Cruz F (2006) Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase: The structure of TrwC complexed with a 27-mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *J Mol Biol* **358**: 857-869
- Brochet M, Couve E, Glaser P, Guedon G, Payot S (2008a) Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **190**: 6913-6917
- Brochet M, Da Cunha V, Couve E, Rusniok C, Trieu-Cuot P, Glaser P (2009) Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements. *Mol Microbiol* **71**: 948-959
- Brochet M, Rusniok C, Couve E, Dramsi S, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F, Glaser P (2008b) Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15961-15966

- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**: 107-127
- Burdett V (1980) Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother* **18**: 753 - 760
- Cabezon E, Lanza VF, Arechaga I (2012) Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport. *Current opinion in biotechnology* **23**: 537-544
- Carballeira JD, Gonzalez-Perez B, Moncalian G, de la Cruz F (2014) A high security double lock and key mechanism in HUH relaxases controls oriT-processing for plasmid conjugation. *Nucleic Acids Res* **42**: 10632-10643
- Carraro N, Poulin D, Burrus V (2015) Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. *PLoS Genet* **11**: e1005298
- Clewell DB, Jaworski DD, Flannagan SE, Zitzow LA, Su YA (1995) The conjugative transposon Tn916 of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. *Developments in biological standardization* **85**: 11-17
- Clewell DB, Yagi Y, Dunny GM, Schultz SK (1974) Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J Bacteriol* **117**: 283-289
- Coffey A, Harrington A, Kearney K, Daly C, Fitzgerald G (1994) Nucleotide sequence and structural organization of the small broad-host-range plasmid pCl411 from *Leuconostoc lactis*. *Microbiology* **140**: 2263-2269
- Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucl Acids Res* **36**: 197-201
- Cole JL (2004) Analysis of heterogeneous interactions. *Methods Enzymol* **384**: 212-232
- Compton LA, Johnson WC, Jr. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem* **155**: 155-167
- Costa M, Solá M, del Solar G, Eritja R, Hernández-Arriaga AM, Espinosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M (2001) Plasmid transcriptional repressor CopG oligomerises to render helical superstructures unbound and in complexes with oligonucleotides. *J Mol Biol* **310**: 403-417
- Cowtan K (2001) Fast Fourier feature recognition. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**: 1435-1444
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**: 1188-1190.
- Cruz-Rodz AL, Gilmore MS (1990) High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. *Mol Gen Genet* **224**: 152-154

- Chan PF, O'Dwyer KM, Palmer LM, Ambrad JD, Ingraham KA, So C, Lonetto MA, Biswas S, Rosenberg M, Holmes DJ, Zalacain M (2003) Characterization of a novel fucose-regulated promoter (PfcSK) suitable for gene essentiality and antibacterial mode-of-action studies in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 2051-2058
- Chan SH, Stoddard BL, Xu SY (2011) Natural and engineered nicking endonucleases--from cleavage mechanism to engineering of strand-specificity. *Nucleic Acids Res* **39**: 1-18
- Chandler M, de la Cruz F, Dyda F, Hickman AB, Moncalian G, Ton-Hoang B (2013) Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nature Rev Microbiol* **11**: 625-538
- Chang T-L, Kramer MG, Ansari RA, Khan SA (2000) Role of individual monomers of a dimeric initiator protein in the initiation and termination of plasmid rolling circle replication. *J Biol Chem* **275**: 13529-13534
- Da Cunha V, Davies MR, Douarre PE, Rosinski-Chupin I, Margarit I, Spinali S, Perkins T, Lechat P, Dmytruk N, Sauvage E, Ma L, Romi B, Tichit M, Lopez-Sanchez MJ, Descorps-Declere S, Souche E, Buchrieser C, Trieu-Cuot P, Moszer I, Clermont D, Maione D, Bouchier C, McMillan DJ, Parkhill J, Telford JL, Dougan G, Walker MJ, Consortium D, Holden MT, Poyart C, Glaser P (2014) *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nature communications* **5**: 4544
- Datta S, Larkin C, Schildbach JF (2003) Structural insights into single-stranded DNA binding and cleavage by F factor Tral. *Structure* **11**: 1369-1379
- Davies MR, Shera J, Van Domselaar GH, Sriprakash KS, McMillan DJ (2009) A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic *Streptococci*. *J Bacteriol* **191**: 2257-2265
- de Antonio C, Farias ME, de Lacoba MG, Espinosa M (2004) Features of the plasmid pMV158-encoded MobM, a protein involved in its mobilization. *J Mol Biol* **335**: 733-743
- de la Campa AG, del Solar G, 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 las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R (2004) Complete nucleotide sequence and structural organization of pPB1, a small *Lactobacillus plantarum* cryptic plasmid that originated by modular exchange. *Plasmid* **52**: 203-211
- de Paz HD, Larrea D, Zunzunegui S, Dehio C, de la Cruz F, Llosa M (2010) Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J Bacteriol* **192**: 2655-2669
- del Solar G, Acebo P, 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, Acebo P, Espinosa M (1997) Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact *mall* region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Mol Microbiol* **23**: 95-108

- del Solar G, Díaz R, Espinosa M (1987) Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **206**: 428-435
- del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 434-464
- del Solar G, Pérez-Martín J, 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
- Dempsey LA, Dubnau DA (1989) Identification of plasmid and *Bacillus subtilis* chromosomal recombination sites used for pE194 integration. *J Bacteriol* **171**: 2856-2865
- Díaz A, Lacks SA, López P (1994) Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol Microbiol* **14**
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* **16**: 6127-6145
- Draper O, Cesar CE, Machon C, de la Cruz F, Llosa M (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16385-16390
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AK, Cousens S, Heath PT (2012) Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**: 547-556
- Edwards JS, Betts L, Frazier ML, Pollet RM, Kwong SM, Walton WG, Ballentine WK, 3rd, Huang JJ, Habibi S, Del Campo M, Meier JL, Dervan PB, Firth N, Redinbo MR (2013) Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 2804-2809
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126-2132
- Espinosa M (2013) Plasmids as models to study macromolecular interactions: the pMV158 paradigm. *Res Microbiol* **164**: 199-204
- Espinosa M, del Solar G, Rojo F, Alonso JC (1995) Plasmid rolling circle replication and its control. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 111-120
- Espinosa M, López P, Pérez-Ureña MT, Lacks SA (1982) Interspecific plasmid transfer between *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **188**: 195-201
- Evans P (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**: 72-82

- Farías ME, Espinosa M (2000) Conjugal transfer of plasmid pMV158: uncoupling of the pMV158 origin of transfer from the mobilization gene *mobM*, and modulation of pMV158 transfer in *Escherichia coli* mediated by IncP plasmids. *Microbiology* **146**: 2259-2265
- Fernández-López C, Bravo A, Ruiz-Cruz S, Solano-Collado V, Garsin DA, Lorenzo-Díaz F, Espinosa M. (2014) Mobilizable rolling-circle replicating plasmids from Gram-positive bacteria: a low-cost conjugative transfer. In Alonso JC, Tomalsky M (eds.). ASM Press, Vol. in press.
- Fernández-López C, Espinosa M, Lorenzo-Díaz F (2015a) Modulation of protein-induced hairpin formation as a molecular switch. *DNA Research* **(en revisión)**
- Fernández-López C, Lorenzo-Díaz F, Douarre PE, Báez A, Flores C, Glaser P, Espinosa M (2015b) Relaxase-mediated conjugative transfer of a streptococcal Integrative and Mobilizable Element. **(en preparación)**
- Fernández-López C, Lorenzo-Díaz F, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Boer R, Lurz R, Bravo A, Coll M, Espinosa M (2013a) Nicking activity of the pMV158 MobM relaxase on cognate and heterologous origins of transfer. *Plasmid*: 120-130
- Fernández-López C, Pluta R, Pérez-Luque R, L. R-G, Espinosa M, Coll M, Lorenzo-Díaz F, Boer R (2013b) Functional properties and structural requirements of the plasmid pMV158-encoded MobM relaxase domain *J Bacteriol* **195**: 3000-3008
- Fernandez-Lopez R, Machon C, Longshaw CM, Martin S, Molin S, Zechner EL, Espinosa M, Lanka E, de la Cruz F (2005) Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology* **151**: 3517 - 3526
- Fersht AR, Kirby AJ (1967) Structure and mechanism in intramolecular catalysis. The hydrolysis of substituted aspirins. *Journal of the American Chemical Society* **89**: 4853-4856
- Francia M, Varsaki A, Garcillan-Barcia M, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F (2004a) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 79 - 100
- Francia MV, Clewell DB, de la Cruz F, Moncalian G (2013) Catalytic domain of plasmid pAD1 relaxase TraX defines a group of relaxases related to restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 13606-13611
- Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F (2004b) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 79-100
- Franke AE, Clewell DB (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**: 494-502
- Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F (2011) Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 936-956
- Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F (2013) Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mobile Genetic Elements* **3**: e24263

- Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 657-687
- Garcillán-Barcia MP, Jurado P, González-Pérez B, Moncalián G, Fernández LA, de la Cruz F (2007) Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Mol Microbiol* **63**: 404-416
- Gennaro ML, Kornblum J, Novick RP (1987) A site-specific recombination function in *Staphylococcus aureus* plasmids. *J Bacteriol* **169**: 2601-2610
- Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couve E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* **45**: 1499-1513
- Goeders N, Van Melder L (2014) Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins* **6**: 304-324
- Goessweiner-Mohr N, Arends K, Keller W, Grohmann E (2013) Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid* **70**: 289-302
- Gogarten JP, Townsend JP (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 679-687
- Gomis-Rüth FX, Coll M (2006) Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 744-752
- Gomis-Rüth FX, Solá M, Acebo P, Párraga A, Guasch A, Eritja R, González A, Espinosa M, del Solar G, Coll M (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J* **17**: 7404-7415
- González-Pérez B, Lucas M, Cooke LA, Vyle JS, de la Cruz F, Moncalián G (2007) Analysis of DNA processing reactions in bacterial conjugation by using suicide oligonucleotides. *EMBO J* **26**: 3847-3857
- Grohmann E, Guzmán LM, Espinosa M (1999) Mobilisation of the streptococcal plasmid pMV158: interactions of MobM protein with its cognate *oriT* DNA region. *Mol Gen Genet* **261**: 707-715
- Grohmann E, Moscoso M, Zechner EL, del Solar G, Espinosa M (1998) *In vivo* definition of the functional origin of leading strand replication on the lactococcal plasmid pFX2. *Molecular and General Genetics* **260**: 38-47
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M (2003) Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 277-301
- Grohmann E, Zechner EL, Espinosa M (1997) Determination of specific DNA strand discontinuities with nucleotide resolution in exponentially growing bacteria harbouring rolling circle-replicating plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **152**: 363-369
- Guasch A, Lucas M, Moncalian G, Cabezas M, Perez-Luque R, Gomis-Ruth FX, de la Cruz F, Coll M (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nat Struct Biol* **10**: 1002-1010

- Guerillot R, Da Cunha V, Sauvage E, Bouchier C, Glaser P (2013) Modular evolution of TnGBSs, a new family of integrative and conjugative elements associating insertion sequence transposition, plasmid replication, and conjugation for their spreading. *J Bacteriol* **195**: 1979-1990
- Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP (2011) The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* **7**: e1002222
- Guyenet C, Cuevas A, Moncalian G, de la Cruz F (2011) The stb operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* **7**: e1002073
- Guzmán LM, Espinosa M (1997) The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J Mol Biol* **266**: 688-702
- Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec JY, Payot S (2010) Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7957-7965
- Halary S, Leigh JW, Cheaib B, Lopez P, Baptiste E (2010) Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 127-132
- Hanahan D (1983) Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557 - 580
- Hanai R, Wang JC (1993) The mechanism of sequence-specific DNA cleavage and strand transfer by fX174 gene A* protein. *J Biol Chem*: 23830-23836
- Hernández-Arriaga AM, Espinosa M, Del Solar G (2012) Fitness of the pMV158 replicon in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **67**: 162-166
- Hernandez-Arriaga AM, Rubio-Lepe TS, Espinosa M, del Solar G (2009) Repressor CopG prevents access of RNA polymerase to promoter and actively dissociates open complexes. *Nucl Acids Res* **37**: 4799-4811
- Horodniceanu T, Bougueleret L, El-Solh N, Bouanchaud DH, Chabbert YA (1979) Conjugative R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Plasmid* **2**: 197-206
- Kee JM, Muir TW (2012) Chasing phosphohistidine, an elusive sibling in the phosphoamino acid family. *ACS chemical biology* **7**: 44-51
- Khan SA (1996) Mechanism of replication and copy number control of plasmids in Gram-positive bacteria. In *Genetic Engineering*, Setlow JK (ed), Vol. 18, pp 183-201. New York: Plenum Press
- Khan SA (2005) Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research *Plasmid* **53**: 126-136
- Kingsman A, Willetts N (1978) The requirements for conjugal DNA synthesis in the donor strain during flac transfer. *J Mol Biol* **122**: 287-300

- Kopec J, Bergmann A, Fritz G, Grohmann E, Keller W (2005) TraA and its N-terminal relaxase domain of the Gram-positive plasmid pIP501 show specific *oriT* binding and behave as dimers in solution. *Biochem J* **387**: 401-409
- Koraimann G, Wagner MA (2014) Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **4**: 54
- Kramer MG, Khan SA, Espinosa M (1997) Plasmid rolling circle replication: identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement of DNA polymerase I for lagging strand initiation. *EMBO J* **16**: 5784-5795
- Lacks S (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207-235
- Lacks S, Greenberg B (1977) Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* **114**: 153-168
- Lacks SA, López P, Greenberg B, 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
- Lancefield RC, McCarty M, Everly WN (1975) Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *The Journal of experimental medicine* **142**: 165-179
- Lang S, Gruber K, Mihajlovic S, Arnold R, Gruber CJ, Steinlechner S, Jehl MA, Rattei T, Frohlich KU, Zechner EL (2010) Molecular recognition determinants for type IV secretion of diverse families of conjugative relaxases. *Mol Microbiol* **78**: 1539-1555
- Lanka E, Wilkins BM (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu Rev Biochem* **64**: 141-169
- Lanza VF, Tedim AP, Martinez JL, Baquero F, Coque TM (2015) The Plasmidome of Firmicutes: Impact on the Emergence and the Spread of Resistance to Antimicrobials. *Microbiol Spectr* **3**: PLAS-0039-2014
- Larkin C, Datta S, Harley MJ, Anderson BJ, Ebie A, Hargreaves V, Schildbach JF (2005) Inter- and Intramolecular Determinants of the Specificity of Single-Stranded DNA Binding and Cleavage by the F Factor Relaxase. *Structure* **13**: 1533-1544
- Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM, Pelletier SL (1992) Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Sciences*. In Harding SE, Rowe, A., Horton, J.C. (eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry (ed), pp 90-125.
- Le Doare K, Heath PT (2013) An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31 Suppl 4**: D7-12
- Lee CA, Babic A, Grossman AD (2010) Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Mol Microbiol* **75**: 268-279
- Lee CA, Thomas J, Grossman AD (2012) The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICEBs1 mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions. *J Bacteriol* **194**: 3165-3172

- Letunic I, Bork P (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* **39**: W475-478
- Levy SB (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American* **278**: 46-53
- Lipps G (2008) *Plasmids: Current Research and Future Trends*: Caister Academic Press.
- López-Aguilar C, del Solar G (2013) Probing the sequence and structure of *in vitro* synthesized antisense and target RNAs from the replication control system of plasmid pMV158. *Plasmid* **70**: 94-103
- Lopez-Aguilar C, Romero-Lopez C, Espinosa M, Berzal-Herranz A, Del Solar G (2015) The 5'-tail of antisense RNAII of pMV158 plays a critical role in binding to the target mRNA and in translation inhibition of repB. *Frontiers in genetics* **6**: 225
- López-Aguilar C, Ruiz-Masó JA, Rubio-Lepe TS, Sanz M, del Solar G (2013) Translation initiation of the replication initiator *repB* gene of promiscuous plasmid pMV158 is led by an extended non-SD sequence. *Plasmid* **70**: 69-77
- Lopez-Villarejo J, Lobato-Marquez D, Diaz-Orejas R (2015) Coupling between the basic replicon and the Kis-Kid maintenance system of plasmid R1: modulation by Kis antitoxin levels and involvement in control of plasmid replication. *Toxins* **7**: 478-492
- Lorenzo-Díaz F (2010) Interacciones moleculares en la transferencia conjugativa del plásmido pMV158. Tesis por la Universidad Complutense de Madrid.
- Lorenzo-Díaz F, Dostál L, Coll M, Schildbach JF, Menendez M, Espinosa M (2011) The MobM-relaxase domain of plasmid pMV158: thermal stability and activity upon Mn²⁺-and DNA specific-binding. *Nucleic Acids Res* **39**: 4315-4329
- Lorenzo-Díaz F, Espinosa M (2009a) Large-scale filter mating assay for intra- and inter-specific conjugal transfer of the promiscuous plasmid pMV158 in Gram-positive bacteria. *Plasmid* **61**: 65-70
- Lorenzo-Díaz F, Espinosa M (2009b) Lagging strand DNA replication origins are required for conjugal transfer of the promiscuous plasmid pMV158. *J Bacteriol* **191**: 720-727
- Lorenzo-Díaz F, Fernández-López C, Garcillán-Barcia MP, Espinosa M (2014) Bringing them together: Plasmid pMV158 rolling circle replication and conjugation under an evolutionary perspective. *Plasmid* **74**: 15-31
- Lorenzo-Díaz F, Solano-Collado V, Lurz R, Bravo A, Espinosa M (2012) Autoregulation of the synthesis of the MobM relaxase encoded by the promiscuous plasmid pMV158. *J Bacteriol* **194**: 1789-1799
- Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, de la Cruz F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8
- Llosa M, Grandoso G, de la Cruz F (1995) Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol* **246**: 54-62
- Llosa M, Grandoso G, Hernando MA, de la Cruz F (1996) Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: Dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *J Mol Biol* **264**: 56-67

- Llosa M, Zunzunegui S, de la Cruz F (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10465-10470
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press New York*
- Matson SW, Morton BS (1991) *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid *oriT*. *J Biol Chem* **266**: 16232-16237
- Mazel D, Davies J (1999) Gene capture in : Response. *Trends Microbiol* **7**: 95
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**: 658-674
- McGuffin BK, D.T. J (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press New York*
- Monzingo AF, Ozburn A, Xia S, Meyer RJ, Robertus JD (2007) The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **366**: 165-178
- Moscoso M, del Solar G, Espinosa M (1995) 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, Eritja R, Espinosa M (1997) Initiation of replication of plasmid pMV158: mechanisms of DNA strand transfer reactions mediated by the initiator RepB protein. *J Mol Biol* **268**: 840-856
- Murray BE, Singh KV, Ross RP, Heath JD, Dunny GM, Weinstock GM (1993) Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *J Bacteriol* **175**: 5216-5223
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**: 240-255
- Naglich JG, Andrews REJ (1988) Tn916-dependent conjugal transfer of pC194 and pUB110 from *Bacillus subtilis* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid* **20**: 113-126
- Newton CR, Graham A (1994) *PCR*: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Nieto C, Espinosa M (2003) Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the Green Fluorescent Protein. *Plasmid* **49**: 281-285
- Nordström K, Molin S, Ligth J (1984) Control of replication of bacterial plasmids: genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid* **12**: 71-90

- Novick RP (1989) Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol* **43**: 537-565
- Novick RP, Projan SJ, Rosenblum W, Edelman I (1984) 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
- O'Brien FG, Yui Eto K, Murphy RJ, Fairhurst HM, Coombs GW, Grubb WB, Ramsay JP (2015) Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623
- Osborn M, Bron S, Firth N, Holsappel S, Huddleston A, Kiewiet R, Meijer WJJ, Seegers JFML, Skurray RA, Terpstra P, Thomas CM, Thorsted P, Tietze E, Turner SL (2000) The evolution of bacterial plasmids. In *The horizontal gene pool*, C.M.Thomas (ed), pp 301-361. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Pansegrau W, Balzer D, Kruff V, Lanka E (1990) *In vitro* assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6555-6559
- Pansegrau W, Lanka E (1996a) Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing: independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (Tral) of IncPa plasmid RP4. *J Biol Chem* **271**: 13068-13076
- Pansegrau W, Lanka E (1996b) Enzymology of DNA strand transfer by conjugative mechanisms. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* **54**: 197-251
- Pansegrau W, Schröder W, Lanka E (1993) Relaxase (Tra I) of IncPa plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2925-2929
- Pansegrau W, Schröder W, Lanka E (1994) Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (Tral) of conjugative plasmid RP4. *J Biol Chem* **269**: 2782-2789
- Pinto UM, Pappas KM, Winans SC (2012) The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat Rev Microbiol* **10**: 755-765
- Pluta R (2014) Structural basis of conjugative DNA transfer mediated by MobM, a prototype of the major relaxase family of *Staphylococcus aureus*. Tesis por la Universitat Pompeu Fabra.
- Priebe SD, Lacks SA (1989) Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J Bacteriol* **171**: 4778-4784
- Projan SJ, Carleton S, Novick RP (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**: 182-190
- Projan SJ, Novick RP (1988) Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* **19**: 203-221
- Provencher SW, Glöckner J (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**: 33-37

- Puymege A, Bertin S, Chuzeville S, Guedon G, Payot S (2013) Conjugative transfer and cis-mobilization of a genomic island by an integrative and conjugative element of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **195**: 1142-1151
- Puymege A, Bertin S, Guedon G, Payot S (2015) Analysis of *Streptococcus agalactiae* pan-genome for prevalence, diversity and functionality of integrative and conjugative or mobilizable elements integrated in the tRNA(Lys CTT) gene. *Molecular genetics and genomics : MGG* **290**: 1727-1740
- Rasooly A, Wang P-Z, Novick RP (1994) Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* pT181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer. *EMBO J* **13**: 5245-5251
- Reyes-Lamothe R, Tran T, Meas D, Lee LN, Li AM, Sherratt DJ, Tolmasky ME (2014) High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. *Nucleic Acids Res* **42**: 1042-1051
- Robinson VL, Stock AM (1999) High energy exchange: proteins that make or break phosphoramidate bonds. *Structure* **7**: R47-53
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The PredictProtein server. *Nucl Acids Res* **32**: W321-326
- Ruiz-Cruz S, Solano-Collado V, Espinosa M, Bravo A (2010) Novel plasmid-based genetic tools for the study of promoters and terminators in *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*. *J Microb Meth* **83**: 156-163
- Ruiz-Masó JA, Lurz R, Espinosa M, del Solar G (2007) Interactions between the RepB initiator protein of plasmid pMV158 and two distant DNA regions within the origin of replication. *Nucleic Acids Res* **35**: 1230-1244
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467
- Schneider TR, Sheldrick GM (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1772-1779
- Schuck P, Rossmannith P (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* **54**: 328-341
- Siegel LM, Monty KJ (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by the use of gel filtration and density gradient centrifugation. Applications to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochem Biophys Acta* **112**: 346-362
- Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA (2009) Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Advances in microbial physiology* **55**: 1-79, 317
- Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F (2010) Mobility of Plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 434-452
- Smith MD, Shoemaker NB, Burdett V, Guild WR (1980) Transfer of plasmids by conjugation in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **3**: 70-79

- Smyth DJ, Shera J, Bauer MJ, Cameron A, McNeilly CL, Sriprakash KS, McMillan DJ (2014) Conjugative transfer of ICESde3396 between three beta-hemolytic streptococcal species. *BMC research notes* **7**: 521
- Spaink HP, Okker R, Wijffelman C, Pees E, Lugtengerg B (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLJI. *Plant Molecular Biology* **9**: 27-39
- Spiess E, Lurz R (1988) Electron microscopic analysis of nucleic acids and nucleic acid-protein complexes. *Methods Microbiol* **20**: 293-323
- Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal Biochem* **287**: 252-260
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690
- Stassi DL, Lopez P, Espinosa M, Lacks SA (1981) Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7028-7032
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**: 113-130
- Szipirer CY, Faalen M, Couturier M (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J Bacteriol* **183**: 2101-2110
- te Riele H, Michel B, Ehrlich SD (1986) Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2541-2545
- Terwilliger TC (2003) SOLVE and RESOLVE: automated structure solution and density modification. *Methods Enzymol* **374**: 22-37
- Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13950-13955
- Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12391-12396

- Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498-506
- Thomas CM (2000) *The horizontal gene pool*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Todd EW, Hewitt LF (1932) A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. *J Pathol* **35**: 973-974
- Tomalsky M, Alonso JC (2015) *Plasmids*, Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Trask DK, DiDonato JA, Muller MT (1984) Rapid detection and isolation of covalent DNA/protein complexes: application to topoisomerase I and II. *EMBO J* **3**: 671-676
- Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM (2014) The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* **15**: 524
- Tsvetkov P, Asher G, Paz A, Reuven N, Sussman JL, Silman I, Shaul Y (2008) Operational definition of intrinsically unstructured protein sequences based on susceptibility to the 20S proteasome. *Proteins* **70**: 1357-1366
- Turgeon N, Moineau S (2001) Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid* **45**: 171-183
- Uson I, Sheldrick GM (1999) Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 643-648
- van der Lelie D, Wosten HAB, Bron S, Oskam L, Venema G (1990) Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol* **172**: 47-52
- van Holde KE (1985) Principles of Physical Biochemistry. 2nd edition. Prentice Hall: Englewoods Cliffs.
- Varsaki A, Lucas M, Afendra AS, Drainas C, de la Cruz F (2003) Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Mol Microbiol* **48**: 481-493
- Waters VL, Guiney DG (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling-circle replication. *Mol Microbiol* **9**: 1123-1130
- Waters VL, Hirata KH, Pansegrau W, Lanka E, Guiney DG (1991) Sequence identity in the nick regions of IncP plasmid transfer origins and T-DNA borders of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1456-1460
- Wilson CB, Weaver WM (1985) Comparative susceptibility of group B streptococci and *Staphylococcus aureus* to killing by oxygen metabolites. *The Journal of infectious diseases* **152**: 323-329

-
- Wozniak RA, Waldor MK (2009) A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* **5**: e1000439
- Wozniak RAF, Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**: 552-563
- Zechner EL, de la Cruz F, Eisenbrandt R, Grahn AM, Koraimann G, Lanka E, Muth G, Pansegrau W, Thomas CM, Wilkins BM, Zaryka M (2000) Conjugative-DNA transfer processes. In *The horizontal gene pool*, Thomas CM (ed), pp 87-174. *Amsterdam: Harwood Academic publishers*
- Zechner EL, Lang S, Schildbach JF (2012) Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1073-1087
- Zhou H, Hao Y, Xie Y, Yin S, Zhai Z, Han B (2010) Characterization of a rolling-circle replication plasmid pXY3 from *Lactobacillus plantarum* XY3. *Plasmid* **64**: 36-40

ANEXO

Tabla A1. Plásmidos de la familia MOB_{V1}.

Nombre del plásmido ^a (<i>GenBank</i>)	Nucleótido (<i>GenBank</i>)	Tamaño del plásmido (pb)	Relaxasa (<i>GenBank</i>)	Grupo filogenético de relaxasa ^b	Huésped	Familia de proteína iniciadora de la replicación ^c	Tipo de sso (posición relativa al gen <i>mob</i>) ^d	Virulencia / resistencia a antibiótico / resistencia a metal ^e
pMV158	NC_010096.1	5.541	YP_001586274	pMV158	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rep_2	ssoA (3') + ssoU (5')	Tc
pER13	NC_002776.1	4.139	NP_115336.1	pMV158	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Rep_2	ssoA (3')	
pSMQ172	NC_004958.1	4.230	NP_862547.1	pMV158	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Rep_2	ssoA (3')	
pGA2000	NC_019252.1	4.967	YP_006961085.1	pMV158	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Rep_2	ssoA (3')	MLS(B)
pGB2002	NC_015971.1	6.825	YP_004831084.1	pMV158	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rep_2	ssoA (3')	MLS(B)
pRW35	NC_010423.2	4.968	YP_001716200.1	pMV158	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Rep_2	ssoA (3') + ssoU (5')	MLS(B)
pDRPIS7493	NC_015876.1	4.727	YP_004769541.1	pMV158	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	Rep_2	N.D.	
pSSU1	NC_002140.1	4.975	NP_053061.1	pMV158	<i>Streptococcus suis</i>	Rep_2	ssoA (3')	
pYSI8	NC_010936.1	4.973	YP_001967741.1	pYSI8	<i>Lactobacillus sakei</i>	Rep_2	ssoT (5')	Lin
pK214	NC_009751.1	29.871	YP_001429536.1	pYSI8	<i>Lactococcus lactis</i>	Rep_trans y. Rep_3+L_J actis_RepB_C	N.D.	MEP, Strp, Cm, Tc
pUR2941	HF583290.1	20.876	CCQ43999.1	pYSI8	<i>Staphylococcus aureus</i>	RepA_N+D naB_2 y desconocido y truncada	ssoA (5')	Kan/Neo, Tc, MLS(B), Cd, Cu

pCPS49	NC_019142.1	5.292	YP_00695810 8.1	pYS18	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_2	ssoA (3')	PLS(A)
pSTE1	NC_020237.1	11.951	YP_00741910 4.1	pSY18	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Rep_trans y HTH_Hin_li ke y truncada	N.D.	Strp, MLS(B), Tc
			YP_00741910 9.1	pKKS825				
pKKS825	NC_013034.2	14.363	YP_00308433 7.1	pKKS825	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1 y HTH_Hin_li ke y Rep_3	N.D.	Kan/Neo, Tc, Trim, PLS(A)
			YP_00308433 0.1	pKKS825				
			YP_00467901 2.1 (MOB _o , truncated and fused to Rep_1)					
pDB2011	NC_021513.1	7.641	YP_00811984 9.1	pKKS825	<i>Listeria innocua</i>	Rep_1 y HTH_Hin_li ke	N.D.	MLS(B), Spec, Trim
pS130a	AUPT0100002 3.1	8.882	EPZ04218.1	pKKS825	<i>Staphylococcus aureus</i>	HTH_11	N.D.	Em, Tc, Kan, Ble
pSCFS1	NC_005076.1	17.108	NP_899176.1	pKKS825	<i>Staphylococcus sciuri</i>	HTH_Hin_li ke y Rep_3	N.D.	Flr/Chlr, MLS(B), Spec
			NP_899168.1	pNM11				
pLB4	M33531.1	N.D.	AAA25252.1	pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_2	ssoT (5')	
pMRI_5.2	NC_019900.1	5.206	YP_00721517 4.1	pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_1 y Rep_2	ssoT (3')	
pLAC1	NC_014164.1	3.478	YP_00365063 0.1	pLB4	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Rep_1	N.D.	
pPLA4	AF304384.2	8.135	ABG23031.1	pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_3	N.D.	Bacteriocina

pPB1	NC_006399.1	2.899	YP_138221.1	pLB4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_2	ssoT (5')
LkplL48	NC_014135.1	3.196	YP_003620509.1	pLB4	<i>Leuconostoc kimchii</i>	Rep_2	N.D.
pMBLR00	NC_019353.1	3.370	YP_006964795.1	pLB4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Rep_2	N.D.
pLAB1000	M55222.1	N.D.	P35856.1	pLB4	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Rep_1	N.D.
pSMA23	NC_010242.1	3.497	YP_001649176.1	pSMA23	<i>Lactobacillus casei</i>	Rep_1	N.D.
pLC88	U31333.1	N.D.	AAA74581.1	pSMA23	<i>Lactococcus casei</i>	Rep_1	N.D.
p141	AB517606.1	N.D.	BAH97325.1	pSMA23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_1	N.D.
pCD034-1	NC_016035.1	3.424	YP_004869658.1	pSMA23	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Rep_1	ssoT (3')
pM4	NC_009666.2	3.320	YP_001621756.1	pSMA23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_1	sso-nuevo
pF8801	NC_007593	5.558	YP_398641.1	pSMA23	<i>Pediococcus damnosus</i>	Rep_1	N.D.
pCD034-2	NC_016034.1	2.707	YP_004869655.1	pSMA23	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Rep_2	ssoT (3')
pG6301	NC_019372.1	3.516	YP_006965557.1	pSMA23	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rep_1	N.D.
pLB925A02	NC_012549.1	3.524	YP_002790952.1	pSMA23	<i>Lactobacillus brevis</i>	Rep_1	N.D.
pSD11	NC_014919.1	3.225	YP_004134615.1	pSMA23	<i>Lactobacillus brevis</i>	Rep_1	N.D.
pGL2	NC_016981.1	4.572	YP_005352352.1	pGL2	<i>Lactococcus garvieae</i>	Rep_2	ssoW (3') Bacteriocina
pAMalpha1	NC_005013.1	9.759	NP_863358.1	pAMalpha1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rep_1+Re p_1 y Rep_3	ssoU (5') Tc
unnamed	GG670384.1	N.D.	NP_863352.1	pUB110			
			EEU18290.1	pAMalpha1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rep_3	N.D.

unnamed	GG692894.1	N.D.	EEU66435.1	pAMalpha1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rep_1+Re p_1 y Rep_3	N.D.	Tc
			EEU66441.1	pUB110				
EF62pA	NC_017314.1	5.143	YP_00570699 8.1	pAMalpha1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Rep_3		
pBMO2	NC_004930.1	3.854	NP_862027.1	pBM02	<i>Lactococcus lactis</i>	Rep_2	ssoW (3')	
pI4	AF300457.1	N.D.	AAG28767.1	pI4	<i>Bacillus coagulans</i>	-	ssoT (5')	Coagulina
pTXW	NC_013952.1	3.178	YP_00351773 0.1	pTXW	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Rep_2	ssoW (5')	
pWCZ	NC_019669.1	3.078	YP_00702701 4.1	pTXW	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Rep_2	N.D.	
pLA106	NC_004985.1	2.862	NP_862697.1	pTXW	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Rep_2	N.D.	
pRCEID2.9	NC_017466.1	2.952	YP_00584922 9.1	pTXW	<i>Lactobacillus casei</i>	Rep_2	N.D.	
pT181	NC_001393.1	4.439	NP_040472.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	ssoA (3')	
pSEQU3	AVBD0100002 6.1	4.846	ERH33926.1	pT181	<i>Staphylococcus equorum</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
pKH17	NC_010284.1	4.441	YP_00165407 4.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
pSE-12228- 01	NC_005008.1	4.439	NP_863257.1	pT181	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
pKH6	NC_001767.1	4.439	NP_053796.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
pS0385-1	NC_017334.1	5.246	YP_00573551 4.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
SAP095B	NC_013312.1	4.439	YP_00693749 7.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Tc
pSBK203	U35036.1	N.D.	AAA79055.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Cm
pKH7	NC_002096.1	4.118	NP_052168.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.	Cm

pS1c	AUPS0100003 1.1	3.899	EQM91159.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_trans	N.D.
SAP047A	NC_013331.1	28.974	YP_006933807 4.1	pT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1 y Rep_3 y RepA_N	Cd, β-lac, enterotoxina G
pPCZ1	NC_013539.1	4.738	YP_00332916 2.1	pPCZ1	<i>Planococcus</i> sp.	Rep_3	ssoA (3')
pGI1	NC_004335.1	8.254	NP_705753.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	ssoT (5')
pCT8513	NC_017207.1	8.513	YP_00556997 5.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
pB52y	AVEZ0100004 6.1	6.283	EQM25212.1	pGI1	<i>Bacillus licheniformis</i>	desconocido	N.D.
pBMB9741	NC_001272.2	6.578	YP_724461.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
pIS56-8	NC_020377.1	8.251	YP_00748209 1.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
BTB_7p	NC_018882.1	7.635	YP_00693112 4.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
pHT7	NC_020243.1	7.635	YP_00742520 4.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
BTB_9p	NC_018886.1	8.513	YP_00693115 0.1	pGI1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Rep_1	N.D.
pE33L5	NC_007104.1	5.108	YP_245942.1	pE33L5	<i>Bacillus cereus</i>	HTH_36	ssoT (5')
pW_3	ABCZ0200010 2.1	N.D.	EDX54234.1	pE33L5	<i>Bacillus cereus</i>	truncada	N.D.
pH308197_1	NC_011340.1	11.567	YP_00226751 6.1	pE33L5	<i>Bacillus cereus</i>	HTH_CRP	N.D.
p1414	NC_002075.1	7.949	NP_049443.1	p1414	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1	ssoT (3')
pBarmNAU-B3a	NC_022531.1	8.438	YP_00862864 5.1	p1414	<i>Bacillus amyloliquefacie</i> ns	-	N.D.
pBA45-1	NC_020273.1	8.009	YP_00744724 4.1	p1414	<i>Bacillus amyloliquefacie</i> ns	Rep_1	N.D.
pPL1	NC_013537.1	6.704	YP_00332915 4.1	p1414	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1 y desconocido	N.D.

pTA1015	NC_001765.1	5.807	NP_053784.1	p1414	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1	ssoT (3')
pBS608	NC_006825.1	6.611	YP_195753.1	p1414	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1	N.D.
pTA1060	NC_001766.1	8.737	NP_053788.1	p1414	<i>Bacillus subtilis</i>	Rep_1 y desconocido	ssoT (3')
pBSG3	NC_014104.1	8.439	YP_003600423.1	p1414	<i>Bacillus amyloliquefacie ns</i>	Rep_1	ssoT (3')
pSD853_7.9	NC_015392.1	7.860	YP_004376195.1	p1414	<i>Salmonella enterica</i>	Rep_1	N.D.
pTRACA20	NC_013279.1	3.780	YP_003208332.1	pTRACA20	uncultured bacterium	DNA_prima se_S	ssoW (3')
pUB110	NC_001384.1	4.548	NP_040431.1	pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1+Re p_1	ssoU (5') Neo, Ble
pSES22	NC_007621.1	4.040	YP_415518.1	pUB110	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Rep_1	N.D. MLS(B)
pERGB	JN970906.1	N.D.	AEW23141.1	pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rep_1 y Rep_1	N.D. PLS(A), Tb, Tc, Trim
pTB19	M63891.1	N.D.	AAA98305.1	pUB110	<i>Geobacillus stearothermoph ilus</i>	Rep_1	ssoU (5') Tc, Ble
pV7037	HF586889.1	N.D.	CCQ71694.1	pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i>	RepA_N y truncada	N.D. Tc, Cd
pBC16	NC_001705.1	4.630	NP_043522.1	pUB110	<i>Bacillus cereus</i>	Rep_1+Re p_1 Rep_3	ssoU (5') Tc PLS(A), Kan/Neo, Tc, Trim
pSWS47	NC_022618.1	28.743	YP_008719890.1	pUB110	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	aN.D. truncada y RepA_N	N.D.
pTB53	D14852.1	N.D.	BAA03580.1	pUB110	<i>Bacillus sp.</i>	-	N.D.
PIP1714	AF015628.1	N.D.	AAC61672.1	pUB110	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Rep_1+Re p_1	N.D. PLS(A), MLS(B)

pNM11	NC_019558.1	11.383	YP_00701641 3.1	pNM11	<i>Planococcus citreus</i>	Rep_3	N.D.
pBS-03	JQ394981.1	N.D.	AFJ49144.1 AFJ49142.1 (MOB _V , truncated)	pNM11	<i>Bacillus</i> sp.	Rep_1	N.D.
pSS-03	NC_016054.1	7.122	YP_00488809 2.1	pNM11	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Rep_1	N.D.
			YP_00488809 0.1 (MOB _V , truncated)				Flr/Cm, MLS(B)
pJ612	NC_019186.1	5.048	YP_00695966 4.1	pJ612	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rep_3	N.D.
pA1606	NC_019180.1	5.646	YP_00695964 4.1	pJ612	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rep_3	N.D.

^a: Plásmidos de los grupos filogenéticos representados en la Figura 17; cuyas relaxasas fueron encontradas mediante un PSI-BLAST usando como referencia MobM_{pNM158} (300 residuos N-terminales).

^b: Localiza el plásmido en uno de los grupos de la Figura 17, para los que se eligió un plásmido representativo de cada grupo.

^c: Familia de la proteína iniciadora de la replicación. Cuando hay más de una, sus nombres se separan por un 'y'. El símbolo '+' se usa para iniciadores que tienen más de un dominio Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

^d: Sólo se indican los sso previamente anotados. La mayoría de las secuencias de los sso abarcan entre 200-300 pb y se localizan en la proximidad del módulo de transferencia, con la excepción del plásmido pJR2941 (ssoA está a 7 kb *upstream* del gen *mob*). El plásmido pM4 tiene un nuevo tipo de sso descrito en (Yin et al, 2009).

^e: Resistencia a antibiótico o metal: Tc, tetraciclina; MLS(B), macrólido/lincosamida/estreptogramina B; Lin, lincosamida; MEP, proteína de bombeo de macrólidos; Strp, estreptomina; Cm, cloramfenicol; Kan, kanamicina; Neo, neomicina; Cu, cobre; Cd, cadmio; PLS(A), pleuromutilinas/lincosamida/estreptogramina A; Trim, trimetoprima; Spec, espectinomina; Em: eritromicina; Ble, bleomicina; Flr, florfenicol; β-lac, beta-lactamasa; Tb, tobramicina. N.D., no determinado.

Bibliografía del anexo:

Yin, S, Hao, Y, Zhai, Z, Zhang, W, Zhou, H, Wang, G, Shi X, Luo Y (2009) Functional analysis of the plasmid pM4 replicon from *Lactobacillus plantarum* M4: Determination of the minimal replicon and functionality identification of the putative sso. *Plasmid* **62**: 166 – 171

PUBLICACIONES

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

El trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones originales:

Lorenzo-Díaz F*, **Fernández-López C***, Garcillán-Barcia MP, Espinosa M (2014) Bringing them together: Plasmid pMV158 rolling circle replication and conjugation under an evolutionary perspective. *Plasmid* **74**:15-31. (*estos autores contribuyeron por igual).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942190>

Fernández-López C, Bravo A, Ruiz-Cruz S, Solano-Collado V, Garsin DA, Lorenzo-Díaz F, Espinosa M (2014) Mobilizable Rolling-Circle Replicating Plasmids from Gram-Positive Bacteria: A Low-Cost Conjugative Transfer. *Microbiol Spectr* **2**(5):PLAS-0008-2013.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25606350>

Fernández-López C, Pluta R, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Espinosa M, Coll M, Lorenzo-Díaz F, Boer RD (2013) Functional Properties and Structural Requirements of the Plasmid pMV158-Encoded MobM Relaxase Domain. *J. Bacteriol.* **195**(13):3000.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625844>

Fernández-López C*, Lorenzo-Díaz F*, Pérez-Luque R, Rodríguez-González L, Boer RD, Lurz R, Bravo A, Coll M, Espinosa M (2013) Nicking activity of the pMV158 MobM relaxase on cognate and heterologous origins of transfer. *Plasmid* **70**:120-130. (*estos autores contribuyeron por igual).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562993>